Fonte:

https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/916213/biotecnologia-estado-da-arte-e-aplicacoes-na-agropecuaria

BIOTECNOLOGIA

estado da arte e aplicações na agropecuária

Editores Técnicos

Fábio Gelape Faleiro

Solange Rocha Monteiro de Andrade

Fábio Bueno dos Reis Junior

Embrapa

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Cerrados
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

BIOTECNOLOGIA
estado da arte e aplicações na agropecuária

Editores Técnicos
Fábio Gelape Faleiro
Solange Rocha Monteiro de Andrade
Fábio Bueno dos Reis Junior

Embrapa Cerrados
Planaltina, DF
2011

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados
BR 020, Km 18, Rodovia Brasília/Fortaleza
Caixa Postal 08223
CEP 73310-970 – Planaltina, DF
Fone: (61) 3388-9898 – Fax: (61) 3388-9879
http://www.cpac.embrapa.br
sac@cpac.embrapa.br

Coordenação editorial
Jussara Flores de Oliveira

Revisão de texto
Francisca Elijani do Nascimento
Jussara Flores de Oliveira

Normalização bibliográfica
Marilaine Schaun Pelufê
Paloma Guimarães Correa de Oliveira
Shirley da Luz Soares Araújo

Capa, projeto gráfico e diagramação
Fabiano Bastos

Tratamento de figuras
Wellington Cavalcanti

Fotos
Embrapa Cerrados

1ª edição
1ª impressao (2011): 2.000 exemplares

Todos os direitos reservados.
A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei n° 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação - CIP
Embrapa Cerrados

B616 Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária / editores técnicos: Fábio Gelape Faleiro, Solange Rocha Monteiro de Andrade. – Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2011.
730 p. : il.

ISBN 978-85-7075-059-4

1. Engenharia genética. 2. Planta transgênica. 3. Organismo trangênico. 4. Melhoramento genético. I. Faleiro, Fábio Gelape. II. Andrade, Solange Rocha Monteiro de.

631.5233 - CDD 21

© Embrapa 2011

Autores:

Ana Maria Costa
Engenheira Agrônoma, D.Sc.
Pesquisadora da Embrapa Cerrados
abarros@cpac.embrapa.br

Artur Jordão de Magalhães Rosa
Zootecnista, D.Sc.
Pesquisador da Embrapa Cerrados
artur.rosa@cpac.embrapa.br

Austeclínio Lopes de Farias Neto
Engenheiro Agrônomo, Ph.D.
Pesquisador da Embrapa Cerrados
auster@cpac.embrapa.br

Carlos Frederico Martins
Médico Veterinário, D.Sc.
Pesquisador da Embrapa Cerrados
carlos.frederico@cpac.embrapa.br

Chang das Estrelas Wilches
Engenheiro Agrônomo, M. Sc.
Analista da Assessoria de Inovação Tecnológica da Embrapa
chang.wilches@embrapa.br

Cícero Donizeti Pereira
Engenheiro Agrônomo, Dr.
Pesquisador da Embrapa Cerrados
cicero.pereira@cpac.embrapa.br

Cynthia Torres de Toledo Machado
Engenheira Agrônoma, Ph.D.
Pesquisadora da Embrapa Cerrados
cynthia@cpac.embrapa.br

Erich Yukio Tempel Nakasu
Biólogo, M.Sc.
Bolsista de Desenvolvimento Tecnológico Industrial do CNPq
erichnakasu@cenargen.embrapa.br

Fábio Bueno dos Reis-Junior
Engenheiro Agrônomo, D.Sc.
Pesquisador da Embrapa Cerrados
fabio@cpac.embrapa.br

Fábio Gelape Faleiro
Engenheiro Agrônomo, D.Sc.
Pesquisador da Embrapa Cerrados
ffaleiro@cpac.embrapa.br

Fábio Martins Mercante
Engenheiro Agrônomo, Ph.D.
Pesquisador da Embrapa Agropecuária Oeste
BR 163, km 253,6 - Caixa Postal 661
CEP 79804-970 - Dourados, MS
mercante@cpao.embrapa.br

Guilherme Montandon Chaer
Engenheiro Agrônomo, Ph. D.
Pesquisador da Embrapa Agrobiologia
Rodovia BR 465, km 7
Seropédica - RJ - Brasil - CEP: 23890-000
gchaer@cnpab.embrapa.br

Ieda de Carvalho Mendes
Engenheira Agrônoma, Ph.D.
Pesquisadora da Embrapa Cerrados
mendesi@cpac.embrapa.br

Jerri Édson Zilli
Engenheiro Agrônomo, Ph.D.
Pesquisador da Embrapa Roraima, Rodovia BR-174, Km 8
Distrito Industrial, Boa Vista, RR - Brasil - CEP 69301-970
zilli@cpafrr.embrapa.br

Klecius Renato Silveira Celestino
Engenheiro Químico, D.Sc.
Professor da Universidade de Brasília
Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília - CEP 70910-900
klecius@unb.br

Luciana Harumi Morimoto Figueiredo
Bióloga, M. Sc.
Analista da Assessoria de Inovação Tecnológica da Embrapa
luciana.figueiredo@embrapa.br

Luiz Gustavo B. Siqueira
Médico Veterinário, MSc, MVetSc.
Pesquisador da Embrapa Gado de Leite
lgbsiqueira@cnpgl.embrapa.br

Magnólia de Araújo Campos
Bióloga, D.Sc.
Professora da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG
Rua Aprigio Veloso, 882 – Bairro Universitário – CEP 58429-140
Campina Grande, PB
magnoliaacp@ufcg.edu.br

Marcelo Ferreira Fernandes
Engenheiro Agrônomo, Ph.D.
Pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros
Av. Beira Mar, 3250 - Jardins
Caixa Postal 44 - Aracaju, SE - Brasil - 49025-040
marcelo@cpatc.embrapa.br

Marco Aurélio Caldas de Pinho Pessoa-Filho
Biólogo, D.Sc.
Pesquisador da Embrapa Cerrados
marco.pessoa@cpac.embrapa.br

Margot Alves Nunes Dode
Médica Veterinária, Ph.D.
Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W5 Norte (final)
Caixa Postal 02372 - Brasília, DF - Brasil - 70770-900
dode@cenargen.embrapa.br.

Maria Cristina Rocha Cordeiro
Bióloga, D.Sc.
Pesquisadora da Embrapa Cerrados
cristina@cpac.embrapa.br

Mariangela Hungria
Engenheira Agrônoma, Ph.D.
Pesquisadora da Embrapa Soja, Rod. Carlos João Strass - Distrito de Warta, Caixa Postal 231 - CEP 86001-970, Londrina - Paraná- Brasil
hungria@cnpso.embrapa.br

Marilia Santos Silva
Engenheira Agrônoma, Ph.D.
Pesquisadora da Embrapa Cerrados
marilia@cpac.embrapa.br

Mário Lúcio Vilela de Resende
Engenheiro Agrônomo, Ph.D.
Professor da Universidade Federal de Lavras – UFLA
Campus Universitário - Prédio da Reitoria
Caixa Postal 3037 - CEP 37200-000 - Lavras MG
mlucio@ufla.br

Mônica Cibele Amâncio
Advogada e Bióloga, M. Sc.
Analista da Assessoria de Inovação Tecnológica da Embrapa
monica.amancio@embrapa.br

Nilton Tadeu Vilela Junqueira
Engenheiro Agrônomo, D.Sc.
Pesquisador da Embrapa Cerrados
junqueir@cpac.embrapa.br

Roberto Teixeira Alves
Engenheiro Agrônomo, Ph.D.
Pesquisador da Embrapa Cerrados
ralves@cpac.embrapa.br

Rodrigo da Rocha Fragoso
Biólogo, D.Sc.
Pesquisador da Embrapa Cerrados
rodrigo.fragoso@cpac.embrapa.br

Sebastião Pedro da Silva Neto
Engenheiro Agrônomo, Ph.D.
Pesquisador da Embrapa Cerrados
sebastiao.pedro@cpac.embrapa.br

Solange Rocha Monteiro de Andrade
Bióloga, D.Sc.
Pesquisadora da Embrapa Cerrados
solange@cpac.embrapa.br

Sonia Maria Costa Celestino
Engenheira Química, D.Sc.
Pesquisadora da Embrapa Cerrados
sonia.costa@cpac.embrapa.br

Thales Lima Rocha
Biólogo, Ph.D.
Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W5 Norte (final)
Caixa Postal 02372 - Brasília, DF - Brasil - 70770-900
thales@cenargen.embrapa.br

Valter Lopes
Geógrafo
Professor do Centro Educacional 03, Planaltina, DF
lopes.valtinho@gmail.com

Veronica Massena Reis
Engenheira Agrônoma, D.Sc.
Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia
Rodovia BR 465, km 7, Seropédica - RJ - Brasil - CEP: 23890-000
verônica@cnpab.embrapa.br

Walter Quadros Ribeiro Júnior
Biólogo, Ph.D.
Pesquisador da Embrapa Cerrados
walter@cpac.embrapa.br

Sumário

11 Apresentação

13 **Capítulo 1 –** Biotecnologia: uma visão geral

31 **Capítulo 2 –** Princípio científico e análises genéticas utilizando marcadores moleculares

55 **Capítulo 3 –** Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal

121 **Capítulo 4 –** Prospecção gênica e bioinformática

143 **Capítulo 5 –** Genômica funcional

175 **Capítulo 6 –** Metagenômica: princípios e aplicações

195 **Capítulo 7 –** Biotecnologia e diagnósticos moleculares

219 **Capítulo 8 –** Microbiologia do solo e sustentabilidade de sistemas agrícolas

247 **Capítulo 9 –** Fixação biológica de nitrogênio: uma revolução na agricultura

283 **Capítulo 10 –** Fungos micorrízicos arbusculares: pesquisa e desenvolvimento para a agricultura

321 **Capítulo 11 –** Biotecnologia aplicada à engenharia de alimentos

355 **Capítulo 12 –** Interações moleculares planta-patógeno

379 **Capítulo 13 –** Controle biológico de insetos-praga

409 **Capítulo 14 –** Cultura de tecidos vegetais: princípios e aplicações

435 **Capítulo 15 –** Engenharia genética: princípios científicos e aplicações

469 **Capítulo 16 –** Biossegurança ambiental e alimentar de OGMs

511 **Capítulo 17 –** Recursos genéticos: conservação, caracterização e uso

551 **Capítulo 18 –** Melhoramento genético de plantas e biotecnologia

567 **Capítulo 19 –** Análise genômica aplicada a produção animal

653 **Capítulo 20 –** Biotecnologia aplicada a pecuária bovina

709 **Capítulo 21 –** Biotecnologia agropecuária e propriedade intelectual

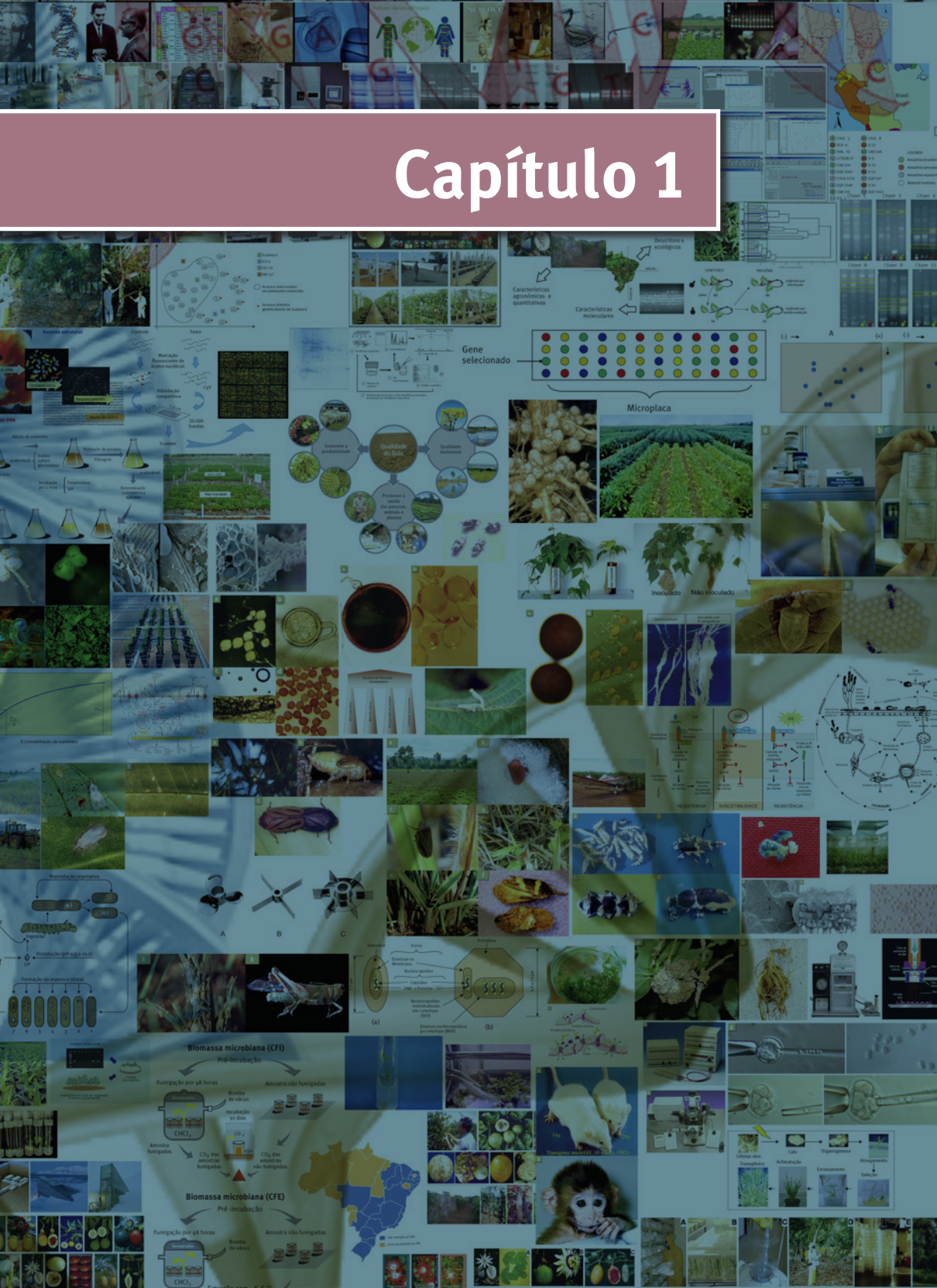
Apresentação

A biotecnologia é hoje uma das ferramentas de grande importância para propiciar benefícios a diferentes setores da sociedade. No caso da agropecuária, ações de pesquisa e desenvolvimento na área biotecnológica são fundamentais para o desenvolvimento de sistemas mais produtivos e sustentáveis. A biotecnologia envolve várias áreas do conhecimento e, em consequência, vários profissionais, sendo uma ciência de natureza multidisciplinar.

As várias técnicas relacionadas à biotecnologia têm trazido, via de regra, benefícios para a sociedade, sendo exemplos, as fermentações industriais na produção de vinhos, cervejas, pães, queijos e vinagres; a produção de fármacos, vacinas, antibióticos e vitaminas; a utilização de biofungicidas no controle biológico de pragas e doenças; o uso de microrganismos visando a biodegradação de lixo e esgoto; o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos para a melhoria de produtividade das plantas; o desenvolvimento de plantas e animais melhorados utilizando técnicas convencionais de melhoramento genético e também a transformação genética.

Neste livro, estas várias técnicas são discutidas por vários especialistas da Embrapa Cerrados e instituições parceiras, sendo um material didático importante para dar uma idéia geral da biotecnologia, incluindo aspectos conceituais, sua importância histórica e atual e também sua importância futura, considerando toda sua potencialidade e o que ainda vai ser descoberto.

José Roberto Rodrigues Peres
Chefe-Geral da Embrapa Cerrados


Capítulo 1
Gene selecionado
Microplaca
Inoculado
Não inoculado
Biomassa microbiana (CFI)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas
Biomassa microbiana (CFE)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas

Biotecnologia: uma visão geral

Fábio Gelape Faleiro
Solange Rocha Monteiro de Andrade

A Biotecnologia – conceitualmente, a união de biologia com tecnologia – é um conjunto de técnicas que utiliza os seres vivos, ou parte desses, no desenvolvimento de processos e produtos que tenham uma função econômica e (ou) social. A biotecnologia envolve várias áreas do conhecimento e, em consequência, vários profissionais, sendo uma ciência de natureza multidisciplinar. Na Figura 1A, ilustram-se algumas áreas do conhecimento com interface com a biotecnologia.

As várias técnicas relacionadas à biotecnologia (Figura 1B) têm trazido, via de regra, benefícios para a sociedade (Figura 1C). Podemos citar como exemplos as fermentações industriais na produção de vinhos, cervejas, pães, queijos e vinagres; a produção de fármacos, vacinas, antibióticos e vitaminas; a utilização de biofungicidas no controle biológico de pragas e doenças; o uso de microrganismos visando à biodegradação de lixo e esgoto; o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos para a melhoria de produtividade das plantas; o desenvolvimento de plantas e animais melhorados utilizando técnicas convencionais de melhoramento genético e também a transformação genética.

Neste capítulo, é apresentada uma visão geral da biotecnologia, abordando aspectos conceituais e históricos da biotecnologia clássica e moderna e fazendo um breve relato das principais técnicas e produtos biotecnológicos e seus benefícios econômicos, sociais e ambientais.

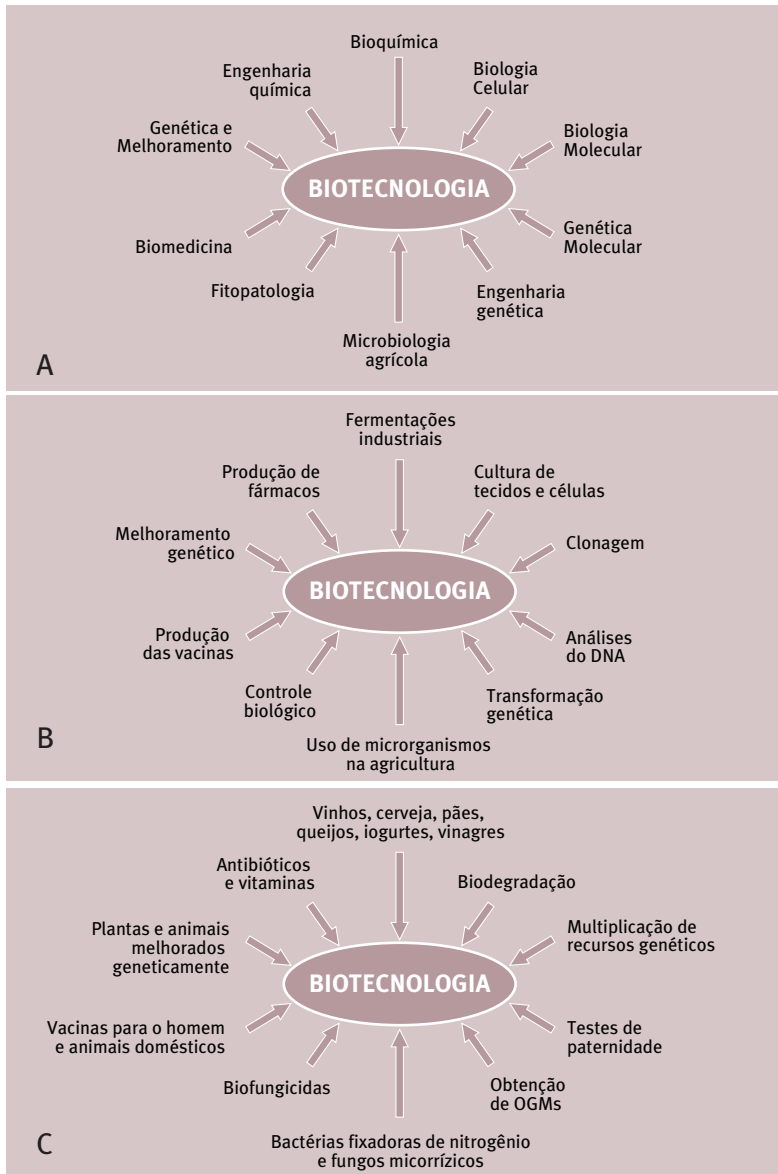


Figura 1. Principais disciplinas (A), técnicas (B) e produtos (C) relacionados à biotecnologia.

O que é biotecnologia?

Podemos encontrar nos mais variados meios de comunicação várias definições para o termo biotecnologia. Uma definição ampla de biotecnologia é o uso de organismos vivos ou parte deles para a produção de bens e serviços. Podemos dizer que, nessa definição, enquadram-se a biotecnologia clássica e a moderna. A biotecnologia clássica envolve um conjunto de atividades que o homem vem desenvolvendo há milhares de anos, como a produção de alimentos fermentados, como o pão e o vinho. A chamada biotecnologia moderna envolve tecnologias de engenharia genética, DNA recombinante, cultura de células e embriões para o desenvolvimento de produtos e processos.

Entre as várias definições de biotecnologia, encontramos aquelas em sentido amplo:

"É o uso de conhecimentos sobre os processos biológicos e sobre as propriedades dos seres vivos, com o fim de resolver problemas e criar produtos de utilidade." (CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY, 1992).

"É a tecnologia baseada na biologia, especialmente quando usada na agricultura, ciência dos alimentos e medicina." (WIKIPÉDIA, 2009).

Algumas definições se enquadram mais dentro da biotecnologia clássica:

"É o uso industrial de processos de fermentação... tecnologia que permite a utilização de material biológico para fins industriais." (BORÉM et al., 2007).

"É um conjunto de técnicas que utiliza seres vivos, ou parte desses, para produzir ou modificar produtos, aumentar a produtividade de plantas e animais de maneira eficiente ou, ainda, produzir microrganismos para usos específicos." (TORRES et al., 2000).

Outras definições estão mais relacionadas à biotecnologia moderna:

"É o uso de células e biomoléculas para a resolução de problemas ou transformação em produtos. É um conjunto de técnicas que potencializa as melhores características das células, como a capacidades produtivas, e disponibiliza moléculas biológicas, como DNA e proteínas, para serem utilizadas" (AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL, 2009).

"É o desenvolvimento de produtos por processos biológicos, utilizando-se a tecnologia do DNA recombinante." (BORÉM; SANTOS, 2004).

"Espectro ou conjunto de tecnologias moleculares aplicadas ao estudo de microrganismos, plantas e animais." (BORÉM et al., 2009; CONSELHO DE INFORMAÇÃO SOBRE BIOTECNOLOGIA, 2009).

Dessa forma, biotecnologia pode ter diferentes significados, principalmente quando comparamos a biotecnologia clássica e a moderna. Podemos resumir o conceito de biotecnologia, com base na origem da palavra: *bio* significa vida, *tecno* significa uso prático e aplicado da ciência e *logos* significa conhecimento, ou seja, conhecimentos que usam organismos, células e moléculas de forma prática na obtenção de bens e serviços. Podemos dizer também que é a tecnologia que gera produtos e processos de origem biológica.

História da biotecnologia

O termo biotecnologia foi utilizado, pela primeira vez, no início do século passado. Apesar de o termo ser novo, o princípio é muito antigo. Considerando o seu conceito amplo, podemos dizer que a biotecnologia iniciou-se com a agricultura ou agropecuária, ou seja, com a capacidade do homem de domesticar plantas e animais para seu benefício. Estima-se que 8000 anos a.C., na Mesopotâmia, berço da civilização, os povos selecionavam as melhores sementes das melhores plantas para aumentar a colheita. Outro exemplo histórico da biotecnologia é a utilização da levedura na fermentação da uva e do trigo para produção de vinho e pão, o que já acontecia por volta de 7000 anos a.C. Estima-se que a utilização de bactérias para a fermentação do leite para produção de queijos já acontecia a 3000 anos a.C. Logicamente, os povos dessa época não faziam ideia que as leveduras e bactérias fossem utilizadas nesses processos de fermentação. Os microrganismos somente foram descobertos em 1675 por Anton Van Leeuwenhoek e, somente em 1862, Louis Pasteur descobriu a associação desses microrganismos com o processo de fermentação. O início da biotecnologia é ilustrado na Figura 2 e, na Figura 3, a descoberta dos microrganismos.

Figura 2. Início da biotecnologia com a agricultura e a produção do pão e do vinho.

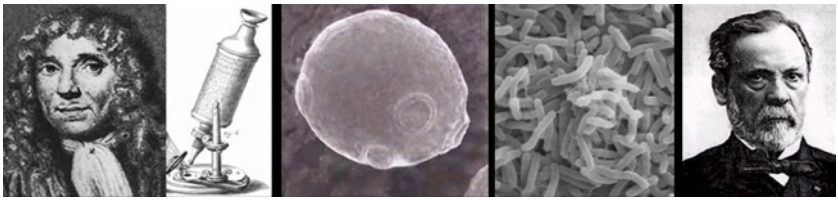


Figura 3. Anton Van Leeuwenhoek e Louis Pasteur e a descoberta dos microrganismos.

Com a evolução da ciência em seus diversos setores, inúmeras metodologias biotecnológicas têm sido sistematizadas, aumentando seus benefícios econômicos, sociais e ambientais. A descoberta da utilidade dos microrganismos trouxe a primeira revolução biotecnológica, a qual ocorreu na medicina com a produção das vacinas. Louis Pasteur foi o pioneiro e, no Brasil, Oswaldo Cruz foi um importante seguidor. Oswaldo Cruz foi o pioneiro no estudo das moléstias tropicais e da medicina experimental no Brasil (Figura 4). Fundou o Instituto Soroterápico Nacional no Rio de Janeiro em 1900, transformado em Instituto Oswaldo Cruz, respeitado internacionalmente. Quase 90 anos após a sua morte, Oswaldo Cruz é lembrado em cada canto do território nacional, embora tenha tido na época a incompreensão de seus contemporâneos por causa de suas campanhas sanitárias, as quais permitiram que a vacinação se tornasse uma prática corriqueira e de extrema importância no Brasil (FALEIRO; ANDRADE, 2009). Hoje, seria praticamente impossível a vida sem as vacinas dos seres humanos e animais domésticos.

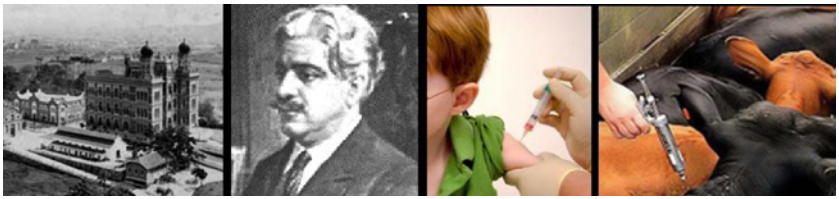


Figura 4. Oswaldo Cruz e seu pioneirismo na produção de vacinas no Brasil.

Entre outros cientistas importantes para o desenvolvimento da biotecnologia, merecem destaque Gregor Mendel, considerado o 'pai da genética', com a descoberta da hereditariedade (como as características passam de geração para geração) em 1865 e Alexander Fleming, descobridor do antibiótico penicilina obtido a partir do fungo *Penicillium* (Figura 5).

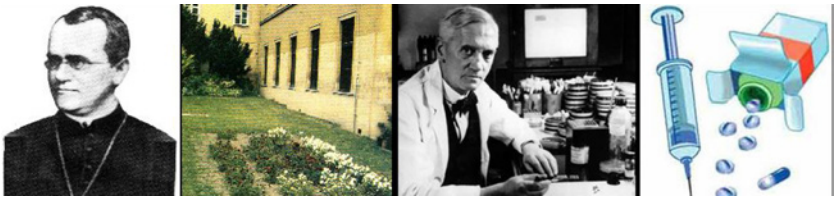


Figura 5. Gregor Mendel e Alexander Fleming.

E a biotecnologia moderna? Podemos dizer que a biotecnologia moderna nasceu com a descoberta da estrutura do DNA (ácido desoxirribonucleico, molécula responsável pela informação genética de cada ser vivo) por James Watson e Francis Crick em 1953. Essa descoberta foi fundamental para entender como o DNA era capaz de codificar as proteínas responsáveis por todos os processos e pelo fenótipo de todos os seres vivos. Esse entendimento foi concluído com a decifração do código genético por Har Gobing Khorana e Marshall Niremberg em 1967 (Figura 6). Esses pesquisadores explicaram como apenas quatro nucleotídeos codificavam os 20 diferentes aminoácidos que constituem as milhares de proteínas existentes (BORÉM; SANTOS, 2004).

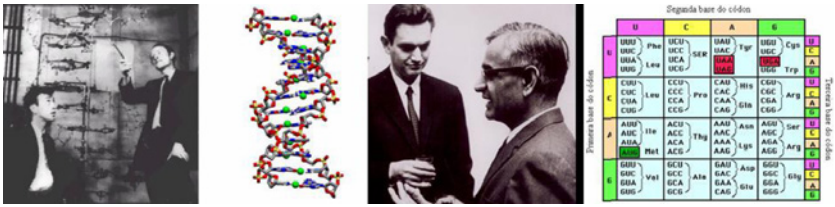


Figura 6. Watson e Crick e a estrutura do DNA; Niremberg e Khorana e o código genético.

A partir da descoberta do DNA e do código genético, houve uma revolução incrível na área da genética e biologia molecular, surgindo a manipulação controlada e intencional do DNA por meio das técnicas de engenharia genética. Segundo Aragão (2009), a engenharia genética surgiu em 1972, quando cientistas americanos conseguiram ligar sequências de DNA de *Escherichia coli* a do *Simian papiloma virus*. Como consequência dessas pesquisas, o primeiro organismo transgênico – *E. coli* contendo sequências de DNA de *Xenopus laevis* – foi produzido em 1973. Esse resultado levou o líder do projeto, Dr. Paul Berg, a ganhar o Prêmio Nobel em 1980. Por meio dessas técnicas, foi possível a produção de insulina humana em bactérias e o desenvolvimento de inúmeras plantas transgênicas a partir da década de 1980, sendo a primeira uma planta de fumo transformada com a capa proteica do vírus do mosaico do tabaco (*Tobacco mosaic virus* – TMV) (POWELL et al., 1986). Em 1994, a U.S. Food and Drug Administration (FDA) liberou para o consumo humano o primeiro alimento geneticamente modificado, o tomate Flavr Savr, produzido pela empresa americana Calgene.

Na história recente da biotecnologia moderna, merece destaque a clonagem da ovelha Dolly (Figura 7), em 1996, que foi o primeiro mamífero a ser clonado com sucesso a partir de uma célula adulta. Dolly foi gerada a partir de células mamárias de uma ovelha adulta com cerca de 6 anos, por meio de uma técnica conhecida como transferência somática de núcleo. Outro acontecimento marcante foi o anúncio do projeto genoma humano, em 1990, que tinha como objetivo conhecer a sequência completa dos nucleotídeos que o compõem. O prazo previsto para a conclusão do projeto era de 15 anos. Em virtude da grande cooperação da comunidade científica internacional, associada

aos avanços no campo da biologia molecular relacionado às técnicas de sequenciamento, de bioinformática e das tecnologias de informação, um primeiro esboço do genoma foi anunciado em 26 de Junho de 2000.

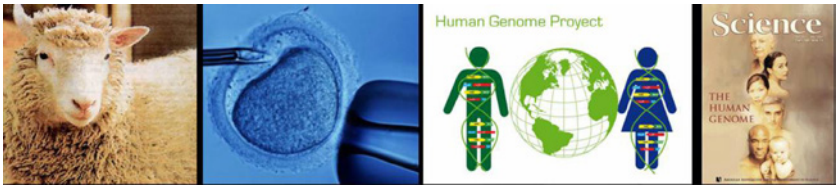


Figura 7. História recente da biotecnologia moderna com a clonagem da ovelha Dolly e o sequenciamento do genoma humano .

Além dos produtos tecnológicos, a biotecnologia moderna tem possibilitado o desenvolvimento de diferentes tipos de marcadores moleculares e técnicas de análises genômicas e proteômicas, as quais têm permitido várias aplicações práticas na pesquisa e desenvolvimento da agropecuária. Algumas das principais técnicas e produtos biotecnológicos ligados à agropecuária são comentados resumidamente a seguir e apresentados com maior profundidade nos próximos capítulos do livro.

Principais técnicas e produtos biotecnológicos

As técnicas e produtos biotecnológicos possuem aplicações em diferentes áreas, sendo as principais aquelas ligadas à indústria, ambiente, saúde, agropecuária, além da área científica. Abaixo são relatados algumas técnicas e produtos em cada uma das cinco áreas principais de aplicação. Na Figura 8, ilustra-se essa diversidade de aplicações.

Figura 8. Diversidade de aplicações da biotecnologia na área industrial, ambiental, saúde, agropecuária e científica .

Área industrial

Essas aplicações estão relacionadas à obtenção e conservação de alimentos, principalmente utilizando-se de processos fermentativos. Esses processos foram utilizados, de forma inconsciente, há milhares de anos a.C.. Com a descoberta dos microrganismos, os processos de fermentação têm sido otimizados e utilizados em escala comercial. Vários são os alimentos obtidos ou modificados por processos fermentativos. Vinhos, vinagres, cervejas, pães, queijos e leite fermentado são os exemplos com relatos de uso mais antigos. Outras bebidas alcoólicas obtidas a partir de frutas, cereais e até de folhas e raízes são exemplos de alimentos utilizados por índios de forma tradicional.

Vários microrganismos são utilizados em processos fermentativos como as bactérias (*Bacillus, Zymomonas, Acetobacter* etc.) e fungos (*Aspergillus, Penicillium, Trichoderma*, etc.), incluindo a levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), exemplo mais comum e importante do ponto de vista econômico. Os principais processos fermentativos são a fermentação alcoólica, láctica e biossíntese acética. Os principais produtos da fermentação alcoólica são as bebidas alcoólicas e o etanol carburante, os da fermentação láctica são os leites fermentados, queijos, chucrutes, picles e azeitonas e os da biossíntese acética os vinagres e ácido acético.

Com o avanço da biotecnologia, espera-se que novos produtos industriais e processos de obtenção sejam produzidos e aperfeiçoados, tornado o sistema mais eficiente, com benefícios sociais, ambientais e econômicos.

Área ambiental

A aplicação mais direta da biotecnologia na área ambiental está relacionada à biodegradação, ou seja, à decomposição de materiais ou substâncias químicas pela ação dos seres vivos, sobretudo, pela ação dos microrganismos. A biodegradação é vantajosa ao meio ambiente porque elimina certos contaminantes de origem orgânica como fezes, detergentes, papeis, etc.

A tecnologia baseada na biodegradação é chamada de biorremediação, que é a utilização de seres vivos ou seus componentes (geralmente microrganismos ou enzimas) na recuperação de áreas contami-

nadas, degradando compostos poluentes. Esse processo de degradação pode não ser efetivo se o contaminante apresentar outras substâncias, tais como, metais pesados (chumbo e mercúrio), ou se o meio apresentar um pH extremo ou outras condições que dificultam a ação microbiana. No caso dos metais pesados, a fitorremediação (utilização das plantas no processo de recuperação de áreas contaminadas) é útil, pois muitas plantas são capazes de acumular essas toxinas em suas raízes ou partes aéreas, as quais são colhidas e eliminadas da área contaminada. No caso das condições desfavoráveis à ação microbiana, um exemplo mais geral é o tratamento de derramamentos de óleo com nitratos ou sulfatos, criando condições favoráveis à decomposição do óleo pelas bactérias.

As experiências com a biodiversidade dos microrganismos mostram que inúmeros compostos poluentes podem ser degradados. Pensando-se na transformação genética, microrganismos transgênicos podem ser desenvolvidos para degradar determinado poluente. Logicamente, o uso de tais microrganismos deve ser precedido de pesquisas relacionadas à biossegurança, evitando que tal microrganismo se torne um invasor do ecossistema.

Além da biorremediação, a biotecnologia apresenta aplicações indiretas relacionadas aos benefícios ambientais, como o uso de plantas transgênicas. Andrade e Faleiro (2009) relataram diversos trabalhos que estudaram o efeito ambiental positivo dos OGMs. Segundo Brookes e Barfoot (2005), as lavouras com plantas transgênicas contribuíram para uma significativa redução no impacto ambiental global da produção agrícola, relacionada à uma diminuição do uso de pesticidas. Outro benefício de algumas plantas transgênicas está relacionado à viabilização de sistemas de produção que utilizam o cultivo mínimo ou plantio direto. As vantagens desse sistema são: conservação do solo evitando-se a erosão, diminuição da emissão de gases de efeito estufa, redução do assoreamento dos rios e mananciais e conservação da fertilidade e da micro e macro fauna e flora do solo.

Acredita-se que muito ainda deve ser pesquisado e desenvolvido considerando os benefícios ambientais da biotecnologia. Segundo Fontes e Sampaio (1997), entre as novas ferramentas da ciência mencionadas como chave para a agricultura ambientalmente sustentável, a biotecnologia ocupa lugar de destaque.

Área da saúde

Os benefícios da biotecnologia na área da saúde são impressionantes. Villen (2009) relata de forma objetiva os principais impactos positivos da biotecnologia na área da saúde, citando como exemplo histórico o uso de antibióticos. Os antibióticos são empregados no combate a infecções causadas por microrganismos, notadamente bactérias, tanto no organismo humano como no animal e vegetal. Os antibióticos possuem destacada importância econômica, entre os produtos obtidos pela biotecnologia. Atualmente, existem mais de 5 mil tipos diferentes de antibióticos. Essa diversidade foi possível e impactada pelo melhoramento genético dos microrganismos utilizados na produção.

Outro exemplo histórico e também citado por Villen (2009) é o uso das vacinas. As vacinas representam um importante instrumento no controle de doenças infecciosas. Muitas doenças podem ser evitadas pela imunidade induzida como a poliomielite, a varíola, o sarampo, entre outras. As vacinas podem ser de origem viral, bacteriana, protozoária e mesozoária. A biotecnologia, pela técnica do DNA recombinante, tem permitido o desenvolvimento de novos agentes imunizantes para influenza, herpes, polio e hepatite A e B. Vacinas de origem bacteriana, para diversos tipos de meningite, têm sido produzidas por meio de fermentação.

A produção de macromoléculas úteis na medicina humana e animal pela biotecnologia também apresenta grande importância. A produção dessas macromoléculas por microrganismos teve grande impulso com a tecnologia do DNA recombinante. Entre os principais produtos, estão a insulina humana, interferon, hormônio de crescimento humano, peptídios neuroativos, hidrocortisona, testosterona, vitaminas etc. Podemos dizer que a produção da insulina humana por bactérias, na década de 1970, foi a primeira utilização comercial da engenharia genética. Segundo Aragão (2009), atualmente, mais de 400 genes de proteínas com potencial para o uso terapêutico na medicina humana e veterinária já foram obtidos. Mais de 30 desses genes foram introduzidos em organismos transgênicos que geraram medicamentos aprovados e utilizados em várias partes do mundo.

Agropecuária

A atividade agropecuária, conforme documentada pela história e por registros arqueológicos, tem sido inseparável da evolução e da atividade da sociedade humana. A sociedade como é vista hoje não poderia ter desenvolvido ou mesmo sobrevivido sem uma adequada fonte de alimentos. A invenção da agricultura, contudo, não resolveu por definitivo o problema do suprimento de alimentos. Quando a seca ou a explosão de doenças e pragas caíam sobre as culturas, o resultado era fome e crise. Esses fatos já ocorriam há muitos anos, como citado em numerosas referências bíblicas.

Alternativas biotecnológicas para aumentar a produtividade das plantas e dos animais e torná-los mais resistentes a fatores ambientais foram sendo desenvolvidas ao longo dos anos. Um destaque especial deve ser dado ao melhoramento genético que, desde o início da agricultura, vem sendo utilizado pelos povos, mesmo que de forma empírica. Após a redescoberta das leis de Mendel, o melhoramento genético começou a ser realizado de forma mais eficiente e precisa. Inúmeros são os exemplos dos benefícios do melhoramento genético vegetal e animal na agricultura. Com o advento da biotecnologia moderna, novas perspectivas são esperadas. Segundo Borém e Milach (1998), a biotecnologia moderna será gradativamente incorporada na rotina do melhoramento genético, como instrumento para desenvolver novas variedades, tornando a ciência ainda mais precisa. Marcadores moleculares e da engenharia genética estão permitindo diminuir o tempo para obtenção de novas variedades e expandir o conjunto gênico disponível para cada programa de melhoramento genético, entretanto muito ainda deve ser pesquisado considerando toda potencialidade das tecnologias. Segundo Ferreira e Faleiro (2008), do ponto de vista comercial, a indústria transgênica vegetal tem sido marcada até agora pelo emprego de apenas dois tipos de genes: resistência à herbicida e resistência a insetos. Vários outros produtos têm sido testados, como aumento de vitamina A em grãos de arroz ("golden rice", YE et al., 2000) ou vitamina E (SHINTANI; DELLAPENNA, 1998); qualidade de fruto; resistência a fungos; resistência à bactéria; composição de amido nos grãos (JOBLING et al., 2002); tolerân-

cia à estresse abiótico, principalmente seca e salinidade (BARTELS; NELSON, 1994).

Outra alternativa biotecnológica utilizada na agropecuária é o controle biológico, o qual baseia-se na utilização de recursos genéticos microbianos, insetos predadores e parasitoides para o controle de doenças e pragas, especialmente os insetos e ácaros fitófagos, nos sistemas de produção agrícola. Segundo Menezes (2006), o início da história do uso do controle biológico de pragas agrícolas ocorreu no século III, quando os chineses se valeram da predação de formigas (*Oecophylla smaragdina*) para o controle de pragas de citros. Todavia, somente no século XX é que o controle biológico passou a ser objeto de pesquisas constantes para sua implantação de forma mais presente e intensiva nos ecossistemas agrícolas.

O uso de microrganismos na agricultura também merece destaque. Bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos são dois exemplos clássicos. A fixação biológica de nitrogênio é o processo pelo qual esse elemento químico é captado da atmosfera, onde se caracteriza pela sua forma molecular relativamente inerte (N2) e é convertido em compostos nitrogenados, como amônio ou nitrato, usados em diversos processos químico-biológicos do solo, especialmente importantes para a nutrição de plantas. A associação de bactérias diazotróficas, principalmente do gênero *Rhizobium*, com raízes de plantas é um tipo de simbiose em as bactérias utilizam parte dos fotoassimilados da planta hospedeira, a qual beneficia-se do nitrogênio fixado pela bactéria.

A inoculação de bactérias diazotróficas em sementes de leguminosas é uma tecnologia capaz de reduzir consideravelmente a adubação mineral nitrogenada e em alguns casos substitui-la. A micorriza também é uma associação simbiótica entre fungos micorrízicos e as raízes de algumas plantas. Nesse caso, os fungos utilizam parte dos fotoassimilados das plantas para o desenvolvimento de hifas que vão auxiliar as raízes da planta na função de absorção de água e minerais do solo, já que aumentam a superfície de absorção ou rizosfera.

A cultura de tecidos, como biotecnologia, também apresenta vários benefícios para a agricultura e mais especificamente para os programas de melhoramento genético de plantas. Ferreira et al. (1998) citam

algumas dessas aplicações como a conservação e avaliação de germoplasma; aumento da variabilidade genética para fins de seleção; introgressão de genes de interesse (polinização in vitro, cultura de embriões, fusão de protoplastos, haploidização por cultura de anteras); aceleração do programa de melhoramento (germinação de sementes in vitro, clonagem de genótipos) e produção comercial de mudas de alta qualidade (multiplicação e limpeza clonal). Além disso, para a obtenção de uma planta transgênica, é indispensável um método eficiente de regeneração in vitro (ANDRADE, 2003).

Na agropecuária, é importante considerar os avanços da biotecnologia na produção e no melhoramento genético animal. Tecnologias como a inseminação artificial, transferência de embriões, a clonagem animal e a transformação genética podem ser destacadas pelos avanços obtidos nos últimos anos. Além do aumento da produtividade, essas técnicas têm sido importantes na seleção e reprodução de animais com características genéticas de interesse, além da diminuição do intervalo entre gerações. Pensando-se na conservação de recursos genéticos animais, essas tecnologias têm permitido a reprodução de animais ameaçados de extinção.

As aplicações da biotecnologia na agropecuária são inúmeras, embora a perspectiva seja de que novas aplicações sejam pesquisadas e desenvolvidas a cada ano. Além do aumento da produtividade dos sistemas agropecuários, essas aplicações são importantes para a busca da sustentabilidade, fazendo com que tais sistemas causem menor impacto ambiental.

Área científica

As aplicações da biotecnologia na pesquisa científica e tecnológica são fantásticas. O desenvolvimento de processos e metodologias de estudo dos microrganismos e mais recentemente as análises do DNA, das proteínas e das rotas metabólicas abriram novas portas para a atuação dos cientistas. Palavras como genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica são cada vez mais comuns nos artigos científicos. Essas metodologias têm permitido os estudos de função e regulação da expressão gênica, análise de processos de transcrição e tradução. Esses estudos têm permitido a prospecção de genes de

interesse em diferentes seres vivos, o estudo de mecanismos envolvidos na resistência de plantas e animais a estresses bióticos e abióticos, o desenvolvimento de técnicas de diagnose molecular de doenças e agentes patogênicos, entre outras inúmeras atividades científicas e pré-tecnológicas.

Considerações finais

É inquestionável que a biotecnologia, incluindo as tecnologias da biotecnologia moderna, é hoje uma das ferramentas de grande importância para propiciar benefícios a diferentes setores da sociedade. No caso da agropecuária, ações de pesquisa e desenvolvimento na área biotecnológica são fundamentais para o desenvolvimento de sistemas mais produtivos e sustentáveis. A evolução da ciência biotecnológica está caminhando a passos largos e pode-se dizer que a biotecnologia moderna ainda é uma criança, considerando todas as potencialidades e o que ainda vai ser descoberto.

Referências

AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL. Disponível em: <http://www.abdi.com.br/?q=node/22, 2009>. Acesso em: 24 jul. 2009.

ANDRADE, S. R. M. **Transformação de plantas.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2003. (Embrapa Cerrados. Documentos, 102). 8 p.

ANDRADE, S. R. M.; FALEIRO, F. G. Biossegurança ambiental. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. **Biotecnologia, transgênicos e biossegurança.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. p. 61-76.

ARAGÃO, F. J. L. Engenharia genética: estado da arte. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. **Biotecnologia, transgênicos e biossegurança.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. p. 31-48.

BARTELS, D.; NELSON, D. Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 17, p. 655-667.

BOREM, A.; MILACH, S. C. K. Plant breeding in the turn of the millennium. **Brazilian archives of biology and techonology**, v. 41, p. 278-283, 1998.

BOREM, A.; ROMANO, E. S.; GROSSI, M. F. **Fluxo gênico e transgênicos.** 2. ed. Viçosa: UFV, 2007. v. 1. 199 p.

BOREM, A.; SANTOS, F. R. **Biotecnologia Simplificada.** 2. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2004. v. 1. 302 p.

BORÉM, A.; VIEIRA, M. L. C.; COLLI, W. **Glossário de biotecnologia**. 2. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2009. 186 p.

BROOKES, G.; BARFOOT, p. GM Crops: The global economic and environmental impact – The first nine years 1996-2004. **AgBioForum**, v. 8, p. 187-196, 2005.

CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA - CIB. Disponível em: <http://www.cib.org.br, 2009>. Acesso em: 29 jul. 2009.

CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY.1992. Disponível em: < http://www.cbd.int/>. Acesso em: 17 out. 2009.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. Biotecnologia e transgênicos. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. **Biotecnologia, transgênicos e biossegurança.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. p. 15-29.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; RESENDE, R. O. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília, DF: Embrapa, 1998, p. 21-43.

FERREIRA, M. E.; FALEIRO, F. G. Biotecnologia: avanços e aplicações no melhoramento genético vegetal. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L. **Savanas:** desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. p. 765-792.

FONTES, E. M. G.; SAMPAIO, M. J. A. *Biossegurança e a agrobiotecnologia do ano 2000*. **Anuário ABRASEM**, Brasília, p. 41-48, 1997.

JOBLING, S. A.; WESTCOTT, R. J.; TAYAL, A.; JEFFCOAT, R.; SCHWALL, G. p. Production of a freeze-thaw-stabel potato starch by antisense inhibition of three starch syntase genes. **Nature Biotechnology,** v. 20, p. 295-299, 2002.

MENEZES, E. L. A. **Controle biológico:** na busca pela sustentabilidade da agricultura brasileira. Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/artigos/artigo_controle_biologico.html>. Acesso em: 24 jul. 2009.

POWELL, P. A.; NELSON, R. C.; DE, B.; HOFFMANN, 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.

SHINTANI, D.; DELLAPENNA, D. Elevating the vitamin E content of plants though metabolic engineering. **Science,** v. 282, p. 2098-2100, 1998.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal.** Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.

VILLEN, R. A. **Biotecnologia:** histórico e tendências. Disponível em <http://www.hottopos.com/regeq10/rafael.htm>. 2009. Acesso em: 24 jul. 2009.

WIKIPÉDIA: a inciclopédia livre. **Biotecnologia**. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Biotecnologia>. 2009. Acesso em: 24 jul. 2009.

YE, X.; AL-BADILI, S.; KLÖTI, A.; ZHANG, J.; LUCCA, P.; BEYER, P.; POTRYKUS, I. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pahtway into (carotenoid-free) Rice endosperm. **Science**, v. 287, p. 303-305, 2000.

Bibliografia complementar

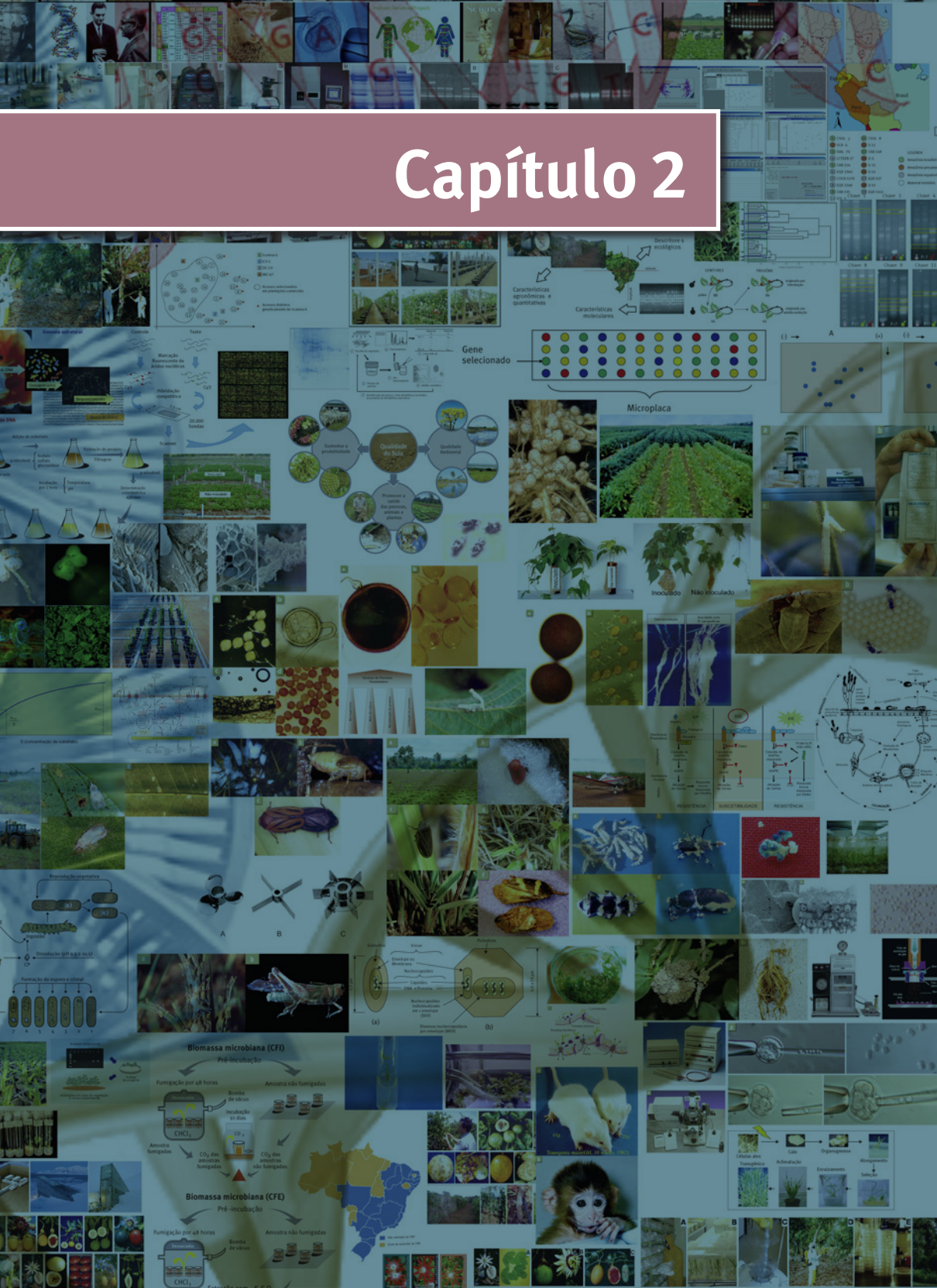
BOREM, A.; GIUDICE, M. P. **Biotecnologia e Meio Ambiente.** 2. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2008. v. 1. 510 p.

BOREM, A.; SANTOS, F. R. **Entendendo a Biotecnologia.** Visconde do Rio Branco: Suprema, 2008. v. 1. 342 p.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. **Biotecnologia, transgênicos e biossegurança.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. 183 p.

SASSON, A. **Plant and Agricultural Biotechnology:** Achievements, Prospects and Perceptions. México: Ciencia y Tecnología, 2006. 444 p.

Capítulo 2


Gene selecionado
Microplaca
Inoculado
Não inoculado
Biomassa microbiana (CFI)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas
Biomassa microbiana (CFE)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas

Princípio científico e análises genéticas utilizando marcadores moleculares

Fábio Gelape Faleiro

Introdução

Nos últimos anos, com os avanços na área da genética e biologia molecular, principalmente com o advento da tecnologia do DNA recombinante, da reação em cadeia da polimerase (PCR) e do sequenciamento automático do DNA, foram desenvolvidas poderosas técnicas para o desenvolvimento de diferentes tipos de marcadores genéticos moleculares. O elevado número de artigos científicos que utilizam tais marcadores no estudo de várias espécies e com as mais variadas aplicações evidencia o impacto dessa tecnologia na pesquisa científica e tecnológica (AYAD et al., 1997; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; FALEIRO, 2007; BORÉM; CAIXETA, 2009).

Marcadores moleculares podem ser definidos como marcadores genéticos baseados na detecção de isoenzimas ou sequências de DNA. Entre as vantagens dos marcadores moleculares, podemos citar a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos; a identificação direta do genótipo sem influência do ambiente; a possibilidade de detecção de tais polimorfismos em qualquer estádio do desenvolvimento da planta ou do animal ou a partir de cultura de células ou tecidos e a possibilidade de gerar maior quantidade de informação genética por loco no caso de marcadores co-dominantes.

Os diferentes tipos de marcadores moleculares têm permitido estudos de evolução, de diversidade genética inter e intraespecífica, de identidade, origem genética e identificação de novos variantes,

gerando informações importantes para subsidiar diferentes ações de pesquisa, principalmente relacionadas a programas de conservação, caracterização e uso de recursos genéticos e programas de melhoramento animal e vegetal.

Neste capítulo, são apresentadas informações gerais sobre o princípio científico e infraestrutura necessária para obtenção de diferentes tipos de marcadores moleculares. As principais análises genéticas utilizando marcadores moleculares também são discutidas e exemplificadas.

Princípio científico dos marcadores moleculares

O princípio da utilização dos marcadores moleculares é baseado no dogma central da biologia molecular e na pressuposição de que diferenças genéticas no DNA significam, na maioria das vezes, diferenças nas proteínas codificadas, as quais em conjunto levam a diferenças no fenótipo (Figura 1).

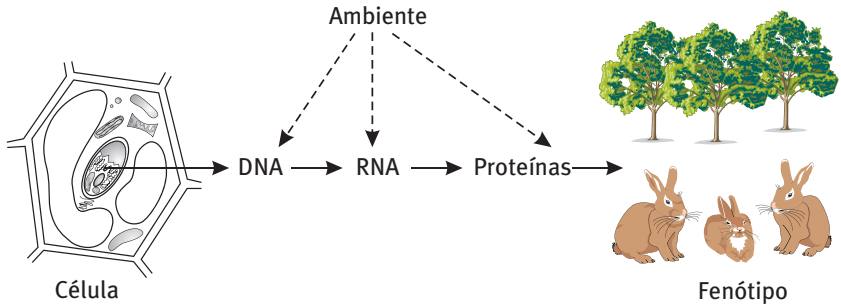


Figura 1. Dogma central da biologia molecular, evidenciando a influência direta do DNA no fenótipo .

Existem vários questionamentos sobre o uso apropriado das várias tecnologias disponíveis, incluindo questões financeiras relacionadas à infraestrutura e material de custeio necessários às metodologias, questões metodológicas de obtenção e análise dos marcadores moleculares considerando os diferentes tipos, questões relacionadas aos recursos humanos com treinamento e experiência e questões relacio-

nadas às aplicações práticas desses marcadores. Tais questões serão discutidas a seguir.

Infraestrutura necessária à obtenção de marcadores moleculares

Para a obtenção de marcadores genéticos moleculares, é necessária uma infraestrutura para realizar as diferentes fases da metodologia, a qual varia de acordo com o tipo de marcador: de um modo geral, são necessários equipamentos de refrigeração para estocagem de reagentes e enzimas, equipamentos para a extração de DNA, amplificação via reação em cadeia da polimerase (PCR), separação por eletroforese, fotodocumentação e análise genética dos marcadores gerados (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998) (Figura 2).

Fotos: Fábio Gelape Faleiro

Figura 2. Equipamentos utilizados na obtenção e análise de marcadores moleculares: (A) centrífugas e banho maria; (B) espectrofotômetro; (C) sistemas para eletroforese; (D) sistema refrigeração; (E) computadores; (F) termocicladores; sistemas para fotodocumentação; e (G) sequenciadores automáticos de DNA (H).

Além do tipo do marcador molecular, a infraestrutura também depende do número de acessos a serem analisados, sendo que equipamentos mais robustos são necessários para análises de grande número de acessos. Normalmente, no início do desenvolvimento das diferentes tecnologias, tanto os equipamentos quanto o material de

custeio são muito caros, contudo, com a concorrência entre as diferentes empresas que fornecem tais materiais, o preço para a montagem de infraestrutura e obtenção de marcadores moleculares vem reduzindo a cada ano.

Para montar uma infraestrutura necessária à obtenção de marcadores moleculares, é importante considerar a demanda de uso de cada equipamento a ser adquirido. É importante considerar que equipamentos robustos com alto custo de manutenção devem ser adquiridos quando existe, no laboratório, uma grande demanda de uso de tal equipamento. Atualmente, existem empresas privadas especializadas em determinados tipos de geração de dados genômicos, como sequenciamento de DNA, testes de paternidade e identidade genética, além de dados de genotipagem. Em determinadas situações, o custo da montagem e manutenção de infraestrutura laboratorial pode ser maior que o custo da contratação de serviços terceirizados. Há uma tendência de diminuição do custo de dados genômicos nos últimos anos, considerando o desenvolvimento de equipamentos mais robustos que permitem a análise de grande quantidade de materiais genéticos ao mesmo tempo e a otimização de metodologias de análises, as quais utilizam menor quantidade de reagentes e suprimentos.

Outro ponto a ser considerado na montagem da infraestrutura laboratorial está relacionado aos tipos de marcadores moleculares e de análises que serão implementadas. Alguns marcadores moleculares, como os isoenzimáticos, exigem uma infraestrutura mais simples, enquanto outros, como aqueles baseados em análises de sequências, exigem estruturas mais complexas, envolvendo sequenciadores automáticos de DNA. De toda forma, considerando a importância da tecnologia para centros de ensino e pesquisa, é desejável que tais instituições tenham uma infraestrutura mínima para extração e amplificação de DNA, separação por eletroforese, além de computadores com acesso à Internet, onde podem ser obtidas informações valiosas em banco de dados genômicos de acesso gratuito.

Diferentes tipos de marcadores moleculares

Existe, atualmente, um grande número de marcadores moleculares. Cada tipo de marcador apresenta vantagens e desvantagens e a utili-

zação de um ou outro vai depender, entre outros fatores, do objetivo do estudo; da infraestrutura disponível; dos recursos financeiros para o investimento; da disponibilidade de recursos humanos com treinamento apropriado; e do nível de conhecimento da genética molecular da espécie a ser estudada (FALEIRO, 2007).

Vários autores, entre eles, Ferreira e Grattapaglia (1998), Faleiro (2007), Caixeta et al. (2009), descrevem com detalhes vários tipos de marcadores moleculares. Na Tabela 1, são apresentadas as principais características dos principais tipos de marcadores moleculares e na Figura 3, são ilustrados alguns deles.

Tabela 1. Diferentes tipos de marcadores moleculares e suas principais características, segundo Faleiro (2007).

Marcador	Conceito / base genética	Expressão genética	Conhecimento prévio de sequência	Principais aplicações
Isoenzimas	Grupo de múltiplas formas moleculares da mesma enzima que ocorre em uma espécie, como resultado da presença de mais de um gene codificando cada uma das enzimas. As diferentes isoenzimas são resultantes de variações alélicas dos genes codificadores	Có-dominante	Não	*Fingerprinting* e diversidade genética
RAPD	Vem do inglês *Random Amplified Polymorphic DNA*, ou seja, DNA polimórfico amplificado ao acaso. São fragmentos de DNA amplificados pela PCR utilizando *primers* curtos (geralmente dez nucleotídeos) de sequência aleatória. Como o *primer* possui sequência aleatória, a sequência alvo da amplificação é desconhecida	Dominante	Não	*Fingerprinting*, diversidade genética, mapeamento genético

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Marcador	Conceito / base genética	Expressão genética	Conhecimento prévio de sequência	Principais aplicações
RFLP	Vem do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*, ou seja, polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição. São fragmentos de DNA obtidos com o uso de enzimas de restrição, separados por eletroforese e visualizados por meio de hibridizações com sondas de sequências homólogas marcadas com radioatividade ou fluorescência	Có-dominante	Sim	Análise filogenética, *fingerprinting*, diversidade genética, mapeamento genético
Microssatélites / SSR /SSLP / STMS	Marcadores microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou SSLP (*Simple Sequence Length Polymorphisms*) ou STMS (*Sequence Tagged Microsatellites*), são sequências do DNA muito curtas (2 a 5 pb) repetidas em tandem (lado a lado), cuja detecção é feita pela PCR, utilizando *primers* específicos	Có-dominante	Sim	Mapeamento genético, *Fingerprinting*, diversidade genética, análise filogenética
AFLP / SFLA /SRLA	Marcador AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) ou SFLA (*Selective Fragment Length Amplification*) ou SRLA (*Selective Restriction Fragment Amplification*) são polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados. São fragmentos de DNA (80 a 500 pb) obtidos com a digestão do DNA com enzimas de restrição, seguida da ligação de oligonucleotídeos adaptadores e amplificação seletiva dos fragmentos via PCR. Este tipo de marcador combina os princípios dos marcadores RAPD (*ver*) e RFLP (*ver*)	Dominante	Não	Mapeamento genético, diversidade genética e *fingerprinting*

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Marcador	Conceito / base genética	Expressão genética	Conhecimento prévio de sequência	Principais aplicações
Minissatélites / VNTRs	Marcadores minissatélites ou VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) são sequências do DNA de 10 a 100 pb repetidas em tandem (lado a lado). O número de repetições de tais sequências em cada região hipervariável pode chegar a 50. As regiões hipervariáveis estão distribuídas por todo genoma, constituindo vários locos nos diferentes cromossomos	Có-dominante / Dominante (no caso de sonda para vários locos)	Sim	*Fingerprinting*, diversidade genética, análise filogenética
CAPS / PCR-RFLP	Vem do inglês *Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*, ou seja, sequência polimórfica amplificada e clivada. São fragmentos de DNA amplificados via PCR, utilizando-se *primers* específicos (20 a 30 pb), seguido da digestão com endonucleases de restrição. É um tipo de marcador genético molecular também conhecido como PCR-RFLP	Có-dominante	Sim	Análise filogenética, *fingerprinting*, diversidade genética, mapeamento genético
SSCP / DGGE / TGGE	Vem do inglês *Single-Strand Conformation Polymorphism*. São fragmentos de DNA de 200 a 800 pb amplificados via PCR usando *primers* específicos, os quais são desnaturados para fita simples e separados por eletroforese. O princípio deste tipo de marcador é que a eletroforese da fita simples do DNA permite a detecção da variação da sequência de nucleotídeos de cada fragmento, responsável por sua estrutura secundária. As técnicas de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) e TGGE (*Thermal Gradient Gel Electrophoresis*) são utilizadas na obtenção destes marcadores.	Có-dominante	Sim	Análise filogenética, *fingerprinting*, diversidade genética

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Marcador	Conceito / base genética	Expressão genética	Conhecimento prévio de sequência	Principais aplicações
ISSR	Vem do inglês *Inter Simple Sequence Repeats*. São fragmentos de DNA de 100 a 3000 pb amplificados via PCR usando um único *primer* (16-20 pb) construído a partir de sequência de microssatélites	Dominante	Não	*Fingerprinting*, diversidade genética, análise filogenética
PCR sequencing	Este tipo de marcador genético molecular envolve a determinação da sequência de nucleotídeos de um fragmento de DNA amplificado via PCR utilizando *primers* específicos (15 a 30 pb) para uma determinada região do genoma em estudo	Sequência de nucleotídeos	Sim	Taxonomia, interespecífica, Análise filogenética
S-SAP	Vem do inglês *Sequence-Specific Amplified Polymorphism*. É um tipo de marcador molecular baseado na detecção de variação em fragmentos de DNA que flanqueiam sítios de inserção de *retrotransposons*. Os fragmentos são amplificados via PCR usando um *primer* desenhado a partir da regiões de terminação conservadas (LTRs - *Long Terminal Repeats*) e outro baseado na presença de um sítio de endonucleases de restrição próximo às LTRs	Có-dominante	Sim	Análise filogenética, mapeamento genético
IRAP	Vem do inglês *Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*. É um tipo de marcador molecular baseado na detecção de variação em sítios de inserção de *retrotransposons*. Fragmentos de DNA são amplificados via PCR usando *primers* desenhados a partir das regiões de terminação conservadas (LTRs - *Long Terminal Repeats*)	Có-dominante	Sim	Análise filogenética, mapeamento genético

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Marcador	Conceito / base genética	Expressão genética	Conhecimento prévio de sequência	Principais aplicações
REMAP	Vem do inglês *Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*. É um tipo de marcador molecular baseado na detecção de variação em sítios de inserção de *retrotransposons*. Fragmentos entre *retrotransposons* e microssatélites são amplificados via PCR usando um *primer* baseado nas regiões de terminação conservadas (LTRs - *Long Terminal Repeats*) e outro baseado em regiões de microssatélites	Có-dominante	Sim	Análise filogenética, mapeamento genético
RBIP	Vem do inglês *Retrotransposon Based Insertional Polymorphism*. É um tipo de marcador molecular amplificado via PCR utilizando *primers* desenhados a partir de *retrotransposon* e suas regiões flanqueadoras. A presença ou ausência da inserção de *retrotransposons* são investigadas com base em duas PCRs: a primeira PCR usando um *primer* desenhado a partir do *retrotransposon* e outro a partir de uma região flanqueadora e a segunda PCR usando *primers* desenhados a partir das duas regiões flanqueadoras	Có-dominante	Sim	Análise filogenética, mapeamento genético

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Marcador	Conceito / base genética	Expressão genética	Conhecimento prévio de sequência	Principais aplicações
Genômica funcional	É um tipo de marcador molecular do DNA utilizado para identificar mutações e polimorfismos baseados em informações de seqüenciamento do DNA para o desenho de *primers* e sondas específicas. Entre estes marcadores, pode-se citar aqueles baseados em seqüencias conservadas de genes de resistência como a NBS (*Nucleotide Binding Site*) e a LRR (*Leucine Rich Repeat*) e aqueles baseados na tecnologia do *chip* de DNA, os quais são baseados na hibridização entre sondas e sequências complementares de *microarrays* (microarranjos) de DNA	Sequência de nucleotídeos	Sim	Diversidade funcional, mapeamento genético, estudos de expressão gênica
SNP	Vem do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*. É um tipo de marcador molecular do DNA utilizado para identificar mutações e polimorfismos baseados na posição de um único nucleotídeo, necessitando de informações de seqüenciamento do DNA para o desenho de *primers* e sondas específicas	Sequência de nucleotídeos	Sim	Diversidade funcional, análise filogenética
DAF	Vem do inglês *DNA Amplification Fingerprinting*. É uma estratégia para detecção de diferenças genéticas entre organismos por meio da amplificação do DNA genômico, utilizando-se um único *primer* de sequência arbitrária	Dominante	Não	*Fingerprinting*, diversidade genética, mapeamento genético
MAAP	Vem do inglês *Multiple Arbitrary Amplicon Profiling*. É um termo coletivo para as técnicas de PCR que utilizam *primers* de sequência arbitrária, como os marcadores RAPD, AFLP, DAF, entre outros	Dominante	Não	*Fingerprinting*, diversidade genética, mapeamento genético

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Marcador	Conceito / base genética	Expressão genética	Conhecimento prévio de sequência	Principais aplicações
DAMD	Vem do inglês *Directed Amplification of Minisatellite-region DNA*. É uma técnica de obtenção de marcadores genéticos moleculares amplificados via PCR usando um único *primer* (16-20 pb) construído a partir de sequência de minissatélites	Dominante	Sim	*Fingerprinting*, diversidade genética, mapeamento genético
SPAR	Vem do inglês *Single Primer Amplification Reaction*, ou seja, reação de amplificação com *primer* único. É uma técnica para obtenção de marcadores genéticos moleculares do DNA por meio da amplificação via PCR usando um único *primer* (16-20 pb) construído a partir de sequência de microssatélites	Dominante	Sim	*Fingerprinting*, diversidade genética, mapeamento genético

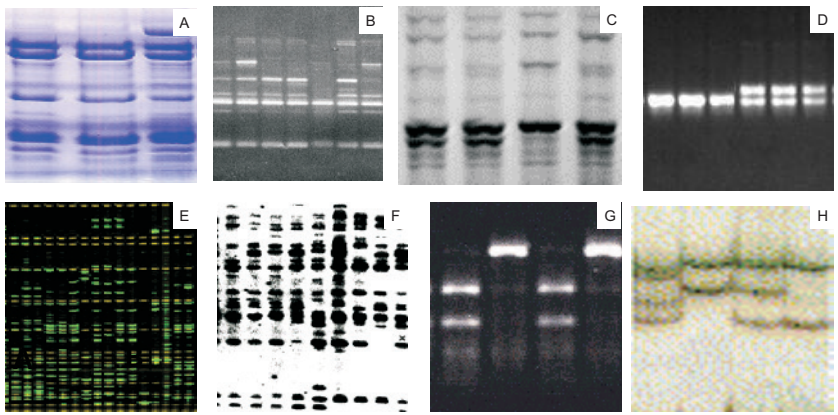


Foto: Fábio Gelape Faleiro.

Figura 3. Polimorfismos dos marcadores moleculares: (A) isoenzimas; (B) RAPD; (C) RFLP; (D) microssatélites; (E) AFLP; (F) minissatélites; (G) CAPS; (H) e SSCP.

Continua...

Análises genéticas com o uso de marcadores moleculares

Embora exista um grande número de marcadores moleculares, o princípio da análise desses marcadores é o mesmo: marcadores comuns aos acessos significam semelhanças e marcadores não comuns significam diferenças genéticas. Os dados sobre semelhanças e diferenças genéticas entre acessos permitem gerar uma grande quantidade de informações sobre a diversidade genética e relacionamentos filogenéticos entre eles. Tais informações geradas pelos marcadores moleculares representam uma amostra considerável do genoma de cada material genético, sem influência do ambiente.

Faleiro (2007) relata alguns passos envolvidos na análise de marcadores moleculares, os quais são descritos a seguir.

O primeiro passo é a codificação dos fragmentos moleculares em dados binários (no caso de marcadores dominantes) ou dados de coincidência alélica (no caso de marcadores co-dominantes). Os dados para marcadores dominantes normalmente são codificados como 1 (presença do marcador) e 0 (ausência do marcador). Os dados para marcadores co-dominantes normalmente são codificados como 0 (ausência de alelos comuns no loco), ½ (um alelo comum no loco) e 1 (os dois alelos comuns no loco). No caso de marcadores baseados na sequência de nucleotídeos, a codificação é a própria sequência de nucleotídeos, representados pelas quatro diferentes bases nitrogenadas do DNA (Adenina, Timina, Citosina e Guanina).

O segundo passo é utilizar os dados codificados para a estimativa de índices de similaridade ou de distância genética entre cada par de materiais genéticos. Existem vários índices descritos na literatura, como o índice de similaridade de Nei e Li (1979), Sneath e Sokal (1973), Gower (1971) também citado como coeficiente de similaridade de Jaccard, entre outros. Normalmente, os coeficientes de correlação entre os diferentes índices são muito altos (CORRÊA et al., 1999), embora existam algumas diferenças importantes entre eles (DIAS, 1998). No caso de marcadores baseados na sequência de nucleotídeos de um determinado fragmento de DNA, os índices de similaridade

ou de distância são calculados com base na homologia de sequência (KIMURA, 1980).

Com base nos índices, estabelece-se uma matriz de similaridade ou de distâncias entre os acessos, a qual vai servir de base para as análises de agrupamento e de dispersão dos acessos. As análises de agrupamento normalmente são baseadas em métodos hierárquicos, os quais podem utilizar diferentes critérios de agrupamento: vizinho mais próximo (*single linkage*); vizinho mais distante (*complete linkage*); e baseado na média das distâncias (*unweighted pair-group method using arithmetic average*). Dias (1998) descreve a aplicação de cada um desses critérios discutindo sobre as vantagens e desvantagens de cada um. No caso da análise de dispersão dos acessos, o método mais utilizado é aquele baseado em escalas multidimensionais por meio das coordenadas principais. Esse método tem sido denominado análise de coordenadas principais (*PCDA – principal coordinates analysis*) (GOWER, 1966) e também é discutido por Dias (1998). Na Figura 4, observam-se as etapas e os procedimentos mais utilizados para as análises de marcadores genéticos moleculares.

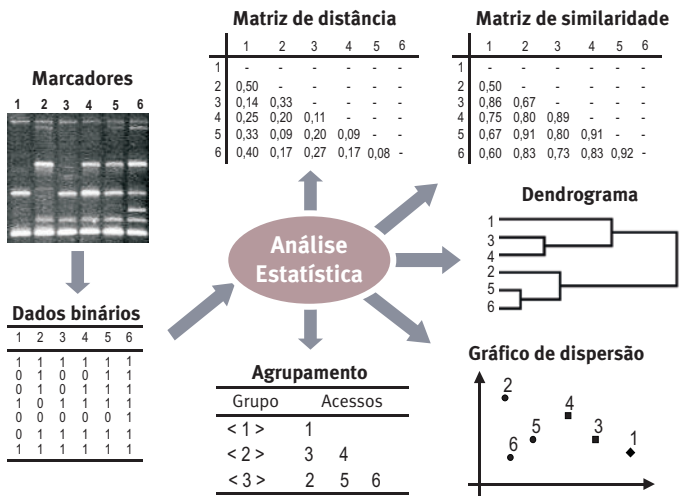


Figura 4. Etapas e os procedimentos mais utilizados para as análises de marcadores genéticos moleculares.

Fonte: Faleiro (2007).

Os métodos analíticos e a interpretação dos dados moleculares com relação à genética de populações, filogenia, evolução e suas diferentes aplicações exigem procedimentos de análise multivariada e dependem do tipo do marcador molecular que está sendo utilizado e do objetivo do trabalho (AVISE, 1993; HARTL; CLARK, 1989).

Com relação ao tipo de marcador, é importante diferenciar aqueles que fornecem dados a partir de um único loco (por exemplo: *PCR/DNA sequencing*) daqueles que fornecem dados multilocos obtidos de múltiplas regiões gênicas (por exemplo: RAPD, AFLP, Minissatélites). Essa diferenciação é importante porque a quantidade da informação acessada influencia as interpretações dos dados. Outra diferenciação importante são os dados gerados por marcadores dominantes (por exemplo: RAPD, AFLP) e por marcadores co-dominantes (por exemplo: RFLP, microssatélites). Marcadores co-dominantes fornecem informações valiosas sobre número e frequência alélica em determinado loco de uma população ou grupo de indivíduos, além da porcentagem de heterozigosidade dos locos de cada indivíduo analisado.

Com relação ao objetivo do trabalho, marcadores moleculares mais apropriados podem ser preferencialmente utilizados de acordo com o objetivo do estudo (AVISE, 1993). De um modo geral, marcadores moleculares multilocos utilizados em DNA *fingerprinting* (por exemplo: RAPD, AFLP, Microssatélites, Minissatélites) são mais apropriados para estudos de identidade genética, testes de paternidade e estudos de variabilidade dentro da mesma espécie. Marcadores baseados em comprimentos de fragmentos de restrição como os RFLPs obtidos de mtDNA, cpDNA, rDNA são mais apropriados para estudos de diversidade genética de espécies fortemente relacionadas. Marcadores baseados em análises de sequências (por exemplo: *PCR sequencing*) são apropriados para análises de espécies com alto nível de divergência evolucionária, embora possam ser utilizados para análises de espécies ou acessos com qualquer nível de divergência evolucionária (FALEIRO, 2007).

A flexibilidade dos marcadores *PCR sequencing* para estudos em diferentes níveis de divergência evolucionária deve-se à existência de diferentes genes ou regiões gênicas com diferentes taxas de substituição de nucleotídeos (AVISE, 1993), de modo que, dependendo do

nível de divergência evolucionária que se deseja investigar, genes ou sequências de regiões gênicas mais apropriadas podem ser escolhidas para a realização do estudo.

A análise dessas sequências para estudos filogenéticos é baseada na homologia de sequências de diferentes indivíduos, populações, espécies, gêneros etc. Os resultados de tais análises podem gerar matrizes de distâncias e suas variações estatísticas (Figura 4) ou permitir a realização de algoritmos de análise filogenética baseados no princípio de agrupamento de Hennigian (AVISE, 1993) ou em análises de parcimônia, como a parcimônia de Wagner (FARRIS, 1970), de Camin-Sokal (CAMIN; SOKAL, 1965) e a parcimônia generalizada (SWOFFORD; OLSEN, 1990). Arriel et al. (2009) fazem uma ótima revisão sobre métodos de análise filogenética utilizando marcadores moleculares.

Os diferentes procedimentos estatísticos permitem que a reconstrução filogenética possa ser realizada utilizando construções gráficas baseadas em unidades de distância genética ou em unidades de tempo (Figura 5). Unidades de tempo permitem, por exemplo, importantes estudos sobre a evolução de um determinado grupo de espécies ou gêneros relacionados.

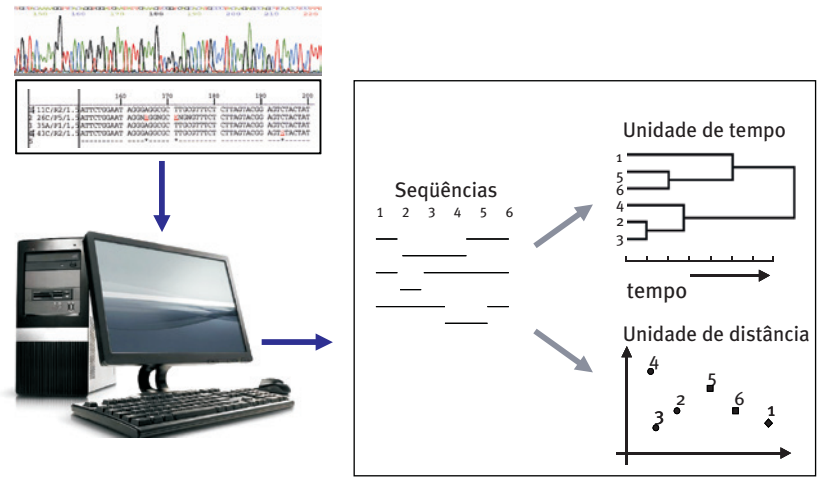


Figura 5. Ilustração de análises genéticas utilizando como input sequências de regiões genômicas, gerando como output construções gráficas de agrupamento baseadas em unidades de tempo e distância genética.

A análise em unidades de tempo pode ser baseada, por exemplo, na porcentagem de substituição de nucleotídeos em uma determinada sequência, comparando-se diferentes indivíduos, populações, espécies, gêneros etc. Neste caso, os marcadores moleculares baseados em análises de sequências são mais apropriados, entretanto existem metodologias para estimar a diversidade nucleotidica a partir de marcadores moleculares baseados na PCR, como os RAPD (CLARK; LANIGAN, 1993). A metodologia descrita por Clark e Lanigan (1993) usa a frequência de indivíduos com ausência de um fragmento para estimar a frequência de homozigotos recessivos e assim a frequência gênica e a diversidade nucleotídica. Tal metodologia foi utilizada com sucesso por Carvalho e Schaal (2001). A ajuda computacional para a realização dessas análises também é essencial, considerando-se a grande quantidade de dados moleculares.

Outro tipo de análise muito comum em trabalhos científicos que utilizam marcadores moleculares são aquelas baseadas na co-segregação das marcas moleculares (CRUZ; SILVA, 2009) e sua associação com características de interesse econômico (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 2009). Esse tipo de análise é muito utilizado em trabalhos de mapeamento genético ou construção de mapas de ligação (SCHUSTER; CRUZ, 2004). A localização de genes e regiões genômicas que controlam características de interesse tem sido feita com sucesso com o auxílio de marcadores moleculares organizados em grupos de ligação, os quais são construídos com base nas análises de co-segregação. Mapas genéticos baseados em marcadores moleculares possibilitam a localização de genes relacionados a características qualitativas, bem como a contagem aproximada dos principais locos envolvidos no controle de características quantitativas, estimando a magnitude do efeito destes locos no fenótipo de interesse (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 2009; CRUZ et al., 2009a; 2009b). O princípio das análises de co-segregação de marcadores moleculares e características de interesse econômico são ilustrados na Figura 6.

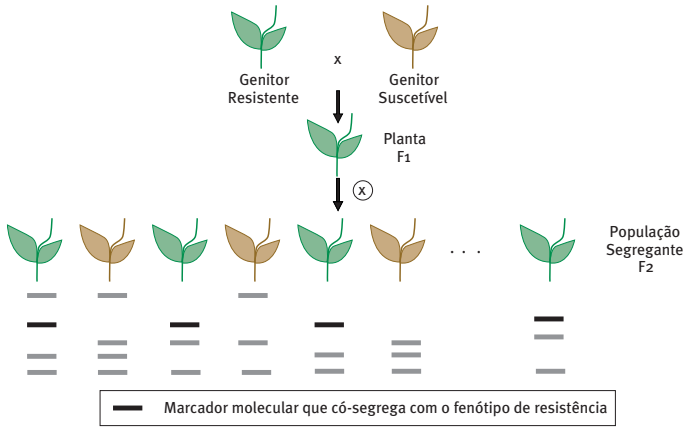


Figura 6. Princípio da análise de co-segregação de marcadores moleculares e características de interesse econômico.

Bioinformática e marcadores moleculares

A realização de análises genéticas utilizando marcadores moleculares seria praticamente impossível sem a ajuda computacional, principalmente quando vários acessos são analisados simultaneamente. Da união da ciência computacional com a matemática e a biologia surgiu a bioinformática. Numa definição abrangente, a bioinformática é tida como o estudo e a aplicação de técnicas computacionais e matemáticas à geração e gerenciamento de informações biológicas, em especial, da biologia molecular. De maneira geral, a bioinformática pode combinar informações de química, física, biologia, ciência da computação e matemática/estatística para processar dados biológicos.

Apesar do grande avanço obtido até os dias de hoje, a rapidez com que surgem novas técnicas da biologia molecular e o gigantesco volume de dados e informações produzidos pelos projetos nessa área exigem que a bioinformática esteja em constante evolução. O desenvolvimento de ferramentas de bioinformática para a organização de bancos de dados, respectivas análises e modelagem, a adaptação de ferramentas de bioinformática para o desenvolvimento de protocolos para apoio a programas de conservação, caracterização e uso de ger-

moplasma e de melhoramento genético são importantes demandas para a pesquisa (FALEIRO et al., 2009).

Existem vários softwares disponíveis para a análise de marcadores moleculares, entre eles o Genes (CRUZ, 1997); o Statistica (STATSOFT, 1999); o NTSYS (ROHLF, 1992); o GQMOL (CRUZ; SCHUSTER, 2000); o SPSS (NORUSIS, 1993); o SAS (SAS, 1989); Mapmaker (LANDER et al., 1987; LINCOLN et al., 1992); Joinmap (VAN OOIJEN; VOORRIPS, 2001); Jump (SAS, 1989); QTL Cartographer (BASTEN et al., 1994; BASTEN et al., 1999), entre outros. Na Figura 7, estão ilustradas algumas das interfaces desses softwares.

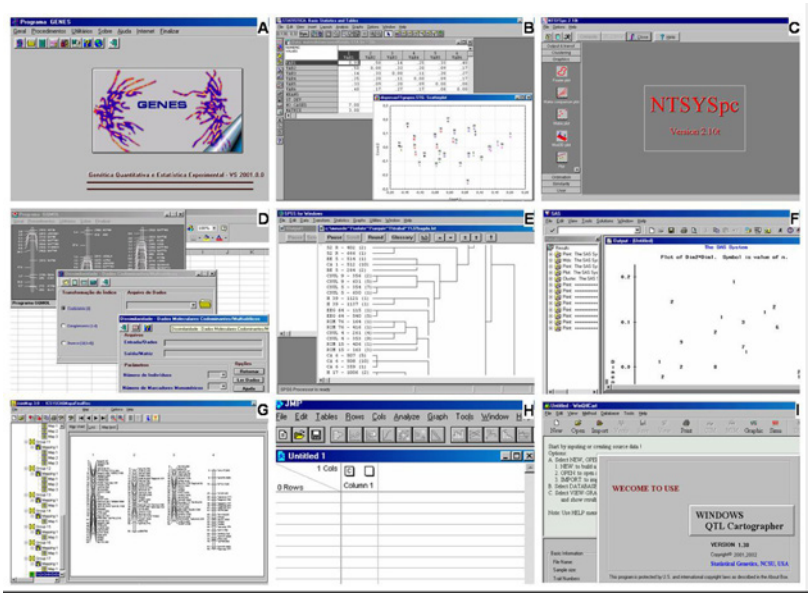


Figura 7. Interface de alguns softwares utilizados para a análise genética utilizando marcadores moleculares: (A) Genes; (B) Statistica; (C) NTSYS; (D) GQMOL; (E) SPSS; (F) SAS; (G) Joinmap; (H) Jump; (I) QTL Cartographer.

As diferenças entre os vários softwares disponíveis estão relacionadas aos procedimentos e abrangência das análises; aos formatos dos arquivos utilizados como entrada de dados; à robustez e linguagem de programação; e à qualidade gráfica dos resultados ou saída dos dados, bem como à facilidade ou não da utilização dos procedimentos de análises disponíveis na interface com o usuário.

Embora a utilização de cada software seja considerada difícil para os iniciantes, a maioria dos manuais ou sistemas de ajuda são didáticos e contêm exemplos de cada procedimento de análise, facilitando, dessa forma, sua utilização. De toda forma, o conhecimento básico da genética mendeliana, molecular e quantitativa é fundamental para a correta interpretação dos dados gerados pelos diferentes tipos de marcadores moleculares.

Considerações finais

O desenvolvimento de técnicas de obtenção de marcadores moleculares tem sido fascinante. Várias técnicas de biologia e genética molecular estão disponíveis para obtenção de vários tipos de marcadores moleculares e, a cada ano, surgem novas. Algumas técnicas são mais robustas possibilitando a obtenção de grande quantidade de polimorfismos genéticos em curto espaço de tempo e outras são mais simples demandando uma infraestrutura básica e baixa quantidade de reagentes e suprimentos.

Paralelamente ao desenvolvimento das técnicas de obtenção, grandes avanços têm sido obtidos na área da bioinformática, possibilitando diferentes tipos de análises genéticas cada vez mais acuradas e precisas, dando subsídios para diferentes aplicações práticas dos marcadores moleculares em estudos genéticos e como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal e animal.

Referências

ARRIEL, N. H. C.; COSTA, M. M.; TREVISOLI, S. H. U.; DI MAURO, A. O. Outras aplicações dos marcadores moleculares. In: BOREM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: Editora Folha de Viçosa, 2009. p. 209-274.

AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution.** New York: Chapman & Hall, 1993. 511 p.

AYAD, W. G.; HODGKIN, T.; JARADAT, A.; RAO, V. R. (Ed.). **Molecular genetic techniques for plant genetic resources.** Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1997. 137 p.

BASTEN, C. J.; WEIR, B. S.; ZENG, Z. B. Zmap-a QTL cartographer. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5., 1994, Guelph. **Proceedings...** Guelph: University of Guelph, 1994. p. 65-66.

BASTEN, C. J.; WEIR, B. S.; E ZENG, Z. B. **QTL cartographer, Version 1.13.** Raleigh, NC: North Caroline State University, Departament of Statistics, 1999.

BOREM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares.** Viçosa, MG: Editora Folha de Viçosa, 2009. 532 p.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BOREM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares.** Viçosa, MG: Editora Folha de Viçosa, 2009. p. 11-94.

CAMIN, J. H.; SOKAL, R. R. A method for deducing branching sequences in phylogeny. **Evolution,** Lancaster, v. 19, p. 311-326, 1965.

CARVALHO, L. J. C. B.; SCHAAL, B. A. Assessing genetic diversity in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm collection in Brazil using PCR-based markers. **Euphytica,** Wageningen, v. 120, p. 133-142, 2001.

CLARK, A. G.; LANIGAN, C. M. S. Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. **Molecular Biology and Evolution,** Chicago, v. 10, p. 1096-1111, 1993.

CORRÊA, R. X.; ABDELNOOR, R. V.; FALEIRO, F. G.; CRUZ, C. D.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Genetic distances in soybean based on RAPD markers. **Bragantia**, Campinas, v. 58, p. 15-22, 1999.

CRUZ, C. D. **Programa Genes:** aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: UFV, 1997. 648 p.

CRUZ, C. D.; BHERING, L. L.; GOD, P. I. V. G. Mapeamento de QTLs em populações derivadas de cruzamentos controlados. In: BOREM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares.** Viçosa, MG: Editora Folha de Viçosa, 2009a. p. 485-532.

CRUZ, C. D.; GOD, P. I. V. G.; BHERING, L. L. Mapeamento de QTLs em populações exogâmicas. In: BOREM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares.** Viçosa, MG: Editora Folha de Viçosa, 2009b. p. 443-482.

CRUZ, C. D.; SCHUSTER, I. **Programa GQMOL:** genética quantitativa e molecular. Viçosa, MG: UFV, 2000. Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>. Acesso em: 10 nov. 2009

CRUZ, C. D.; SILVA, L. C. Análise de marcadores moleculares. In: BOREM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares.** Viçosa, MG: Editora Folha de Viçosa, 2009. p. 361-442.

DIAS, L. A. S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins.** Viçosa, MG: UFV, 1998. p. 405-475.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FALEIRO, F. G.; REIS JÚNIOR, F. B.; FRAGOSO, R. R.; CORDEIRO, M. C. R.; PINTO, J. F. N.; OLIVEIRA, F. Biotecnologia, transgênicos e biossegurança: demandas para a pesquisa. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L. **Savanas:** demandas para a pesquisa. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009.

FARRIS, J. S. Methods for computing Wagner trees. **Systematic Zoology,** v. 19, p. 83-92, 1970.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Genética de associação em plantas.** In: BOREM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). Marcadores moleculares. Viçosa, MG: Editora Folha de Viçosa, 2009. p. 327-370.

GOWER, J. C. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. **Biometrika**, London, v. 53, p. 325-338, 1966.

GOWER, J. C. A general coefficiente of similarity and some of its properties. **Biometrics**, Washington, v. 27, p. 857-874, 1971.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics.** 2. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1989. 682 p.

KIMURA, M. A. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution,** London, v. 16, p. 111-120, 1980.

LANDER, E.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLON, A.; DALEY, M.; LINCOLN, S.; NEWBURG, L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkages maps of experimental and natural populations. **Genomics**, v. 1, p. 174-181, 1987.

LINCOLN, S.; DALY, M.; LANDER, E. **Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP 3.0.** 3. ed. [s. I.]: Whitehead Institute, Technical Report, 1992.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variations in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v. 76, p. 5269-5273, 1979.

NORUSIS, M. J. **SPSS for Windows, Advanced Statistics**, Release 6.0. Chicago: SPSS Inc., 1993.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc.** Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.70. New York: Exeter Software, 1992. 217 p.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT user´s guide.** Version 6. 4. ed. North Caroline: SAS Institute, 1989. 846 p.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados.** Viçosa, MG: UFV, 2004. 568 p.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**. San Francisco: Freeman and Company, 1973. 573 p.

STATSOFT INC. **Statistica for Windows [Computer program manual].** Tulsa: StatSoft Inc., 1999. Disponível em: <http://www.statsoft.com>. Acesso em: 10 out. 2009.

SWOFFORD, D. L.; OLSEN, G. L. Phylogeny reconstruction. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C. (Ed.). **Molecular systematics.** Sunderland: Sinauer Associates, 1990. p. 411-501.

VAN OOIJEN, J. W.; VOORRIPS, R. E. **JoinMap® Version 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps.** Wageningen: Plant Research International, 2001. 51 p.

Bibliografia complementar

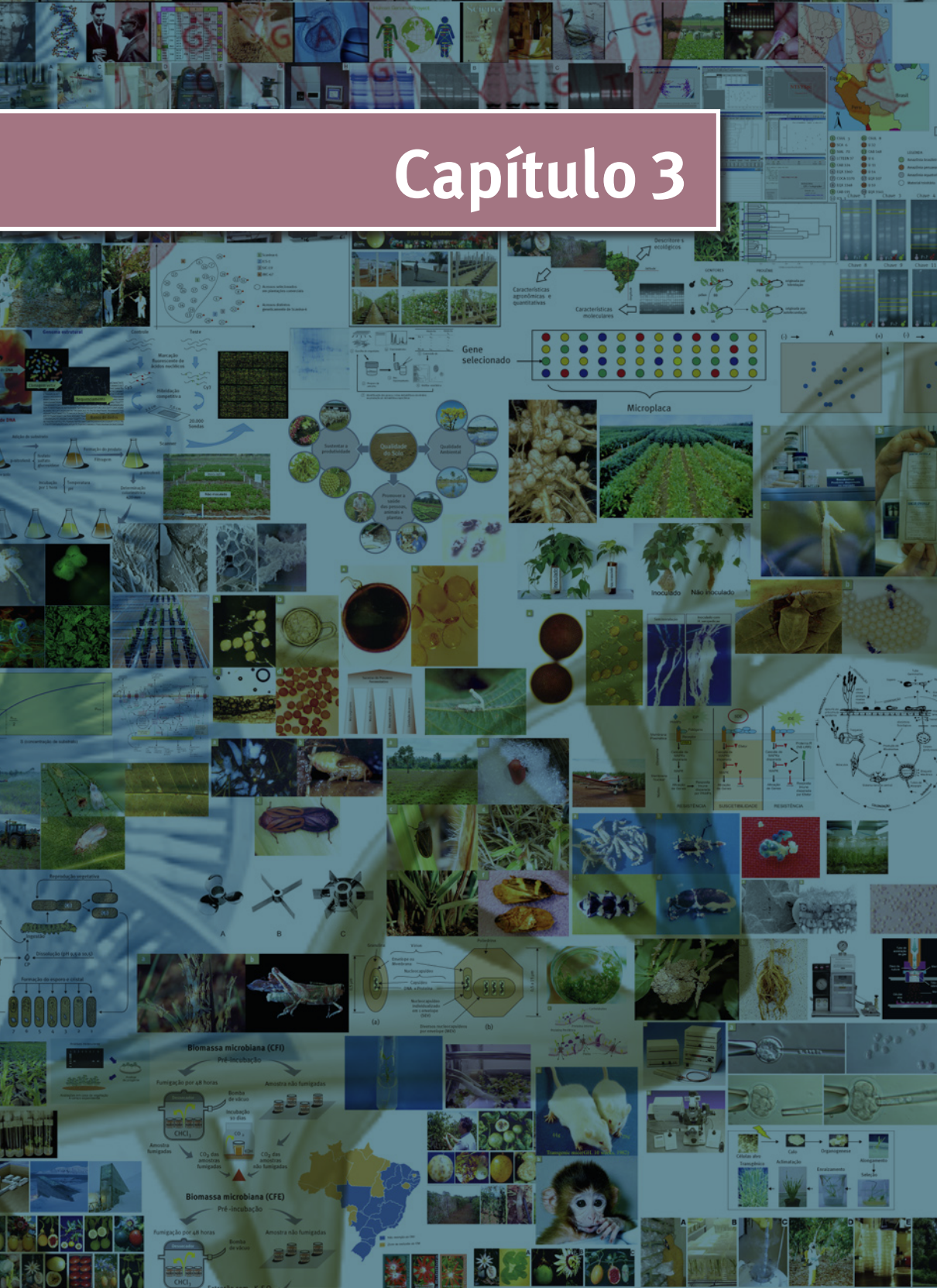
BOREM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares.** Viçosa, MG: Editora Folha de Viçosa, 2009. 532 p.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados.** Viçosa, MG: UFV, 2004. 568 p.

Capítulo 3


Gene selecionado
Microplaca
Inoculado
Não inoculado
Biomassa microbiana (CFI)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas
Biomassa microbiana (CFE)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas

Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal

Fábio Gelape Faleiro

Introdução

Os marcadores moleculares permitem gerar uma grande quantidade de informações sobre identidade genética, diversidade, frequência gênica, relacionamentos filogenéticos, mapeamento genético, seleção assistida, entre outras. Essas informações são extremamente úteis em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético.

As informações moleculares podem complementar as informações ecológicas, morfológicas e agronômicas dos recursos genéticos, contribuindo para aumentar a eficiência dos processos de coleta; direcionar o enriquecimento da base genética; formar e validar coleções nucleares e de trabalho; analisar a diversidade e a pureza genética; identificar acessos duplicados e redundantes; auxiliar trabalhos de classificação botânica e filogenia e subsidiar a seleção de genitores, o planejamento dos cruzamentos e a seleção de genótipos com características desejadas em programas de melhoramento genético.

Dessa forma, pode-se dizer que os marcadores moleculares são ferramentas poderosas na geração de informações úteis em diferentes etapas, desde a coleta, caracterização e uso de recursos genéticos, passando por atividades de pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento. Vários autores têm discutido as aplicações práticas dos marcadores moleculares em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma (AYAD et al., 1997; FALEIRO,

2007; FALEIRO et al., 2008) e em programas de melhoramento envolvendo as atividades de pré e pós-melhoramento (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; PINTO et al., 2007; FALEIRO et al., 2008; PEREIRA et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2009; SCHUSTER et al., 2009).

Na Figura 1, são apresentadas as principais aplicações dos marcadores moleculares em uma ordem cronológica, subsidiando diferentes atividades desde a coleta de recursos genéticos até a caracterização molecular de variedades melhoradas e sua utilização na proteção da propriedade intelectual. Essas aplicações serão discutidas e exemplificadas neste capítulo.

Figura 1. Principais aplicações práticas dos marcadores moleculares em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e programas de melhoramento genético envolvendo atividades de pré e pós-melhoramento.

Análise da distribuição geográfica da variabilidade genética

O princípio dessa aplicação dos marcadores moleculares é confrontar a variabilidade genética molecular com a distribuição geográfica de vários acessos do germoplasma. Para a análise da distribuição geográfica, informações de latitude e longitude do local de coleta de cada acesso podem ser plotadas conjuntamente com mapas do Sistema de Informação Geográfica (SIG) (BRASIL, 1981) com o auxílio do programa ArcView GIS (www.esri.com) (COSTA, 2004). Dessa forma, descritores ecológicos do local de coleta de cada acesso, como o tipo de vegetação, tipo de solo, estado, município, bacia hidrográfica, pluviometria média, entre outros, podem ser obtidos. Na Figura 2, ilustra-se a distribuição geográfica de acessos de *Stylosanthes macrocephala* salientando regiões onde foram coletados acessos com maior diversidade genética entre si, segundo dados de Costa et al. (2005).

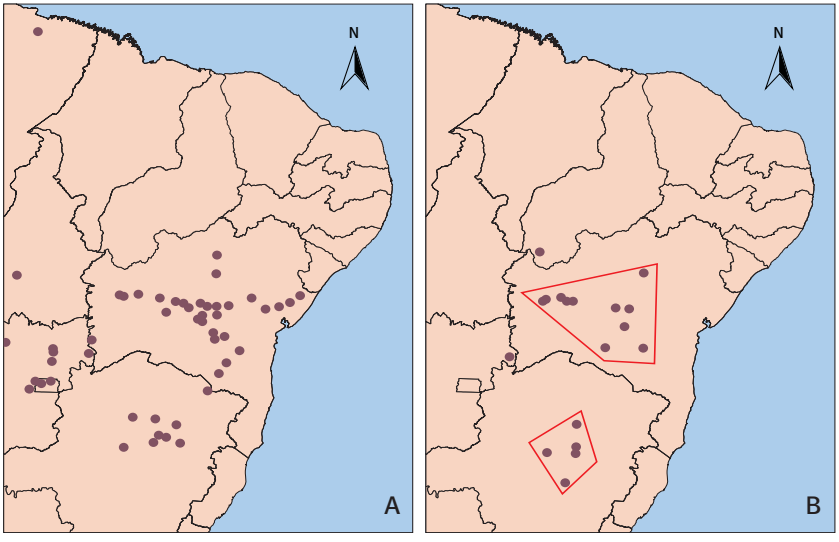


Figura 2. Distribuição geográfica de acessos de *Stylosanthes macrocephala* (A), salientando as áreas (B) onde foram coletados acessos com maior diversidade genética entre si calculada com base em marcadores moleculares RAPD.

Fonte: Costa (2004).

Marcadores moleculares associados a sistemas de informação geográfica têm permitido estudos da diversidade genética de acessos por regiões, identificação de regiões de maior ou menor diversidade (OLSEN; SCHAAL, 1999; CARVALHO et al., 2000a; COSTA et al., 2005) e a recuperação de informações importantes sobre as condições ambientais e biológicas dos locais de coleta de cada acesso (GREENE et al., 1999; GUARINO et al., 2002). Essas informações são complementares aos dados fenotípicos e geográficos e têm orientado a escolha de locais para conservação in situ, atividades de coleta para conservação ex situ e a busca de combinações gênicas de interesse para programas de melhoramento genético (RICK et al., 1974; ZIMMERER; DOUCHES, 1991; HUANG et al., 1998; COSTA, 2004; FALEIRO et al., 2004a).

Estratégias de amostragem para coleta de recursos genéticos

A coleta de recursos genéticos é uma etapa básica e de extrema importância para os programas de conservação e uso de recursos genéticos realizada por meio de expedições, com o objetivo de resgatar plantas ou populações de plantas de interesse. Normalmente, em uma expedição, plantas são resgatadas por meio de sementes e (ou) mudas e, geralmente, procura-se amostrar eficientemente a diversidade genética existente. A escolha inadequada dos locais de coleta pode fazer com que não haja uma boa representatividade da variabilidade genética que precisa ser conservada e utilizada.

Na Figura 3, ilustra-se um estudo sobre a diversidade genética de acessos de cacaueiro coletados nas regiões amazônicas do Brasil, Peru e Equador (FALEIRO et al., 2004a), mostrando a formação de grupos contendo materiais de diferentes origens amazônicas, não evidenciando uma regionalização clara da variabilidade genética. Esta não regionalização, na verdade, é explicada pela alta variabilidade genética dos materiais utilizados no presente estudo, confirmando a importância da região amazônica para missões de coleta de recursos genéticos visando à ampliação da base genética de programas de melhoramento do cacaueiro.

Estudos da diversidade genética molecular de acessos ou populações em diferentes regiões podem fornecer informações importantes sobre estratégias de amostragem para realização de eficientes trabalhos de coleta (número de acessos, tamanho de cada população, análise quantitativa e qualitativa das regiões onde serão feitas as coletas, etc.) (LAMBOY et al., 1994; 1996; CESKA et al., 1997; ZORO BI et al., 1998; NEBAUER et al., 1999).

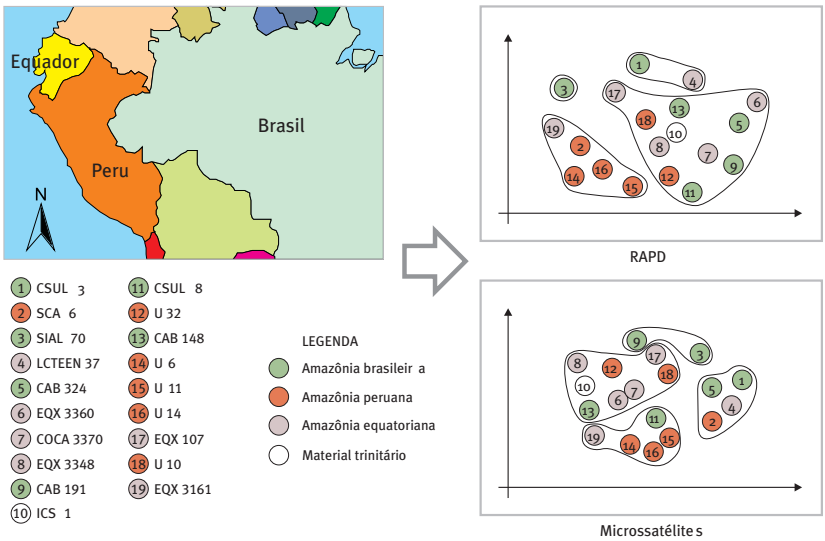


Figura 3. Dispersão gráfica e análise de agrupamento de 19 acessos de cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) provenientes das amazônias brasileira, peruana e equatoriana com base em distâncias genéticas calculadas a partir de marcadores RAPD (A) e microssatélites (B).

Análises de acessos duplicados ou redundantes

Em coleções base de trabalho e bancos ativos de germoplasma, a presença de acessos duplicados ou redundantes, em conjunto com problemas de sinonímia, homonímia e erros de identificação, dificulta a transferência de resultados e recomendações entre diferentes programas de melhoramento e aumenta o gasto de tempo e recursos para a conservação e avaliação do potencial genético dos acessos. Esses pro-

blemas são agravados em bancos de germoplasma de acessos mantidos in vivo em espaços nobres como telados antiafídeos – onde o custo de construção do espaço e a manutenção do acesso são muito altos (Figura 4) – e em bancos de germoplasma de plantas perenes mantidas em condições de campo em áreas extensas – que implicam em árduo trabalho nas atividades de manutenção e avaliação (Figura 5).

Marcadores moleculares têm sido utilizados para eliminar ou diminuir tais problemas, sendo exemplos a análise de acessos duplicados ou redundantes em bancos ativos e coleções de trabalho de cacaueiro (FALEIRO et al., 2002); amendoim forrageiro (FALEIRO et al., 2003a); alface (WAYCOTT; FORT, 1994); cevada (HINTUM; VISSER, 1995); arroz (VIRK et al., 1995); couve-flor (HINTUM et al., 1996); uva (CERVERA et al., 1998); mandioca (CHAVARRIAGA-AGUIRRE et al., 1999); sorgo (DEAN et al., 1999); batata (MCGREGOR et al., 2002); entre outras culturas.

Figura 4. Banco de germoplasma de acessos de maracujazeiro mantidos sob telado antiafídeo, Embrapa Cerrados, Planaltina, DF .

Figura 5. Realização de tratos culturais em banco ativo de germoplasma de cacaueiro, Centro de Pesquisas do Cacau, Itabuna, BA .

Análise de pureza genética e contaminação de germoplasma

Acessos, principalmente de espécies autógamas, normalmente são representados em bancos de germoplasma por várias sementes. Análise da pureza genética dessas sementes pode ser feita utilizando marcadores moleculares (TANKSLEY; JONES, 1981; TREUREN; HINTUM 2001). O princípio dessa aplicação é estimar o parentesco genético entre as sementes com base na similaridade genética calculada a partir dos marcadores moleculares. É possível, por exemplo, quantificar taxas de polinização cruzada (FERREIRA et al., 2000) e verificar contaminações genéticas em amostras de sementes de um determinado acesso (STEINER et al., 1997; BORNER et al., 2000). Na Figura 6, ilustra-se a detecção de contaminação genética de sementes do acesso CPAC 2251 de *Stylosanthes macrocephala* com base em análises de marcadores moleculares (COSTA, 2004). Essa detecção é

baseada na diferença genética da planta 11 em relação às demais, a qual não seria esperada dentro do acesso.

A estabilidade genética de uma determinada coleção de germoplasma também pode ser analisada com base em marcadores moleculares (ISABEL et al., 1993; WU et al., 1998; GOTO et al., 1998; BORNER et al., 2000). A manutenção da integridade e da estabilidade genética dos recursos genéticos é um dos principais objetivos dos programas de conservação. A perda da estabilidade genética é devido a mudanças nas frequências gênicas, as quais podem ocorrer devido à seleção, mutação, erosão genética e migração/contaminação. No caso de coleções de germoplasma, a erosão genética e os processos de contaminação, normalmente decorrentes dos ciclos de rejuvenescimento para a recuperação da viabilidade das sementes, são as principais causas da perda da estabilidade genética. Marcadores moleculares podem auxiliar o acompanhamento da estabilidade genética de acessos ao longo do tempo em diferentes condições de armazenamento ou após períodos de regeneração (REEDY et al., 1995; WU et al., 1998; PARZIES et al., 2000) e, dessa forma, subsidiar as melhores estratégias de manutenção e manejo dos acessos no banco de germoplasma. A perda da estabilidade genética de um grupo de acessos em uma determinada condição de armazenamento pode subsidiar a não-utilização ou ajustes da referida condição. A perda da estabilidade após um período de ciclos de rejuvenescimento pode subsidiar a melhoria do processo de modo a evitar ou diminuir o problema.

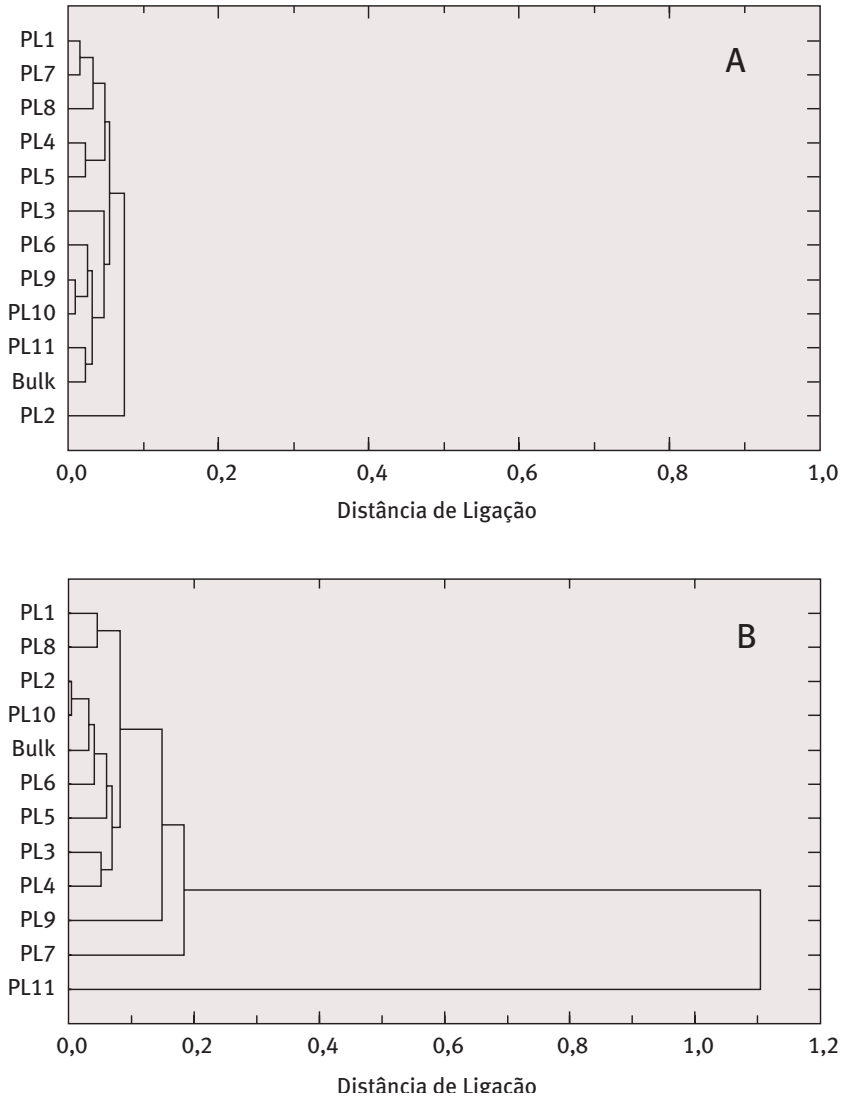


Figura 6. (A) Análises de agrupamento de plantas do acessos CPAC 1043 e (B) CPAC 2251 de *Stylosanthes macrocephala*, evidenciando a contaminação de sementes do CPAC 2251 .

Fonte: Costa (2004).

Análise da diversidade genética e frequência gênica populacional

Os diferentes tipos de marcadores moleculares disponíveis apresentam a capacidade de analisar de forma ampla genomas de interesse, sem influência do ambiente, e, dessa forma, gerar informações precisas sobre a diversidade genética e a frequência gênica populacional (HARTL; CLARK, 1989; OUBORG et al., 1999). Essas informações são extremamente úteis em todas as fases dos programas de conservação de recursos genéticos, passando pela coleta (DEL RIO et al., 1997a), conservação (WU et al., 1998), manutenção (SPAGNOLETTI-ZEULI et al., 1995; REEDY et al., 1995) e manejo (DEL RIO et al., 1997b) das coleções, além de facilitar o uso do germoplasma em programas de melhoramento genético (ABDELNOOR et al., 1995; BELLON et al., 2007; BELLON et al., 2009; KARP et al., 1997; FALEIRO et al., 2004b; 2004c; 2009).

Um exemplo da importância dos estudos de diversidade genética e frequência gênica populacional utilizando marcadores moleculares é o trabalho realizado no Centro de Pesquisas do Cacau. Desde 1993, um trabalho de identificação e seleção de plantas resistentes à vassoura-de-bruxa e com boas características de produtividade está sendo realizado em plantações comerciais da região cacaueira baiana, com a valiosa ajuda dos produtores (Figura 7). Diferentes critérios vêm sendo utilizados para a seleção dos acessos de cacaueiro em plantações comerciais, os quais visam atingir dois requisitos básicos: produtividade e resistência à vassoura-de-bruxa (PINTO; PIRES, 1998). Além dessas duas características principais, o processo de seleção busca acessos de cacaueiro com alta diversidade genética entre si e, também, geneticamente distintos das tradicionais fontes de resistência à vassoura-de-bruxa, como o Scavina-6 (FALEIRO et al., 2004d). Nesse sentido, Faleiro et al. (2004e) realizaram um estudo da diversidade genética desses acessos selecionados em relação ao Scavina-6, identificando acessos de extrema importância para uso em programas de melhoramento e multiplicação para distribuição aos produtores. Esses acessos selecionados estão contribuindo para a ampliação da base genética da resistência das atuais variedades clonais recomendadas para o plantio.

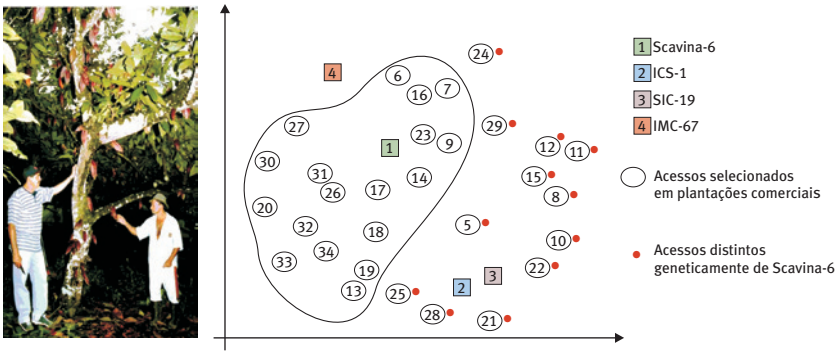


Figura 7. Identificação e seleção de plantas (acessos) resistentes à vassoura-de-bruxa em plantações comerciais com a ajuda de produtores e estudo de diversidade genética desses acessos em relação ao Scavina-6 (principal fonte de resistência) e outros genitores utilizados no programa de melhoramento genético do cacaueiro .

As informações de diversidade genética e frequência gênica obtidas com o uso dos marcadores moleculares geram uma grande quantidade de características adicionais, que podem ser combinadas com dados de pedigree, do local de coleta e com características morfológicas, fisiológicas e agronômicas, fornecendo uma análise mais completa da coleção e de cada acesso (LIVINI et al., 1992; ABDELNOOR et al., 1995; VASCONCELOS et al., 1996; CARVALHO et al, 2000b; 2000c; HUANG et al., 2002; FALEIRO et al., 2004b; 2004c; 2004d; VIEIRA et al., 2008).

Auxílio em trabalhos de classificação botânica e filogenia

Diversos sistemas de classificação botânica e filogenética de plantas e outros organismos, baseados em diferentes critérios, têm sido utilizados e aperfeiçoados ao longo dos anos. Inicialmente era utilizada a sistemática evolutiva (baseada na morfologia, paleontologia, ecologia, ontogenia), depois a taxonomia numérica ou sistemática fenética (baseada na quantidade de similaridade geral entre os organismos estudados interpretada como distância evolutiva), e atualmente a sistemática cladística (baseada apenas nas características homólo-

gas derivadas e compartilhadas de um ancestral comum próximo). Paralelamente ao avanço dos sistemas de classificação, a utilização de marcadores moleculares nesses estudos foi se tornando cada vez mais comum (ARRIEL et al., 2009).

Segundo Arriel et al. (2009), embora os métodos morfológicos sejam muito úteis em uma grande variedade de situações, em muitos casos, eles não podem ser aplicados, uma vez que não existem características morfológicas suficientes compartilhadas entre organismos geneticamente mais distantes. Diante das dificuldades encontradas para a obtenção da filogenia pelos métodos tradicionais, usando caracteres morfológicos, fisiológicos, comportamentais, entre outros, passou-se a utilizar dados moleculares para obtenção das árvores filogenéticas, surgindo a chamada filogenia molecular, que é o estudo das relações evolucionárias entre os organismos usando dados moleculares, como sequências de DNA, RNA e proteínas, inserções de elementos transponíveis, ou outros marcadores moleculares (ARRIEL et al., 2009).

Um exemplo da utilidade dos marcadores e análises moleculares para uma série de estudos evolucionários, filogenéticos e taxonômicos é o trabalho de Muschner (2005), estudando diferentes subgêneros e espécies do gênero Passiflora. Importantes informações sobre filogenia molecular, taxas evolutivas e tempo de divergência são apresentadas e discutidas. Na Figura 8, ilustra-se uma construção filogenética obtida com base em marcadores moleculares.

Com relação à classificação botânica, muitas vezes o uso da metodologia não é fácil, por causa da alta variabilidade intraespecífica e o efeito ambiental sobre o fenótipo diferenciador entre espécies e variedades botânicas dentro da espécie. Marcadores moleculares podem ser utilizados para auxiliar tais trabalhos, considerando o poder de diferenciação inter e intraespecífico e a não influência ambiental nas informações geradas (BRONDANI, 1996; LAKSHMI et al., 1997; OUBORG et al., 1999.; KIM et al., 1999; NICOLOSI et al., 2000; CABRAL et al., 2000; CHANDLER et al., 2001; RAINA et al., 2001; FALEIRO et al., 2003b; 2003c). Na Figura 9, ilustra-se a diferenciação interespecífica de três espécies do gênero *Stylosanthes* e, na Figura 10, a diferenciação de variedades botânicas de *Stylosanthes guianensis* verificada com base em marcadores moleculares RAPD.

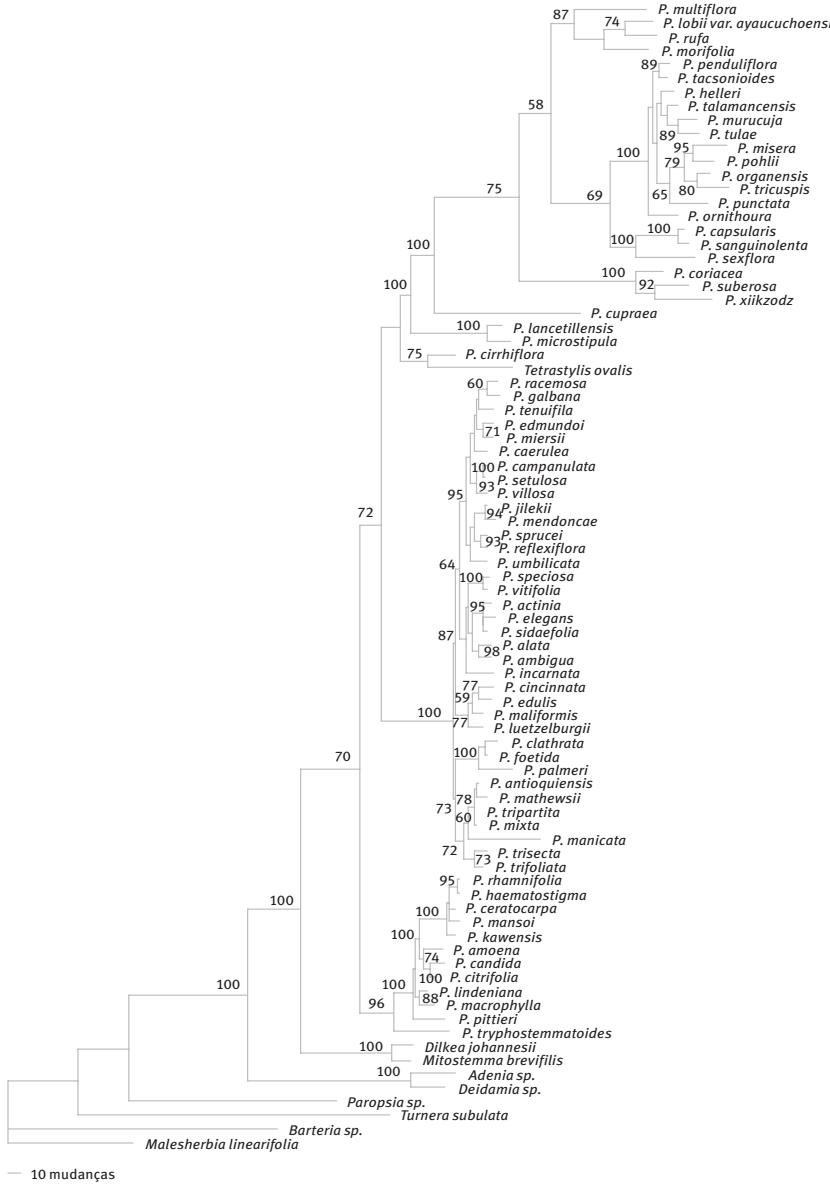


Figura 8. Construção filogenética de espécies do gênero *Passiflora*, obtidas com base em análises moleculares de sete regiões genômicas .

Fonte: Muschner (2005).

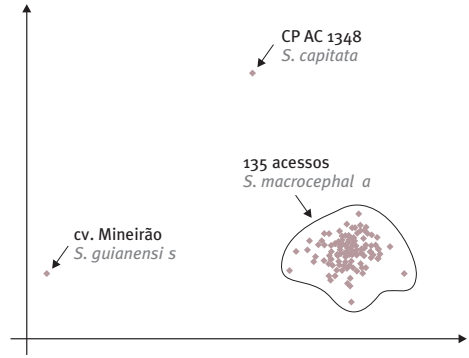


Figura 9. Diferenciação de três espécies do gênero *Stylosanthes* com base na diversidade genética analisada com o uso de marcadores moleculares RAPD.
Fonte: Faleiro et al. (2003c).

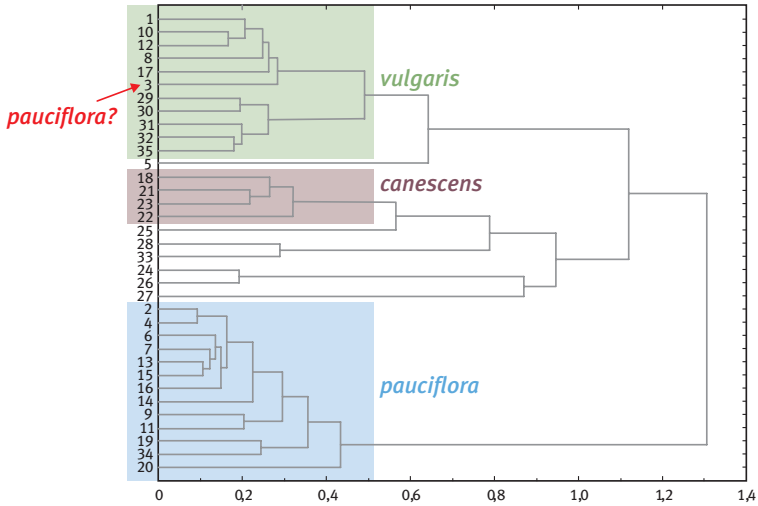


Figura 10. Diferenciação de variedades botânicas de *Stylosanthes guianensis* com base em distâncias genéticas calculadas com o uso de marcadores moleculares RAPD. Um erro de classificação fenotípica do acesso 3 como pertencente à variedade botânica pauciflora foi detectado com base nos marcadores moleculares.
Fonte: Faleiro et al. (2004b).

Os marcadores moleculares, principalmente aqueles baseados em análises de sequência, têm um grande potencial como ferramenta auxiliar em trabalhos de classificação botânica e em estudos de filogenia, origem genética e evolução; entretanto nunca irão substituir o trabalho essencial e de grande importância dos botânicos e taxonomistas.

Composição e validação de coleções nucleares e de trabalho

A coleção nuclear é um grupo de acessos que representa a diversidade genética de uma coleção original. De um modo geral, a coleção nuclear possui 10% a 15% do tamanho e representa mais de 70% da variabilidade genética da coleção original. Normalmente, a coleção original é uma coleção base, ou seja, uma coleção abrangente de acessos da espécie de interesse e de seus parentes silvestres (VALOIS et al., 1996; 2002). Logicamente, o princípio da composição de coleções nucleares pode ser aplicado em diferentes tipos de coleções de germoplasma, como as coleções ativas e as coleções de trabalho.

A composição de coleções nucleares não tem como objetivo a substituição de uma coleção base ou coleção ativa, nem mesmo de uma coleção de trabalho muito especializada. Um dos principais objetivos é facilitar e viabilizar a caracterização e avaliação de acessos de bancos de germoplasma, o que é fundamental e subsidia a utilização prática de tais recursos genéticos e sua incorporação em programas de melhoramento. Muitas vezes, a avaliação agronômica, a qual necessita da montagem de experimentos com repetições em vários ambientes, é muito difícil, principalmente quando um número elevado de acessos deve ser avaliado ao mesmo tempo. Estratégias para reduzir o número de acessos de uma coleção base sem a perda significativa da variabilidade genética, às vezes, são fundamentais para viabilizar a montagem de tais experimentos (FALEIRO, 2007).

A estrutura da coleção nuclear e sua dimensão, além de facilitar a caracterização do germoplasma, estimula o usuário a utilizar os recursos genéticos com maior eficiência (UPADHYAYA; ORTIZ, 2001). Na composição da coleção nuclear, cada acesso vai representar a variabilidade genética de outros acessos que ficaram no mesmo grupo de

similaridade. Após uma caracterização detalhada da coleção nuclear, caso seja verificado o potencial de um determinado acesso, tal potencial pode ser extrapolado para todos os acessos do mesmo grupo de similaridade, o que pode ser confirmado por meio de caracterizações detalhadas desses acessos.

Várias coleções nucleares de diferentes espécies têm sido desenvolvidas utilizando diferentes tipos de características e estratégias de amostragem (DIWAN et al., 1995; MARITA et al., 2000; TAI; MILLER, 2001; CHANDRA et al., 2002; LI et al., 2004). Entre as características utilizadas para o estabelecimento de coleções nucleares, estão os dados de pedigree, características ecogeográficas, morfológicas, fisiológicas, agronômicas, bioquímicas e moleculares (LI et al., 2004). Entre as características utilizadas, marcadores moleculares têm sido utilizados tanto para a composição quanto para a validação de coleções nucleares (GEPTS, 1995; TOHME et al., 1996; SKROCH et al., 1998; HOKANSON et al., 1998; GHISLAIN et al., 1999; GRENIER et al., 2000; HUAMAN et al., 2000; FALEIRO et al., 2003c; LI et al.; 2004). O uso de marcadores moleculares pode aumentar consideravelmente, na coleção nuclear, a representatividade da variabilidade genética da coleção original (FALEIRO, 2007).

O princípio mais utilizado na composição de coleções nucleares é analisar a variabilidade genética da coleção base, subdividir todos os acessos em grupos de similaridade genética e selecionar um acesso para representar cada grupo, de modo que os acessos selecionados representem mais de 70% da variabilidade genética inicial. Na Figura 11, ilustra-se o princípio utilizado para reduzir uma população base de 136 acessos de *Stylosanthes macrocephala* para uma de 20 acessos (FALEIRO et al., 2003c). Pode-se observar, na Figura 11, que os acessos selecionados ocupam praticamente toda dispersão gráfica e dessa forma representam boa parte da variabilidade genética da coleção inicial.

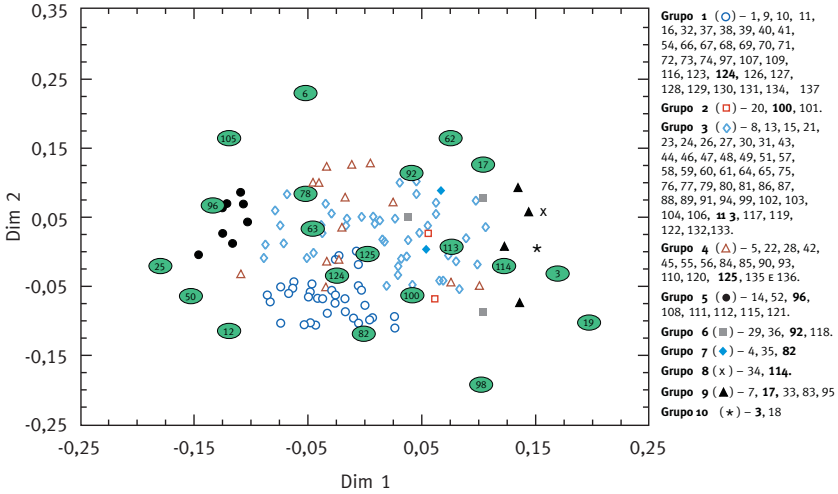


Figura 11. Dispersão gráfica de 136 acessos de *Stylosanthes macrocephala* com base em distâncias genéticas calculadas usando marcadores moleculares. Os acessos em verde são aqueles selecionados para a composição de uma coleção para representar a variabilidade genética da coleção inicial.

Fonte: Faleiro et al. (2003c).

Com relação à validação de coleções nucleares, o princípio é analisar a variabilidade genética da coleção base e da coleção nuclear e verificar a porcentagem da variabilidade presente na coleção nuclear. Para essa análise, cálculos de distâncias genéticas entre os acessos da coleção base e da coleção nuclear com base em polimorfismos do DNA, cálculos da riqueza e frequência alélica baseados em marcadores multialélicos e codominantes podem ser utilizados com sucesso (GEPTS, 1995; SKROCK et al., 1998; HUAMAN et al., 2000).

Caracterização de germoplasma

Para que a variabilidade genética de acessos de espécies cultivadas e silvestres conservada nos bancos de germoplasma seja utilizada e aproveitada de forma prática, atividades de caracterização são essenciais. Diferentes grupos de características são utilizados na caracterização de germoplasma, destacando-se as características ecológicas, morfológicas, agronômicas e moleculares (Figura 12). Essa caracteri-

zação de cada acesso vai subsidiar a sua utilização prática fornecendo genes de interesse para programas de melhoramento genético e também seu uso *per se*.

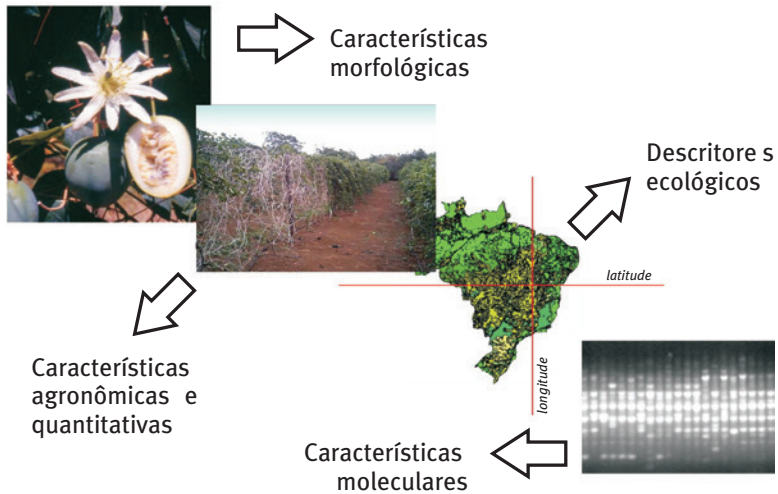


Figura 12. Principais grupos de características utilizadas na caracterização de germoplasma .

Nos últimos anos, houve um aumento significativo do uso de marcadores moleculares na caracterização de germoplasma. Tecnologias modernas de análise molecular permitem a geração de marcadores moleculares diretamente no DNA. O princípio da utilização desses marcadores moleculares é baseado no dogma central da biologia molecular e na pressuposição de que diferenças genéticas no DNA significam, na maioria das vezes, diferenças fenotípicas. Entre as vantagens dos marcadores, pode-se citar a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos; a identificação direta do genótipo sem influência do ambiente; a possibilidade de detecção em qualquer estádio do desenvolvimento da planta ou a partir de cultura de células ou tecidos; e a possibilidade de gerar maior quantidade de informação genética por loco no caso de marcadores co-dominantes. Com base nas características moleculares geradas pelos polimorfismos do DNA dos diferentes acessos ou espécies do banco de ger-

moplasma, várias informações podem ser obtidas (FALEIRO, 2007), muitas delas discutidas e exemplificadas neste capítulo.

Auxílio na seleção de genitores para programas de melhoramento genético

A escolha de genitores e o planejamento de cruzamentos em programas de melhoramento genético são etapas iniciais e fundamentais para o sucesso do programa (BORÉM, 1997). Para subsidiar essas etapas, é essencial uma caracterização genética refinada e completa da coleção e de cada acesso do germoplasma, a qual é obtida com base na avaliação acurada de características morfológicas, fisiológicas e agronômicas, além dos dados de pedigree.

Dados adicionais sobre a diversidade genética de potenciais genitores obtidos com base em marcadores moleculares podem auxiliar na escolha dos genitores e no planejamento dos cruzamentos visando à maximização da heterose e das combinações gênicas desejadas. Faleiro et al. (2010) analisaram genitores atuais e potenciais do programa de melhoramento genético da mangueira com base em marcadores moleculares e verificaram similaridades genéticas entre alguns dos atuais genitores. No entanto, os resultados do trabalho mostraram que novos genitores poderiam ser selecionados e utilizados no programa para ampliar sua base genética e maximizar a heterose e as chances de obtenção de combinações gênicas desejadas (Figura 13). Genitores selecionados apenas com base em características agronômicas podem estreitar a base genética do programa de melhoramento, caso não haja uma preocupação do melhorista em complementar as informações com dados de pedigree e diversidade genética.

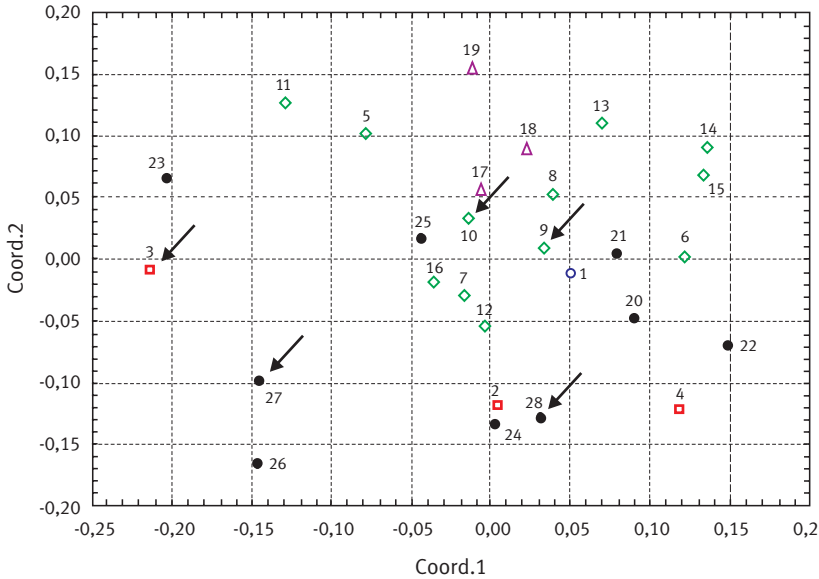


Figura 13. Dispersão gráfica de 28 variedades de manga com base nas distâncias genéticas entre elas calculadas com 350 marcadores RAPD. As variedades analisadas são originadas do Mexico (○); India (▫); Estados Unidos (◇); África do Sul (△); e Brasil (•). As setas indicam as variedades atualmente usadas no programa de melhoramento genético da manga realizado na Embrapa Cerrados .

Fonte: Faleiro et al. (2010).

Estudos de diversidade genética de linhagens de milho têm permitido a caracterização e o agrupamento das mesmas em grupos heteróticos distintos (LIVINI et al., 1992) e tais informações têm sido importantes na escolha de genitores para a obtenção de híbridos com elevada performance agronômica (GUIMARÃES; MOREIRA, 1999). Pires et al. (2000) propuseram uma estratégia de melhoramento genético do cacaueiro, utilizando a seleção recorrente envolvendo cruzamentos entre acessos silvestres e domesticados, cujos dados de diversidade genética dos acessos estimados com base em marcadores moleculares auxiliariam a escolha dos genitores. Dados de diversidade genética, principalmente de fontes de resistência à vassoura-de-bruxa, também têm auxiliado na escolha de genitores para o melhoramento

genético do cacaueiro visando à obtenção de variedades com resistência mais efetiva e duradoura, baseada na ampliação da base genética da resistência (FALEIRO et al., 2001a; 2004d; 2004e).

A escolha de genitores também pode ser baseada no agrupamento de potenciais genitores em grupos de similaridade. A escolha de menor número de genitores para representar determinado grupo de similaridade pode reduzir o número inicial de cruzamentos sem perdas significativas na diversidade genética, reduzindo os custos e viabilizando a execução do programa. Faleiro et al. (2004b) estudaram a diversidade genética de 35 potenciais genitores de *Stylosanthes guianensis*; estabeleceram 11 grupos de similaridade genética e selecionaram um genitor de cada grupo (Figura 14). Nesse trabalho, os autores estabeleceram 11 grupos de similaridade com um ponto de corte no dendrograma a 0,35 de distância genética relativa. Em cada grupo de similaridade, foi escolhido um genitor, utilizando características agronômicas (resistência a doenças, produção de sementes etc.) como critério de seleção dentro do grupo.

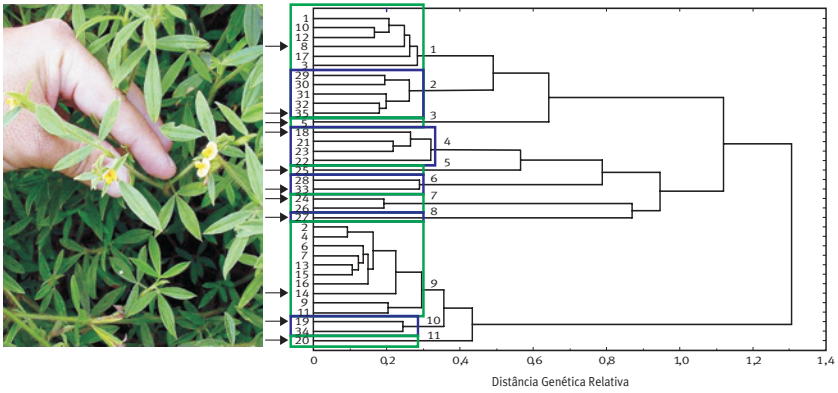


Figura 14. Análise de agrupamento de 35 acessos de Stylosanthes guianenis com base na matriz de distâncias genéticas geradas por 159 marcadores RAPD. As setas indicam os genitores selecionados com base na diversidade genética .

Fonte: Faleiro et al., 2004b.

Confirmações de hibridações e autofecundações

As confirmações de hibridações artificiais em programas de melhoramento são importantes para garantir que as sementes híbridas sejam utilizadas no avanço das gerações. Normalmente, os melhoristas utilizam marcadores morfológicos para confirmar que a planta originada de uma hibridação artificial é realmente híbrida e não originada por autofecundação. Por exemplo, a cor de flor é um marcador morfológico muito utilizado (Figura 15). O princípio da utilização desse marcador é a dominância da característica cor de flor púrpura sobre cor de flor branca. Para utilizar tal marcador, deve-se utilizar como genitor masculino a linhagem com flor púrpura e como genitor feminino a linhagem com flor branca. A progênie com flor púrpura indica que foi obtida por hibridação e a progênie com flor branca indica que foi obtida por autofecundação.

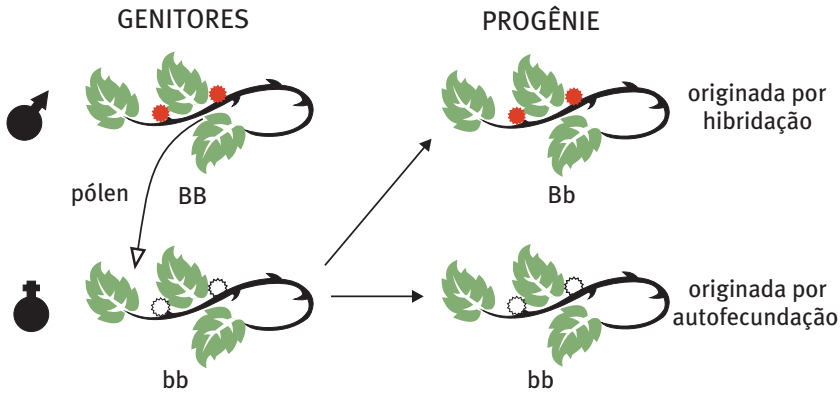


Figura 15. Utilização da cor da flor como marcador morfológico para confirmação de hibridações e autofecundações.

A utilização de marcadores morfológicos, apesar de muito útil, apresenta limitações práticas para o melhorista. Além de o número de marcadores morfológicos ser reduzido, em muitos casos, os genitores utilizados em cruzamentos não apresentam características morfológicas contrastantes que possam ser utilizadas como gene marcador. Para contornar tais limitações, marcadores moleculares podem ser utilizados para a confirmação de hibridações e autofecundações.

Na Figura 16, ilustra-se a utilização de marcadores moleculares RAPD para a confirmação de hibridação e autofecundação. Essa estratégia foi utilizada por Junqueira et al. (2008) para a confirmação de vários cruzamentos interespecíficos de espécies do gênero *Passiflora*.

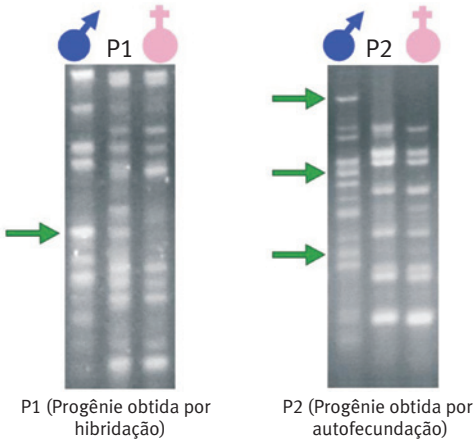


Figura 16. Uso de marcadores moleculares RAPD para confirmação de hibridação e autofecundação. As setas indicam marcas moleculares úteis, ou seja, marcas presentes no genitor masculino e ausentes no genitor feminino. A presença dessas marcas na progênie 1 (P1) indica que ela foi obtida por hibridação e a ausência na progênie 2 (P2) indica que foi obtida por autofecundação.

O princípio da utilização de marcadores moleculares dominantes, como o RAPD, para a confirmação de hibridações e autofecundações é o mesmo utilizado para marcadores morfológicos dominantes. Marcadores moleculares co-dominantes, como os microssatélites, também podem ser utilizados (FALEIRO et al., 2003d). Nesse caso, os genitores masculino e feminino devem possuir alelos diferentes, de modo que a progênie obtida por hibridação vai possuir os dois alelos, e a progênie obtida por autofecundação vai possuir apenas o alelo do genitor feminino (GUIMARÃES et al., 2009).

Testes de ascendência genética e paternidade

Baseando-se no mesmo princípio da utilização de marcadores moleculares para confirmação de hibridações e autofecundações, a análise da herança de cada marcador molecular ao longo das gerações oferece uma poderosa ferramenta para a realização de testes de ascendência genética e paternidade. Praticamente todos os tipos de marcadores moleculares do DNA podem ser utilizados para esses testes, não obstante marcadores co-dominantes e multialélicos sejam os mais indicados (FALEIRO, 2007).

A realização de testes de paternidade e testes de ascendência de acessos de bancos de germoplasma é importante, principalmente para a escolha de potenciais genitores para programas de melhoramento genético. Essa aplicação pode ser ilustrada pelos trabalhos de Yamada e Lopes (1999), Faleiro et al., (2001a; 2004d; 2004e) e Yamada et al. (2009), que analisaram a paternidade e origem genética de seleções de cacaueiros resistentes à vassoura-de-bruxa com o objetivo de identificar potenciais genitores que pudessem ser utilizados em programas de melhoramento para ampliar a base genética da resistência.

Testes de paternidade e de ascendência genética também têm sido úteis no programa de melhoramento genético da manga e do maracujá realizados na Embrapa Cerrados. No caso da manga, os testes têm sido realizados para identificação de genitores masculinos de progênies de meio-irmãos e para distinguir os embriões zigóticos daqueles nucelares em sementes poliembriônicas (CORDEIRO et al., 2006a; 2006b). No caso do maracujazeiro, os testes têm sido realizados para confirmar ou descartar possíveis genitores masculinos em diferentes cruzamentos interespecíficos (JUNQUEIRA et al., 2008), o que é ilustrado na Figura 17.

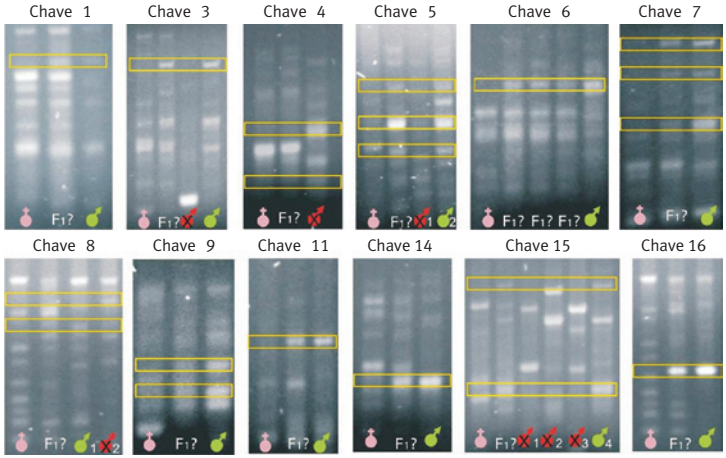


Figura 17. ♀ Produtos de amplificação de amostras de DNA genômico dos genitores femininos; ♂ possíveis F1 (F1?); ♂ e dos genitores masculinos confirmados e descartados nos testes de paternidade. Bandas informativas estão destacadas .

Fonte: Junqueira et al. (2008).

Recuperação mais rápida do genitor recorrente

O método dos retrocruzamentos é muito utilizado para transferir características de alta herdabilidade para genótipos elite (BORÉM, 1997). Nesse método de melhoramento, após cada ciclo de retrocruzamento, a proporção do genoma do genitor recorrente é recuperada e a do genitor doador é reduzida pela metade (Figura 18). Dessa forma, estima-se que são necessárias, aproximadamente, sete a nove gerações para recuperar de forma satisfatória o genoma do genitor recorrente.

Baseado no conceito de genótipos gráficos (YOUNG; TANKSLEY, 1989), o uso de marcadores moleculares pode acelerar a recuperação do genoma do genitor recorrente. O objetivo dessa aplicação é utilizar marcadores moleculares distribuídos ao longo de todo o genoma para genotipar plantas obtidas por retrocruzamentos (RC) juntamente com o genitor recorrente. Após a genotipagem, as plantas RC que possuírem o gene que está sendo introduzido e constituição genética mais próxima do genitor recorrente são selecionadas para o próximo ciclo de

retrocruzamentos. Dessa forma, pode-se reduzir o número de gerações necessárias para recuperar a constituição genética do genitor recorrente.

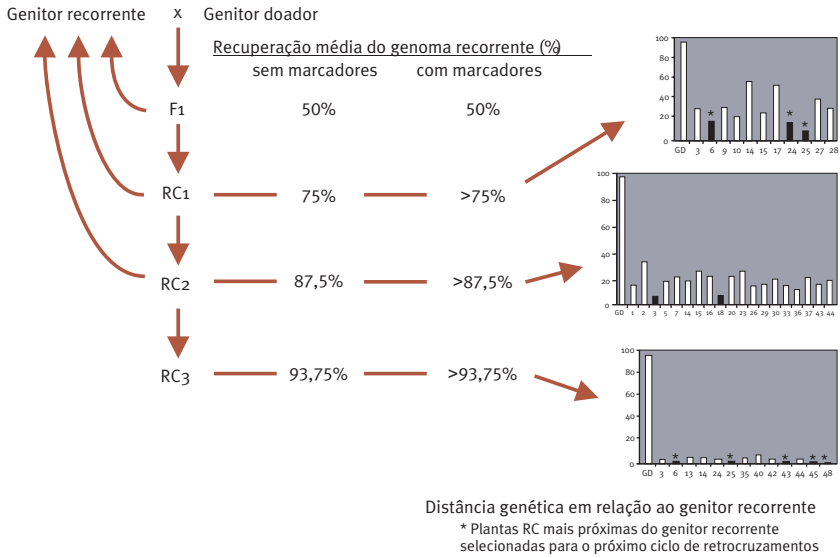


Figura 18. Recuperação do genoma do genitor recorrente em programa de retrocruzamento sem e com o uso de marcadores moleculares.

O número de gerações que podem ser reduzidas dependerá do tamanho do genoma da espécie; do número de marcadores moleculares utilizados na análise; do número de plantas RC genotipadas e selecionadas; e da proporção do genoma recorrente a ser recuperada. Segundo Openshaw et al. (1994), considerando uma espécie com genoma de 200 cM distribuídos em 10 cromossomos, é possível reduzir o número de ciclos de retrocruzamento de sete para três e recuperar 99% do genoma recorrente, utilizando-se 80 marcadores para genotipar 50 plantas a cada ciclo de retrocruzamentos.

Faleiro et al. (2004f), com o uso de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar de seleção, aceleraram a recuperação do genoma recorrente de feijoeiro-comum após a introdução de genes de resistência à ferrugem e à antracnose, o que foi conseguido após três ciclos de retrocruzamentos. Fonseca et al. (2009) utilizaram o mesmo princípio para acelerar a recuperação do genoma recorrente de maracujazeiro.

Desenvolvimento de mapas genéticos

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), o desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares na análise genética de espécies, e, potencialmente, no melhoramento genético, possibilitando a cobertura e análise completa de genomas, a decomposição de características genéticas complexas nos seus componentes Mendelianos, a localização de regiões genômicas que controlam características de importância e a canalização de toda essa informação para uso em programas de melhoramento, principalmente pensando na seleção assistida por marcadores moleculares.

Até meados da década de 1960, o desenvolvimento de mapas genéticos de ligação era baseado em marcadores morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual, como cor de pétalas, de semente, de hipocótilo, morfologia floral e foliar. Esses marcadores contribuíram significativamente para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e para a construção das primeiras versões de mapas genéticos. Entretanto, devido ao seu número limitado, a probabilidade de se encontrar associações significativas entre esses marcadores e caracteres de importância econômica era reduzida. A revolução nesse quadro iniciou-se com o desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos, os quais dobraram o número de marcadores genéticos disponíveis. Com o advento das técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA, os quais têm possibilitado o desenvolvimento de mapas genéticos com elevado nível de informação e saturação para várias espécies vegetais (CARNEIRO; VIEIRA, 2002) e animais (AMARAL et al., 2008). Na Figura 19, ilustra-se um mapa genético desenvolvido para o cacaueiro, o qual, a cada ano, está sendo saturado com novas marcas moleculares e características agronômicas de interesse.

Além das várias aplicações práticas dos mapas genéticos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; CARNEIRO; VIEIRA, 2002), o desenvolvimento desses mapas tem possibilitado o mapeamento comparativo de diferentes espécies e o mapeamento gênico e seus desdo-

bramentos relacionados à seleção assistida por marcadores moleculares, o que é discutido a seguir.

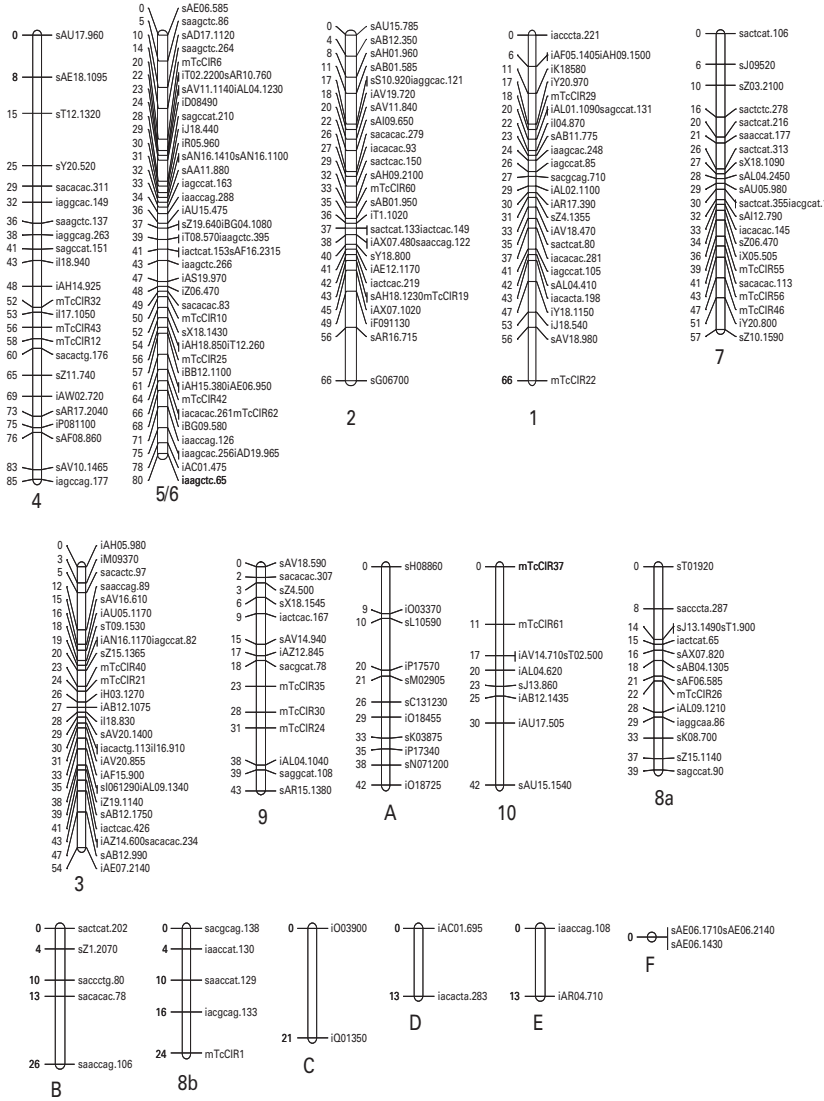


Figura 19. Mapa genético do cacaueiro .

Fonte: Faleiro et al., 2006.

Mapeamento comparativo

A facilidade para construir mapas genéticos para diferentes espécies utilizando marcadores moleculares tem possibilitado análises comparativas da estrutura genômica dessas espécies, quanto à homologia de genes e conservação de distância e ordem de ligação desses genes nos cromossomos (AHN; TANKSLEY, 1993; KELLER; FEUILLET, 2000). Essas análises são chamadas de mapeamento comparativo ou mapeamento de sintenia genômica. O termo sintenia tem sido usado em análises genéticas comparativas para se referir a segmentos cromossômicos ou locos gênicos de diferentes espécies localizados e conservados a partir de uma mesma região cromossômica de espécie ancestral comum.

Existem diferentes níveis de conservação entre genomas de diferentes espécies (KELLER; FEUILLET, 2000) (Figura 20). Um primeiro nível, chamado de ortologia, é a simples conservação de genes ou locos gênicos derivados de uma espécie ancestral comum entre diferentes espécies. Esses genes ou locos gênicos podem ser conservados mantendo-se uma mesma ordem linear entre eles dentro do segmento cromossômico. Nesse caso, esse tipo de conservação é chamado de colinearidade. Dentro desse segmento cromossômico conservado, pode haver inversões, inserções, duplicações ou deleções ao longo do processo evolucionário. Um último nível de conservação, chamado de microcolinearidade, refere-se à conservação da ordem de regiões codificadoras dentro do gene ou do fragmento de DNA ortólogo. Inversões, inserções, duplicações ou deleções são frequentemente observadas nesse nível.

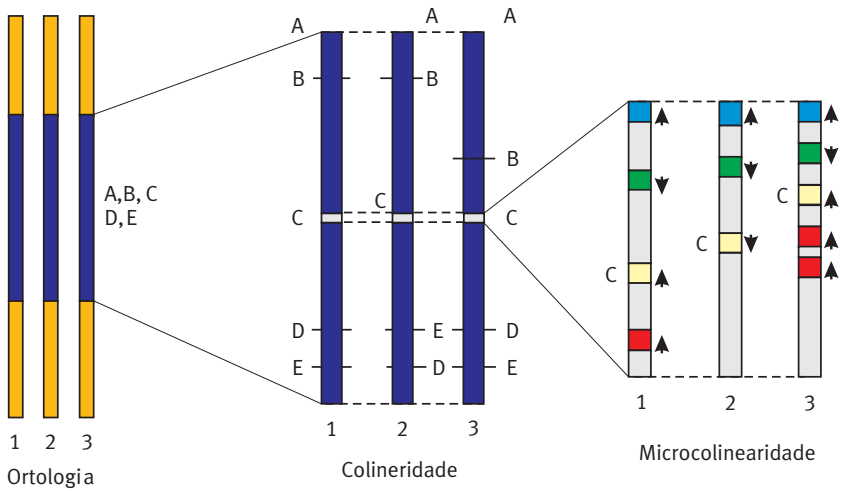


Figura 20. Diferentes níveis de conservação entre genomas. Nesta figura, são ilustrados segmentos cromossômicos de três espécies (1, 2 e 3), contendo cinco genes ou locos gênicos (A, B, C, D e E) e, dentro do loco C, regiões codificadoras (↑↓).

Fonte: Adaptada de Keller e Feuillet (2000).

A análise dos diferentes níveis de conservação da estrutura genômica de diferentes espécies relacionadas, por meio do mapeamento comparativo, apresenta importantes aplicações científicas. O conhecimento detalhado da estrutura genômica de diferentes espécies pode facilitar a construção de mapas de ligação de uma espécie com o mapeamento e utilização de genes da espécie relacionada. Como exemplo, Pereira et al. (1994) construíram um mapa genético de ligação em sorgo, utilizando sondas genômicas e de cDNA já mapeadas em milho. Esse tipo de sonda heteróloga, além de facilitar a construção de mapas genéticos, pode ser muito útil na avaliação do grau de conservação dos grupos de ligação de espécies relacionadas e do grau de colinearidade entre essas espécies. Sondas heterólogas podem servir como "âncoras" permitindo a análise conjunta de mapas genéticos de diferentes espécies. Essas informações são valiosas para estudos de evolução (MOORE et al., 1995) e também para o estabelecimento de

modelos e mapa genéticos únicos de referência para grupos de espécies relacionadas (SEWELL et al., 1999).

Mapeamento gênico

O desenvolvimento de um número praticamente ilimitado de marcadores genéticos moleculares associados à evolução dos aparatos computacionais para cálculos de co-segregação, agrupamento e distâncias entre as marcas e sua associação com características de interesse tem permitido o mapeamento de importantes genes em diferentes espécies (CARNEIRO; VIEIRA, 2002; AMARAL et al., 2008). Esse mapeamento tem sido feito tanto para genes associados a características qualitativas quanto para genes associados a características quantitativas.

O mapeamento de genes associados a características qualitativas ou características cujos fenótipos observados apresentam segregações Mendelianas (3:1; 1:2:1; 1:1) é bastante simples. Nesse caso, a co-segregação do fenótipo e os marcadores moleculares são analisados diretamente, ou seja, a característica qualitativa é tratada como se fosse um outro marcador. O resultado desse tipo de mapeamento são distâncias (centiMorgan) entre os marcadores moleculares e o gene associado à característica qualitativa (FALEIRO et al., 2003e). No caso do mapeamento de genes associados a características quantitativas ou de locos de características quantitativas (QTLs), o resultado será uma porcentagem da variação fenotípica da característica de interesse explicada pelos marcadores moleculares de forma isolada e conjunta (FALEIRO et al., 2006) (Figura 21).

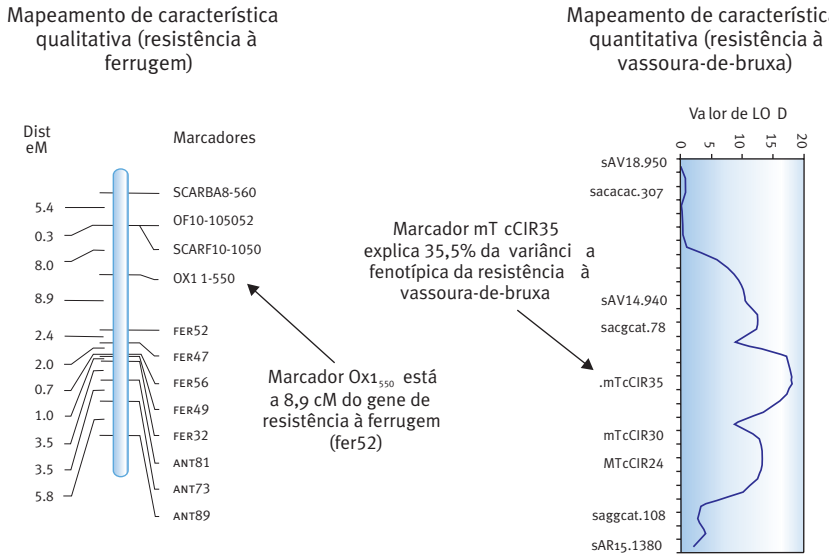


Figura 21. Resultados das associações de marcadores moleculares com característica qualitativa e quantitativa em mapas genéticos .

Tanto para características qualitativas quanto para quantitativas, a acurácia das avaliações fenotípicas é fundamental para o sucesso do mapeamento gênico. No caso do mapeamento de genes associados a características quantitativas, a fenotipagem é mais difícil exigindo a avaliação de grande número de indivíduos em experimentos com repetições e, de preferência, em diferentes ambientes. A utilização de populações segregantes de espécies que permitem a propagação vegetativa ou a utilização de linhagens endogâmicas recombinantes obtidas pelo método de descendente de uma única semente (SSD) têm possibilitado o aumento da acurácia das avaliações fenotípicas, melhorando a qualidade do mapeamento de QTLs (FALEIRO et al., 2003f; FALEIRO et al., 2006).

Uma aplicação prática do mapeamento gênico é o acúmulo de informações sobre a herança das características qualitativas e quantitativas de interesse. No caso das características quantitativas, naturalmente controladas por vários genes, os marcadores moleculares permitem a identificação e análise de cada um dos genes significativamente associados à característica. Além do mapeamento, é possível o estudo dos

efeitos gênicos e da ação dos genes de maneira isolada, interativa e cumulativa (PEREIRA et al., 2009). Além disso, é possível identificar a origem dos genes favoráveis, ou seja, qual genitor é doador dos alelos favoráveis associados à característica de interesse.

Outra aplicação e possibilidade do mapeamento gênico é a geração de informações para se "caminhar" no cromossomo em direção aos genes de interesse e para "aterrissar" no gene (TANKSLEY et al., 1995), o que provocou uma verdadeira revolução na capacidade de isolar genes na ausência de informação sobre sua sequência ou seu produto (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 2009). Essa estratégia culminou na clonagem de um grande número de genes do genoma humano (COLLINS et al., 1997) e também de vários genes de plantas e animais que controlam características de interesse em diferentes espécies, metodologia conhecida como clonagem posicional (GRATTAPAGLIA; FERREIRA, 2009). Para realizar a clonagem posicional, é necessário um mapeamento gênico de alta resolução, ou seja, um mapeamento gênico baseado em análises de co-segregação de milhares de indivíduos segregantes.

Além das aplicações citadas acima, o mapeamento gênico com base em marcadores moleculares abriu novas perspectivas para a seleção assistida, ou seja, a seleção indireta de características de interesse. Para o sucesso da seleção indireta, é necessário que a herdabilidade do marcador e a correlação deste com a característica de interesse sejam altos. Como a herdabilidade dos marcadores moleculares é igual a 1, o sucesso da seleção indireta depende da identificação de marcadores moleculares altamente correlacionados com as características de interesse, ou seja, a qualidade e resolução do mapeamento gênico é a base para a seleção assistida por marcadores moleculares.

Seleção assistida por marcadores moleculares

A seleção assistida por marcadores moleculares (SAMM) é uma forma de seleção indireta de características de interesse com base em marcadores moleculares. No melhoramento genético, o principal objetivo da seleção é propiciar ganhos genéticos. O ganho genético da seleção de uma característica (GS_Y) depende diretamente da intensidade de seleção (k_Y), do controle parental (p), da acurácia da avaliação

fenotípica (h_Y) e da variabilidade genética disponível da característica na população submetida à seleção (σg_Y) (CRUZ; REGAZZI, 1997), conforme a fórmula abaixo.

$$GS_Y = k_Y \cdot p \cdot h_Y \cdot \sigma g_Y$$

Quando pensamos na seleção indireta de uma característica Y com base em uma característica X [$GS_{Y(X)}$], o GS pode ser quantificado conforme a fórmula abaixo.

$$GS_{Y(X)} = k_X \cdot p \cdot h_X \cdot rg_{XY} \cdot \sigma g_Y$$

A relação entre o ganho genético baseado na seleção indireta e o ganho genético baseado na seleção direta é apresentada abaixo.

$$\frac{GS_{Y(X)}}{GS_Y} \quad \frac{\cancel{k_X} \cdot \cancel{p} \cdot h_X \cdot rg_{XY} \cdot \cancel{s_{gY}}}{\cancel{k_Y} \cdot \cancel{p} \cdot h_Y \cdot \cancel{s_{gY}}}$$

Ao analisarmos essa relação, podemos verificar que, em algumas situações, a seleção indireta pode propiciar ganhos genéticos maiores que a seleção direta. Isso vai acontecer quando a acurácia fenotípica da característica auxiliar (h_x) for alta, a da característica principal (h_x) for baixa e a correlação genética entre as características auxiliar e principal (rg_{XY}) for alta. Uma das vantagens da utilização de marcadores moleculares como característica auxiliar na seleção indireta é que a acurácia é máxima, ou seja, é igual a 1. Como mencionado no item anterior, a correlação genética entre o marcador molecular e a característica principal é definida pelo mapeamento genético. Com base em trabalhos de mapeamento genético, já foram identificados vários marcadores moleculares associados a locos para características de herança genética qualitativa quanto a locos para características quantitativas (QTLs).

A utilização dos marcadores moleculares na seleção de características qualitativas é uma realidade, embora existam, ainda, algumas restrições por parte dos melhoristas. O principal argumento é que características qualitativas não necessitam de marcadores para seleção indireta, uma vez que, de um modo geral, as plantas com tais carac-

terísticas podem ser facilmente identificadas e selecionadas. Apesar da veracidade do argumento, em algumas situações, o uso de marcadores moleculares pode trazer algumas vantagens como na seleção em estágios iniciais de desenvolvimento, na seleção de genes de resistência sem a necessidade de inoculação das plantas com o patógeno ou praga, na seleção de características qualitativas de difícil avaliação fenotípica e também na seleção simultânea de diferentes genes de interesse (FALEIRO et al., 2003g).

A seleção em estágios iniciais de desenvolvimento possui grande aplicabilidade em espécies perenes, com período juvenil longo, e em casos onde a expressão da característica só ocorre na fase final do ciclo da espécie, a exemplo de características de interesse para agroindústria em grãos de soja (MOREIRA et al., 2001). Outra importante vantagem da seleção em estágios iniciais com base em marcadores moleculares é para as situações em que a avaliação fenotípica da característica de interesse necessita da destruição da planta, como, por exemplo, a avaliação da resistência a nematoides (ALZATE-MARIN et al., 2006).

A seleção de genes de resistência sem a necessidade de inoculação das plantas é importante no desenvolvimento de materiais resistentes a um patógeno ou praga exótica, ainda não detectado em uma região, onde sua entrada é proibida pelo serviço de quarentena e controle fitossanitário. Um exemplo seria o desenvolvimento de variedades de cacaueiro resistentes à *Moniliophthora roreri* no Brasil, o que tem sido viabilizado mediante um projeto internacional envolvendo instituições de pesquisa do Equador, Peru e Brasil e o uso de marcadores moleculares (www.cepec.gov.br/ biotecnologia.htm).

A seleção de características qualitativas de difícil avaliação fenotípica seria outra vantagem da SAMM. Essa dificuldade de avaliação fenotípica pode ser relacionada à complexidade e (ou) aos elevados custos envolvidos da fenotipagem. A avaliação da resistência de plantas a insetos, por exemplo, na maioria das vezes, exige procedimentos demorados e laboriosos envolvendo a multiplicação do inseto, montagem de diferentes bioensaios e diferentes avaliações. Um exemplo, citado por Milach (2001), é a seleção de plantas com resistência a insetos, conferida pelo transgene *Bt*. Nesse caso, a seleção pode ser feita com a utilização de *primers* específicos que possibilitam a amplifica-

ção direta do gene. Guimarães et al. (2009) citam outros exemplos de avaliações fenotípicas complexas ou caras como de características relacionadas à qualidade nutricional, composição aminoacídica, características organolépticas, entre outras.

No caso da seleção simultânea de diferentes genes de resistência, o exemplo prático da SAMM é a *piramidização* de genes que conferem resistência a doenças. Nesse caso, podemos pensar na *piramidização* de genes ou blocos gênicos que conferem resistência a diferentes raças de um patógeno (MILACH; CRUZ, 1997; FALEIRO et al., 2000a) ou que conferem resistência a diferentes patógenos (FALEIRO et al., 2000b; 2003e; 2004f). Uma das dificuldades da *piramidização* de genes é a seleção das plantas que apresentam todos os genes R a serem *piramidizados*. Quando pensamos na resistência a diferentes raças de um patógeno, o fenótipo da resistência é o mesmo quando um, dois ou mais genes de resistência estão presentes e, quando pensamos na resistência a diferentes patógenos, a dificuldade são as interações existentes entre diferentes patógenos inoculados simultaneamente. As dificuldades são ainda maiores quando pensamos na *piramidização* de genes de efeito menor junto com genes de efeito maior, visto que estes mascaram a presença daqueles (FALEIRO et al., 2001b). Essas dificuldades são eliminadas com a utilização da SAMM. Logicamente, para a utilização da SAMM, é necessário que marcadores moleculares associados aos genes de resistência sejam identificados. A utilização de marcadores moleculares flanqueando o gene ou o bloco gênico é fortemente ligado a ele aumenta muito a confiabilidade e a eficiência da seleção indireta (FALEIRO et al., 2000a).

Outra vantagem da SAMM relatada por Guimarães et al. (2009) é a possibilidade de maximizar os ganhos genéticos com a seleção em ambos os sexos. Essa possibilidade é importante no melhoramento genético animal, quando as características de interesse são expressas somente em um sexo, como, por exemplo, a produção de leite em bovinos.

Quando pensamos em características quantitativas, ou seja, características controladas por vários genes e fortemente influenciadas pelo ambiente, a SAMM dos QTLs é mais complexa. Existem, na literatura científica, numerosos trabalhos de detecção e mapeamento de QTLs

utilizando marcadores moleculares, entretanto poucos são os exemplos de variedades comerciais obtidas com o auxílio de marcadores moleculares na seleção desses QTLs. Segundo Guimarães e Moreira (1999), a baixa variabilidade genética dos genitores utilizados nos programas de melhoramento e a falta de interação entre as equipes envolvidas no mapeamento genético e no melhoramento genético são fatores que contribuem para esse fato.

Antes de pensar na SAMM, deve-se questionar a repetibilidade da informação de ligação entre o marcador e o QTL, a interação entre o QTL e o ambiente e a seleção simultânea de várias características muitas vezes correlacionadas. Outro questionamento é a validação desses QTLs para outras populações e outros ambientes. Temos que considerar também a dificuldade de selecionar concomitantemente vários QTLs, cada um explicando uma parte da variação fenotípica da característica de interesse (BEARZOTI, 2000). Essa última dificuldade foi analisada por Lande e Thompson (1990), os quais propuseram o uso de um índice de seleção que combina o valor fenotípico com a informação molecular, a qual é o somatório dos efeitos de cada marcador-QTL na característica ponderados por um fator que depende da herdabilidade da característica e da proporção da variância genética aditiva explicada pelos marcadores-QTLs (Figura 22).

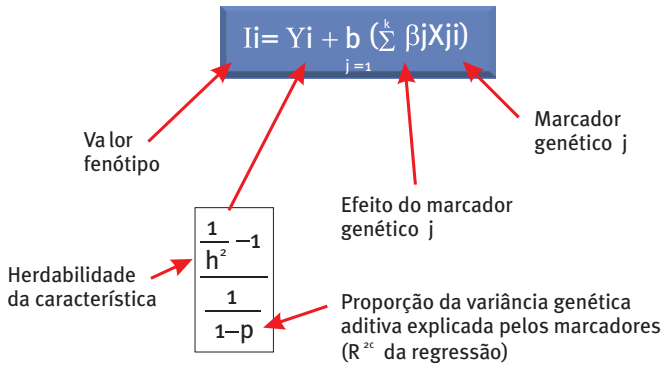


Figura 22. Índice proposto por Lande e Thompson (1990) para seleção de características de interesse, combinando informações fenotípicas e moleculares derivadas do mapeamento de QTLs.

Apesar de todas as dificuldades, existem experiências de sucesso na transferência de QTLs de efeito maior para genótipos elite (EATHINGTON et al., 1997). Outro exemplo de sucesso da SAMM de características quantitativas é a identificação e posterior transferência de alelos (QTLs) de interesse agronômico de acessos não adaptados ou silvestres para genótipos elite. São exemplos, QTLs para aumento do tamanho do fruto em tomate (TANKSLEY et al., 1996) e para aumento da produtividade em arroz (XIAO et al., 1996; BRONDANI et al., 2002). Esse uso de espécies silvestres no melhoramento genético vegetal e da SAMM de características quantitativas normalmente é feito utilizando-se o método dos retrocruzamentos, o qual permite a recuperação do genoma recorrente, mantendo-se os genes de interesse provenientes da espécie silvestre (FERREIRA; RANGEL, 2005).

A integração do método dos retrocruzamentos com a SAMM de características quantitativas tem sido referenciada na literatura como um novo método de melhoramento, chamado retrocruzamento avançado de QTLs (AB-QTLs) (FERREIRA; RANGEL, 2005; FERREIRA; FALEIRO, 2008). Nesse método, um mapa genético para características quantitativas de interesse é gerado e a recuperação do genoma recorrente é realizada com base na seleção de marcadores moleculares associados ao controle genético da característica quantitativa de interesse. Esses marcadores podem ser provenientes tanto da espécie silvestre quanto do acesso elite. O método do AB-QTLs tem sido aplicado com sucesso em diferentes espécies, permitindo não somente a compreensão da base genética de características quantitativas de interesse econômico, como também o desenvolvimento de linhagens para programas de melhoramento genético (FERREIRA; RANGEL, 2005).

A seleção indireta de características quantitativas utilizando marcadores moleculares poderia ser facilitada se fosse possível identificar todos os genes/alelos que controlam a característica, conhecer a localização de cada gene e mensurar o efeito individual no fenótipo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Contudo, ao desenvolver um estudo de mapeamento de QTLs, apenas uma fração dos genes envolvidos no controle da característica quantitativa é detectada. Os QTLs mapeados, em geral, são de grande efeito, relativamente àqueles que também contribuem para o fenótipo. Embora seja importante detectar e utilizar os QTLs de maior efeito para fins de seleção, é inevitável a

constatação de que o limite máximo de incremento de uma característica quantitativa não poderá ser atingido sem o mapeamento de todos os locos envolvidos (FERREIRA; FALEIRO, 2008). Outro ponto a ser considerado é que, dependendo do número de genes envolvidos, um grande número de indivíduos e um grande número de análises moleculares em cada indivíduo pode tornar a SAMM inviável do ponto de vista prático, considerando o custo das análises e, principalmente, o tempo necessário para a realização delas, considerando o curto tempo entre os ciclos de seleção em programas de melhoramento genético.

Considerando as limitações, dificuldades envolvidas e raros casos de sucesso, a SAMM de características quantitativas baseada no modelo atual de mapeamento e utilização de QTLs está passando por um momento de reflexão. Para que esse método de seleção seja útil, os QTLs mapeados devem explicar grande parte da variação genética da característica quantitativa, a qual é controlada por vários genes de pequenos efeitos. Esse fato não tem sido observado na prática, exatamente em função da natureza poligênica e da alta influência ambiental nos caracteres quantitativos (RESENDE et al., 2008). Em função desses aspectos e outras limitações mencionadas anteriormente, a implementação prática da SAMM de características quantitativas tem sido limitada e os ganhos em eficiência muito reduzidos (DEKKERS, 2004; RESENDE et al., 2008).

Seleção genômica ampla

Considerando as principais limitações da SAMM de características quantitativas baseadas no mapeamento e utilização de QTLs, um novo método de seleção chamado seleção genômica ampla (SGA) ou *Genomic wide selection* (GWS) foi proposto (MEUWISSEN et al., 2001). Recentemente, com o desenvolvimento de marcadores do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), com as novas tecnologias de sequenciamento de alto desempenho (HT – *High Throughput* e UHT – *Ultra High Throughput*) e com o aumento da capacidade de análises computacionais, o método tornou-se mais atrativo, sendo claras as possibilidades de utilização prática com importantes benefícios para o melhoramento genético vegetal (BERNARDO; YU, 2007) e animal (SCHAEFFER, 2006).

Resende et al. (2008) apresentaram os fundamentos do método da seleção genômica ampla enfatizando suas vantagens e possibilidades para maximização da eficiência da seleção em programas de melhoramento genético. Conforme relatado por Resende et al. (2008), a seleção genômica ampla pode ser definida como a seleção simultânea de centenas ou milhares de marcadores, os quais cobrem o genoma de uma maneira densa, de forma que todos os genes de um caráter quantitativo estejam em desequilíbrio de ligação com pelo menos uma parte dos marcadores. Esses marcadores em desequilíbrio de ligação com os QTLs, tanto de grandes quanto de pequenos efeitos, explicarão quase a totalidade da variação genética de um caráter quantitativo.

A seleção genômica é dita ampla porque atua em todo o genoma, capturando todos os genes que afetam uma característica quantitativa. Uma grande vantagem da SGA é que não há necessidade prévia de identificar os marcadores com efeitos significativos e de mapear QTLs. Os marcadores moleculares terão seus efeitos genéticos estimados a partir de uma amostra de pelo menos 1.000 indivíduos genotipados e fenotipados. Por esse motivo, a SGA fundamenta-se nos marcadores genéticos moleculares do tipo SNP (polimorfismo de um único nucleotídeo). Esses marcadores são a forma mais abundante de variação do DNA em genomas e são preferidos em relação a outros marcadores genéticos por causa da sua baixa taxa de mutação e facilidade de genotipagem. Milhares de SNPs podem ser usados para cobrir o genoma de um organismo com marcadores que não estão a mais de 1 cM um do outro no genoma inteiro. Tecnologias para genotipagem de milhares de SNPs em microarranjos estão disponíveis atualmente.

Com o processo de genotipagem e fenotipagem dos indivíduos, são identificados os QTNs (nucleotídeos de características quantitativas), que são polimorfismos funcionais, causadores diretos da variação quantitativa observada. A análise de SNPs permite a detecção de polimorfismos funcionais ou polimorfismos em forte desequilíbrio de ligação com os QTNs (RESENDE et al., 2008).

Segundo descrito por Goddard e Hayes (2007) e Resende et al. (2008), para a implementação prática da seleção genômica ampla, três populações ou conjuntos de dados são necessários:

a) *População de Descoberta*. Esse conjunto de dados contempla um grande número de marcadores SNPs avaliados em 500 a 1.000 indivíduos, os quais devem ter seus fenótipos avaliados para as várias características de interesse. Equações de predição de valores genéticos genômicos são obtidas para cada característica de interesse.
b) *População de Validação*. Esse conjunto de dados é menor do que aquele da população de descoberta e contempla indivíduos avaliados para os marcadores SNPs e para os vários caracteres de interesse. As equações de predição de valores genéticos genômicos são testadas para verificar suas acurácias nessa amostra independente.
c) *População de Seleção*. Esse conjunto de dados contempla apenas os marcadores SNPs avaliados nos candidatos à seleção. Essa população será submetida à seleção indireta da característica de interesse com base nos marcadores moleculares de acordo com as equações de predição derivadas na população de descoberta. As equações de predição vão gerar um índice chamado valor genético genômico (VGG), o qual será utilizado na predição dos fenótipos futuros dos candidatos à seleção.

Os resultados de simulação revelam um grande potencial da SGA em aumentar a eficiência do melhoramento. Entretanto, conforme relatado por Resende et al. (2008), esse benefício somente será concretizado se houver um alto grau de desequilíbrio de ligação envolvendo marcadores SNPs proximamente espaçados e se os efeitos genéticos dos marcadores nas características sob melhoramento forem estimados (a partir dos fenótipos) com alta acurácia e usados na própria população e ambientes em que forem estimados. É preciso adquirir experiência prática com a SGA para uma real inferência sobre sua efetividade.

Predição de desempenho de híbridos simples

A produção e avaliação de híbridos a partir do cruzamento de linhagens é uma estratégia muito utilizada em programas de melhoramento genético de plantas alógamas. Diferentes tipos de híbridos

podem ser obtidos, tais como: híbridos simples, simples modificado, triplo, triplo modificado e duplo (BORÉM, 1997).

O híbrido simples é obtido pelo cruzamento de duas linhagens. Em geral, o híbrido simples é mais produtivo que os demais e apresenta maior uniformidade. Com um pequeno número de linhagens é possível a produção de grande quantidade de híbridos diferentes. Por exemplo, com 100 linhagens é possível a produção de 4.950 híbridos simples, 485.100 híbridos triplos e 11.763.675 híbridos duplos. A obtenção e avaliação de um número muito grande de híbridos em experimentos com repetições e em diferentes locais são extremamente difíceis, considerando os custos financeiros e a viabilidade experimental. Diante dessa dificuldade, a predição de híbridos com base no comportamento dos genitores (linhagens ou híbridos simples) tornou-se uma estratégia importante dentro dos programas de melhoramento (BORÉM, 1997).

Existem diferentes métodos para predição do desempenho de híbridos (BORÉM, 1997). No caso de híbridos simples, a predição é baseada na habilidade da linhagem genitora em transmitir uma performance desejada para a progênie híbrida. Existem dois tipos de habilidade de combinação. A capacidade geral de combinação (CGC) que mede o comportamento médio da linhagem, ou seja, o desempenho médio dos híbridos obtidos pelo cruzamento desta linhagem com diversas outras. A capacidade específica de combinação (CEC) que mede o comportamento de uma linhagem em uma combinação específica com outra linhagem.

O desempenho dos híbridos é função da heterose expressa no cruzamento entre os genitores utilizados. A heterose geralmente é aumentada em função da distância genética entre os genitores. Com base nesse princípio, marcadores moleculares poderiam ser utilizados para estimar, com detalhes, a distância genética entre diferentes linhagens e tais distâncias poderiam ser utilizadas na predição do desempenho dos híbridos. Vários trabalhos foram realizados para avaliar a correlação entre distâncias genéticas entre linhagens estimadas com base em marcadores moleculares e o desempenho dos híbridos (SMITH et al., 1990; BERNARDO, 1992; BARBOSA et al., 2003; GUIMARÃES et al., 2007). Guimarães et al. (2009) analisaram os resultados de vários

desses trabalhos e verificaram que essas correlações foram positivas e altas quando os híbridos eram obtidos pelo cruzamento de linhagens do mesmo grupo heterótico, entretanto eram muito baixas para híbridos obtidos a partir de linhagens de grupos heteróticos distintos. Como os híbridos são, normalmente, obtidos a partir de cruzamentos de linhagens pertencentes a grupos heteróticos distintos, as informações de distâncias genéticas obtidas por marcadores moleculares não poderiam ser utilizadas na predição de híbridos simples. Bernardo (1992) mostrou que os valores de correlação entre distâncias genéticas e performance de híbridos dependem da ligação entre os marcadores e QTLs que controlam a característica.

Diante das limitações da eficiência do uso de marcadores moleculares para predição do desempenho de híbridos, Bernardo (1996) propôs a utilização de uma nova metodologia de predição de híbridos baseada no uso de modelos mistos, mais especificamente do BLUP (*Best Linear Unbiased Predictor*), com informações obtidas por marcadores moleculares. Nessa metodologia, o desempenho dos híbridos simples é predito em função do parentesco com outros híbridos já fenotipados. As linhagens genitoras são genotipadas com marcadores moleculares e os coeficientes de parentesco entre elas são estimados e utilizados na predição dos híbridos simples. Guimarães et al. (2009) explicam com detalhes a utilização dessa metodologia. Segundo esses autores, trabalhos de validação dessa metodologia, como o realizado por Charcosset et al. (1998), sugerem que tal metodologia não seria eficiente para predizer o híbrido mais produtivo, entretanto seria eficiente para predizer o desempenho dos híbridos simples a partir de um grupo de híbridos simples já fenotipados com elevada precisão. Dessa forma, um conjunto menor de híbridos simples com potencial superior seria selecionado para ser efetivamente avaliado em condições de campo.

Análise de homogeneidade genética de sementes

Cultivares de espécies autógamas, assim como as linhagens envolvidas na obtenção de híbridos de espécies alógamas, devem possuir elevado nível de homogeneidade. Normalmente, sementes genéticas de uma nova cultivar são obtidas a partir de dezenas de plantas feno-

tipicamente idênticas oriundas de uma geração com elevado nível de homozigose. Pelo fato da acurácia da avaliação fenotípica não ser 100% devido à dependência dos fatores ambientais, as plantas fenotipicamente idênticas, podem não ser genotipicamente idênticas, ou seja, podem apresentar falta de homogeneidade ou de uniformidade genética.

Marcadores moleculares podem ser utilizados para avaliar essa homogeneidade genética com altíssima precisão. Mesmo com todo o rigor adotado nas etapas de seleção fenotípica, linhagens de composição genética diferente são detectadas na análise molecular (SCHUSTER et al., 2009). A possibilidade de identificar e eliminar as linhagens que apresentam composição molecular diferente certamente vai proporcionar maior nível de homogeneidade das sementes genéticas e, por consequência, maior nível de homogeneidade da cultivar a ser recomendada aos produtores.

Análise de pureza genética de sementes e mistura varietal

Como comentado no item anterior, sementes de uma cultivar ou variedade podem apresentar características fenotípicas semelhantes, mas serem genotipicamente diferentes. A contaminação ou mistura genética pode ocorrer nas fases finais do programa de melhoramento, nos campos de produção de sementes e nos processos de manutenção de estoques de sementes genéticas (SCHUSTER et al., 2009; PINHO et al., 1996; GETHI et al., 2002).

Segundo Schuster et al. (2009), o monitoramento e rastreamento de contaminações genéticas no sistema de produção de sementes devem ser eficientes, de maneira a garantir elevados padrões de pureza genética no material disponibilizado aos produtores de sementes certificadas e, consequentemente, aos produtores de grãos. Isso se torna ainda mais importante com a abertura do sistema de certificação a entidades privadas e produtores de sementes e também com o fortalecimento do sistema de fiscalização da produção e comercialização de sementes no País, previstos na Nova Lei de Sementes (Lei n° 10.711 de agosto de 2003).

Dentro desse contexto, o uso de marcadores moleculares assume grande importância. Além da avaliação da pureza genética, marcadores moleculares podem ser utilizados em processos de purificação da cultivar ou linhagem. Nesse caso, os marcadores podem identificar plantas homozigotas idênticas reais representantes da cultivar ou linhagem, de modo a utilizá-las na multiplicação das sementes.

Marcadores moleculares também podem ser utilizados para avaliação de pureza genética de sementes híbridas. A contaminação genética em campos de produção de sementes híbridas pode ocorrer, principalmente, pela autofecundação da linhagem genitora feminina. Nesse caso, vai haver uma mistura das sementes híbridas com as sementes das linhagens autofecundadas, as quais vão gerar plantas com baixo desempenho agronômico. Nesse caso, marcadores moleculares co-dominantes, como os microssatélites, são indicados para o monitoramento da pureza genética, pois permitem a verificação da contribuição de ambos os pais na composição genética das sementes híbridas. Schuster et al. (2009) ilustram esse processo de avaliação de pureza genética em sementes de milho evidenciando as sementes híbridas (com contribuição genética de ambas linhagens genitoras) e as sementes contaminantes (com contribuição genética apenas da linhagem genitora feminina).

Análise de identidade genética ou *fingerprinting*

Cada material genético (acessos em bancos de germoplasma, linhagem, híbrido, matriz, variedade, cultivar, organismos geneticamente modificados etc.) possui uma sequência de nucleotídeos que compõem o seu DNA. A detecção de diferenças entre essas sequências através de polimorfismos de fragmentos de DNA revela um padrão único, ou seja, uma impressão digital genética (*genetic fingerprinting*) que pode ser utilizada na identificação de indivíduos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). A impressão digital genética obtida com base em marcadores moleculares pode ser comparada a uma impressão digital utilizada nas carteiras de identidade (Figura 23), sendo tão ou mais eficiente para trabalhos de identificação.

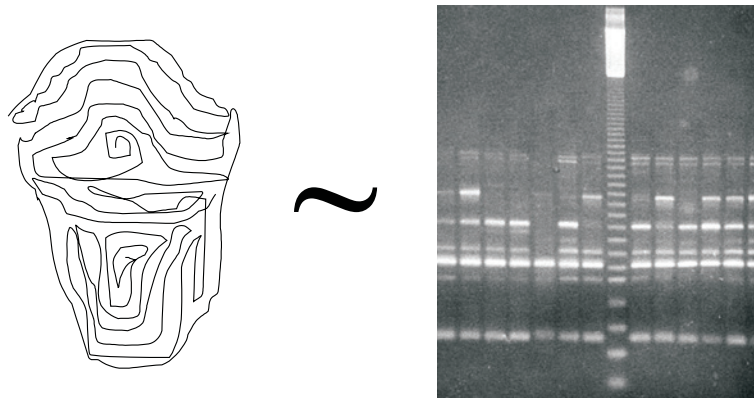


Figura 23. Analogia entre impressão digital e a impressão digital genética obtida com base em marcadores moleculares.

A correta identificação de um material genético animal ou vegetal é essencial. A transferência de resultados e recomendações entre diferentes instituições de pesquisa muitas vezes é dificultada em virtude da identificação errada de materiais genéticos. Erros de identificação podem ser causados por problemas de homonímia (o mesmo nome para diferentes acessos); de sinonímia (diferentes nomes para o mesmo acesso); administração e controle inadequado do material genético; problemas de etiquetagem, mistura de material propagativo (sementes, mudas, garfos para enxertia, estacas, etc.) utilizado na multiplicação do material genético; crescimento de ramos a partir de porta-enxerto em materiais genéticos mantidos no campo, entre outros.

A análise de *fingerprinting* de DNA é uma ferramenta poderosa para a identificação desses erros e tem sido utilizada em vários trabalhos (CAETANO-ANOLLES et al., 1997; SMITH, 1998; YAMADA et al., 2004). Praticamente todos os tipos de marcadores moleculares do DNA podem ser utilizados para a identificação de acessos por *fingerprinting*, embora diferenças relativas ao conteúdo de informação genética por loco, número de polimorfismos detectados, dificuldade e custo da análise são observadas entre os diferentes marcadores (POWELL et al., 1996; RUSSELL et al., 1997; PEJIC, 1998; MCGREGOR et al., 2000; FALEIRO et al., 2004e). De um modo geral, marcadores co-dominantes e multialélicos são os mais indicados para esses estudos.

Caracterização e proteção de cultivares

Entre as várias aplicações dos marcadores moleculares no pós-melhoramento, a caracterização molecular de variedades e cultivares e sua utilização na proteção da propriedade intelectual, ou do direito do obtentor merecem destaque (SCHUSTER et al., 2009). O desenvolvimento e disponibilização de novas variedades e cultivares das mais diversas espécies aumentam a cada ano. Para que os direitos autorais dos obtentores dessas variedades e cultivares possam ser respeitados, legislações específicas são criadas, em diversos países. Em 1961, ocorreu a Convenção Internacional para a Proteção de Cultivares, que resultou na criação da União Internacional para Proteção de Novas Variedades de Plantas (UPOV). Trata-se de um acordo multilateral que determina normas comuns para o reconhecimento e a proteção da propriedade intelectual dos obtentores de novas variedades vegetais (UPOV, 2010). Esse marco regulatório deve ser seguido pelos países signatários ao estabelecerem os certificados de Proteção de Variedades de Plantas (PVP) nas legislações locais (AVIANI et al., 2008).

No Brasil, a proteção de cultivares foi instituída pela Lei nº 9.456, de 25 de abril de 1997, a qual criou o Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC). Para a proteção de uma cultivar no Brasil, alguns requisitos são necessários: (a) ser produto de melhoramento genético; (b) ser de uma espécie passível de proteção no Brasil; (c) não ter sido comercializada no exterior há mais de quatro anos, ou há mais de seis anos, no caso de videiras ou árvores; (d) não ter sido comercializada no Brasil há mais de um ano; (e) ser distinta; (f) ser homogênea e (g) ser estável. Os três últimos requisitos são comprovados por meio dos testes de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE).

A distinguibilidade entre as cultivares é feita por meio do preenchimento de um formulário contendo os descritores mínimos recomendados pelo SNCP. O SNPC, seguindo as recomendações da UPOV, já possui listas de descritores mínimos para um grande número de espécies. Esses descritores baseiam-se principalmente em características morfológicas de sementes, plântulas, folhas, flores e frutos e apresentam algumas limitações como o tempo gasto para realizar as avaliações e a falta de acurácia devido ao efeito ambiental e à sub-

jetividade de alguns descritores. Além disso, com o estreitamento da base genética da maioria das espécies cultivadas, as cultivares apresentam muitos marcadores morfológicos em comum, não podendo ser distinguidos. Nessas situações, o uso de marcadores moleculares pode ser requerido (SCHUSTER et al., 2009). As técnicas moleculares para caracterizar cultivares, apesar de ainda não serem reconhecidas como metodologia oficial, vêm sendo utilizadas para se ter informação adicional em alguns processos de descrição de cultivares para fins de proteção.

As cultivares melhoradas tendem a ser muito parecidas. É de se esperar que, à medida que maior número de cultivares seja caracterizado, será mais difícil discriminar, com base em características morfológicas, as novas cultivares entre as já existentes. Nesse contexto, o uso de marcadores moleculares pode assumir grande importância, uma vez que podem distinguir com facilidade as cultivares, mesmo quando elas possuem a mesma genealogia. Schuster et al. (2009) citam um exemplo em que marcadores moleculares microssatélites permitiram a diferenciação clara e precisa de duas cultivares de soja com 99,22% de parentesco. Apesar da comprovada eficiência dos marcadores moleculares na caracterização de cultivares, ainda não existe metodologia padronizada aceita pelo SNPC para ser utilizada oficialmente ao processo de caracterização e proteção de cultivares.

Considerações finais

Neste capítulo, foram discutidas e exemplificadas as principais aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal. Considerando todas as aplicações discutidas em diferentes etapas, desde a coleta de germoplasma até a caracterização molecular de variedades melhoradas, é difícil imaginar uma cultura ou um programa de pesquisa ou desenvolvimento tecnológico envolvendo germoplasma e (ou) melhoramento genético que não possa ser beneficiado com o uso de tal tecnologia em algumas situações.

É importante mencionar que práticas de avaliação fenotípica contabilizando os efeitos ambientais e das interações genótipo x ambiente

continuarão sendo de grande importância e essenciais para subsidiar a caracterização e utilização prática dos recursos genéticos, bem como para subsidiar os procedimentos de recombinação e seleção realizados em programas de melhoramento genético. Tais avaliações nunca serão substituídas pelos marcadores moleculares. É adequado supor que, em vez de substituição, haverá, na verdade, uma integração cada vez mais intensiva entre as avaliações fenotípicas e os marcadores moleculares. A formação de equipes multidisciplinares e trabalhos envolvendo maior interação entre os pesquisadores ligados à genética molecular e pesquisadores ligados ao desenvolvimento tecnológico vão permitir que marcadores moleculares sejam utilizados de forma prática para resolver problemas, aumentar eficiência, reduzir custos e atender demandas reais das atividades científicas e tecnológicas.

Referências

ABDELNOOR, R. V.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Determination of genetic diversity within brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree data. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 18, p. 265-273, 1995.

AHN, S.; TANKSLEY, S. D. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, n. 17, p. 7980-7984, 1993.

ALZATE-MARIN, A. L.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 333-342, 2006.

AMARAL, M. E.; SABETE, J.; GRANT, J. R.; RIGGS, P. K.; STAFUZZA, N. B.; FILHO, E.; GOLDAMMER, T.; WEIKARD, R.; BRUNNER, R. M.; KOCHAN, K. J.; GRECO, A. J.; JEONG, J.; CAI, Z.; LIN, G.; PRASAD, A.; KUMAR, S.; SARADHI, G. P.; MATHEW, B.; KUMAR, M. A.; MIZIARA, M. N.; MARIANI, P.; CAETANO, A. R.; GALVÃO, S. R.; TANTIA, M. S.; VIJH, R. K.; MISHRA, B.; KUMAR, S. T. B.; PELAI, V. A.; SANTANA, A. M.; FORNITANO, L. C.; JONES, B. C.; TONHATI, H.; MOORE, S.; STOTHARD, P.; WOMACK, J. E. A first generation whole genome RH map of the river buffalo with comparison to domestic cattle. **BMC Genomics**, v. 9, p. 631, 2008.

ARRIEL, N. H. C.; COSTA, M. M.; TREVISOLI, S. H. U.; DI MAURO, A. O. **Outras aplicações dos marcadores moleculares.** In: BOREM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). Marcadores moleculares. Viçosa, MG: Editora Folha de Viçosa, 2009. p. 209-274.

AVIANI, D. M.; SANTOS, F. S.; CARVALHO, I. M.; MACHADO, V. L. S.; PACHECO, L. G. A. **Abordagem sobre proteção e registro de cultivares.** In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L.; RIBEIRO JÚNIOR, W. Q. Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. p. 167-183.

AYAD, W. G.; HODGKIN, T.; JARADAT, A.; RAO, V. R. (Ed.). **Molecular genetic techniques for plant genetic resources.** Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1997. 137 p.

BARBOSA, A. M. M.; GERALDI, I. O.; BENCHIMOL, L. L.; GARCIA, A. A. F.; SOUZA, C. L.; SOUZA, A. P. Relationship of intra– and interpopulation tropical maize single cross hybrid performance and genetic distances computed from AFLP and SSR markers. **Euphytica**, v. 130, p. 87–99, 2003.

BEARZOTI, E. **Mapeamento de QTL.** In: PINHEIRO, J. B.; CARNEIRO, I. F. (Ed.). Análise de QTL no melhoramento de plantas. Goiânia: FUNAPE, 2000. p. 63-223.

BELLON, G.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, N. T. V.; SANTOS, E. C.; BRAGA, M. F.; GUIMARÃES, C. T. Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura,** v. 29, n. 1, p. 124-127, 2007.

BELLON, G.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FONSECA, K. G.; BRAGA, M. F. Variabilidade genética de acessos obtidos de populações cultivadas e silvestres de maracujazeiro doce com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura,** v. 31, n. 1, p. 197-202, 2009.

BERNARDO, R. Relationship between single–cross performance and molecular marker heterozygosity. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 83, p. 628–634, 1992.

BERNARDO, R; YU, J. Prospects for genome wide selection for quantitative traits in maize. **Crop Science**, v. 47, p. 1082-1090, 2007.

BERNARDO, R. Best linear unbiased prediction of maize single-cross performance. **Crop Science**, Madison, v. 36, p. 50-56, 1996.

BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas.** Viçosa, MG: Editora UFV, 1997. 574 p.

BORNER, A.; CHEBOTAR, S.; KORZUN, V. Molecular characterization of the genetic integrity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm after long-term maintenance. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 100, p. 494-497, 2000.

BRASIL. Ministério das Minas e Energia. Secretaria Geral. **Projeto Radam Brasil.** Rio de Janeiro, 1981. 640 p.

BRONDANI, C.; RANGEL, P. H. N.; BRONDANI, R. P. V. FERREIRA, M. E. QTL mapping and introgression of yield related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*O. sativa*) using microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, 104: 1192-1203, 2002.

BRONDANI, C. Variação isoenzimática de três espécies do gênero *Manihot* (Euphorbiaceae) relacionadas morfologicamente à mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v. 31, p. 287-289, 1996.

CABRAL, G. B.; CARVALHO, L. J. C. B.; SCHAAL, R. A. Relationship analysis of closely related species to cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on microsatellite-primed PCR. In: CARVALHO, L. J. C. B.; THRO, A. M.; VILARINHOS, A. D. (Ed.). **Cassava biotechnology – IV International Scientific Meeting – CBN.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/CBN, 2000. p. 36-50.

CAETANO-ANOLLES, G.; CALLAHAN, L. M.; GRESSHOFF, P. M. The origin of bermudagrass (Cynodon) off-types inferred by DNA amplification fingerprinting. **Crop Science**, Madison, v. 37, p. 81-87, 1997.

CARNEIRO, M. S; VIEIRA, M. L. C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia,** Campinas, v. 61, p. 89-100, 2002.

CARVALHO, L. J. C. B.; SCHAAL, B. A.; FUKUDA, W. M. G. Phenetic relationships and genetic diversity among geographic landraces of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) revealed by PCR-based markers. In: CARVALHO, L. J. C. B.; THRO, A. M.; VILARINHOS, A.D. (Ed.). **Cassava biotechnology – IV International Scientific Meeting – CBN.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/CBN, 2000a. p. 65-79.

CARVALHO, L. J. C. B.; SCHAAL, B. A.; FUKUDA, W. M. G. Morphological descriptors and random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker used to assess the genetic diversity of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). In: CARVALHO, L. J. C. B.; THRO, A. M.; VILARINHOS, A. D. (Ed.). **Cassava biotechnology – IV International Scientific Meeting – CBN.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/CBN, 2000b. p. 51-64.

CARVALHO, L. J. C. B.; SCHAAL, B. A.; FUKUDA, W. M. G. Genetic diversity of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in a germplasm collection assessed by RAPD assay. In: CARVALHO, L. J. C. B.; THRO, A. M.; VILARINHOS, A. D. (Ed.). **Cassava biotechnology – IV International Scientific Meeting – CBN.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/CBN, 2000c. p. 80-92.

CERVERA, M. T.; CABEZAS, J. A.; SANCHA, J. C.; MARTINEZ, D. E.; TODA, F.; MARTINEZ-ZAPATER, J. M. Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, p. 51-59, 1998.

CESKA, J. F.; AFFOLTER, J. M.; HAMRICK J. L. Developing a sampling strategy for Baptisia arachnifera based on allozyme diversity. **Conservation Biology,** v. 11, p. 1133–1139, 1997.

CHANDLER, G. T.; BAYER, R. J.; CRISP, M. D. A molecular phylogeny of the endemic Australian genus Gastrolobium (Fabaceae: Mirbelieae) and allied genera using chloroplast and nuclear markers. **American Journal of Botany**, Bronx, v. 88, p. 1675-1687, 2001.

CHANDRA, S.; HUAMAN, Z.; HARI KRISHNA, S.; ORTIZ, R. Optimal sampling strategy and core collection size of Andean tetraploid potato based on isozyme data—a simulation study. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 104. p. 1325–1334, 2002.

CHARCOSSET, A.; BONISSEAU, B.; TOUCHEBEUF, O.; BURSTIN, J.; DUBREUIL, P.; BARRIÈRE, Y.; GALLAIS, A.; DENIS, J. B. Prediction of maize hybrid silage performance using marker data: comparison of several models for specific combining ability. **Crop Science**, Madison, v. 38, p. 38-44, 1998.

CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.; MAYA, M. M.; TOHME, J.; DUQUE, M. C.; IGLESIAS, C.; BONIERBALE, M. W.; KRESOVICH, S.; KOCHERT, G. Using microsatellites, isozymes and AFLPs to evaluate genetic diversity and redundancy in the cassava core collection and to assess the usefulness of DNA-based markers to maintain germplasm collections. **Molecular Breeding,** v. 5, p. 263–273, 1999.

COLLINS, F. S.; GUYER, M. S.; CHAKRAVARTI, A. Variations on a Theme: Cataloging Human DNA Sequence Variation. **Science**, v. 278, p. 1580-1581, 1997.

CORDEIRO, M. C. R.; PINTO, A. C. Q.; RAMOS, V. H. V.; FALEIRO, F. G.; FRAGA, L. M. S. RAPD markers utilization and other parameters in the determination of mango hybrids genitors. **Revista Brasileira de Fruticultura,** v. 28, n. 2, p. 164-167, 2006a.

CORDEIRO, M. C. R.; PINTO, A. C. Q.; RAMOS, V. H. V.; FALEIRO, F. G.; FRAGA, L. M. S. Identificação da origem genética de plântulas em sementes poliembriônicas de mangueira (*Mangifera indica* L.) cv. Rosinha por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura,** v. 28, n. 3, p. 454-457, 2006b.

COSTA, A. M. **Uso de marcadores RAPD e do Sistema de Informação Geográfica no estudo da variabilidade genética e ecológica de** Stylosanthes macrocephala **M. B. Ferr et S. Costa.** 2004. 79 f. Tese (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2004.

COSTA, A. M.; FALEIRO, F. G.; KARIA, C. T.; SHIRATSUCHI, L. S.; ANDRADE, R. P.; LOPES, G. K. B. Variabilidade genética e ecológica de *Stylosanthes macrocephala* determinadas por RAPD e SIG. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 9, p. 899-909, 2005.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 390 p.

DEAN, R. E.; DAHLBERG, J. A.; HOPKINS, M. S.; MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S. Genetic redundancy and diversity among 'orange' accessions in the US National Sorghum Collection as assessed with simple sequence repeat (SSR) markers. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 1215-1221, 1999.

DEKKERS, J. C. M. Commercial application of marker and gene assisted selection in livestock: strategies and lessons. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 313-328, 2004.

DEL RIO, A. H.; BAMBERG, J. B.; HUAMAN, Z.; SALAS, A.; VEJA, S. E. Assessing changes in the genetic diversity of potato gene banks. 2. In situ vs ex situ. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 95, p. 199-204, 1997a.

DEL RIO, A. H.; BAMBERG, J. B.; HUAMAN, Z. Assessing changes in the genetic diversity of potato gene banks. 1. Effects of seed increase. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 95, p. 191-198, 1997b.

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

EATHINGTON, S. R.; DUDLEY, J. W.; RUFENER II, G. K. Usefulness of marker-QTL association in early generation selection. **Crop Science**, v. 37, p. 1686-1693, 1997.

FALEIRO, A. S. G.; FALEIRO, F. G; LOPES, U. V; MELO, G. R. P.; MONTEIRO, W. R.; YAMADA, M. M.; BAHIA, R. C. S.; CORRÊA, R. X. Variability in cacao selected by producers for resistance to witches' broom based on microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 4, p. 290-297, 2004e.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p. il.

FALEIRO, F. G. Seleção assistida por marcadores moleculares – Diferentes aplicações. Mesa Redonda. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2, 2003. Porto Seguro, **Anais...** 2003. Londrina, Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2003g. 1 CD-ROM. 6 p.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, R. P.; KARIA, C. T.; CORDEIRO, M. C. R.; SOUZA, T. L. P. O.; MÉRIDA, J. L. Similaridade genética de acessos de *Arachis pintoi* com diferentes níveis de produtividade de matéria seca com base em marcadores RAPD. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...** Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2003a. 1 CD-ROM. 5 p.

FALEIRO, F. G.; BARROS, A. M.; FALEIRO, A. S. G.; CORDEIRO, M. C. R.; KARIA, C. T.; GOMES, A. C.; ANDRADE, R. P. Caracterização molecular e estabelecimento de coleção de trabalho de *Stylosanthes macrocephala* com base em marcadores RAPD. In: In REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2003c. 1 CD-ROM. 7 p.

FALEIRO, F. G.; FERNANDES, F. D.; KARIA, C. T.; BELLON, G.; RAMOS, A. K. B.; MARTHA JÚNIOR, G. B.; ANDRADE, R. P.; JANK, L. Diversidade genética de uma coleção de trabalho de *Panicum maximum* com base em marcadores moleculares. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004c. CD-ROM. 5 p.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Caracterização de germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro assistidos por marcadores moleculares: resultados de pesquisa 2005-2008.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. (Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 207).

FALEIRO, F. G.; KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P.; BARROS, A. M.; SILVA, D. O. C. Diversidade genética de uma coleção de trabalho de *Stylosanthes guianensis* com base em marcadores RAPD. In REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...** Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2003b. 1 CD-ROM. 6 p.

FALEIRO, F. G.; KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P.; RAMOS, A. K. B. Seleção de genitores de *Stylosanthes guianensis* utilizando a diversidade genética analisada com base em características morfológicas, agronômicas e moleculares. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Brasília, Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004b. 1 CD-ROM. 6 p.

FALEIRO, F. G.; LOPES, U. V.; YAMADA, M. M.; MELO, G. R. P.; MONTEIRO, W. R.; PIRES, J. L.; ROCHA, J. B.; BAHIA, R. C. S.; GOMES, L. M. C.; ARAÚJO, I. S.; FALEIRO, A. S. G. Genetic diversity of cacao accessions selected for resistance to witches' broom disease based on RAPD Markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 4, p. 12-17, 2004d.

FALEIRO, F. G.; LOPES, U. V.; YAMADA, M. M.; PIRES, J. L.; BAHIA, R. C. S.; SANTOS, R. S.; GOMES, L. M. C.; ARAÚJO, I. S.; FALEIRO, A. S. G.; GRAMACHO, K. P.; MELO, G. R. P.; MONTEIRO, W. R.; VALLE, R. R. Caracterização de variedades clonais de *Theobroma cacao* L. com base em marcadores RAPD, AFLP e microssatélites. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 13, p. 79-86, 2001a.

FALEIRO, F. G.; PINTO, A. C. Q.; CORDEIRO, M. C. R.; ANDRADE, S. R. M.; RAMOS, V. H. V.; BELLON, G.; DIAS, J. N. Genetic variability of mango cultivars developed by Embrapa Cerrados Program using RAPD markers. **Acta Horticulturae**, v. 820, p. 177-181. 2009.

FALEIRO, F. G.; PINTO, A. C. Q.; CORDEIRO, M. C. R.; RAMOS, V. H. V.; BELLON, G.; ANDRADE, S. R. M.; PINTO, J. F. N. Genetic variability of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars used in the Embrapa Cerrados breeding program using RAPD markers. **Acta Horticulturae**, 2010 (no prelo).

FALEIRO, F. G.; PIRES, J. L.; LOPES, U. V. Uso de marcadores moleculares RAPD e microssatélites visando a confirmação da fecundação cruzada entre *Theobroma cacao* e *Theobroma grandiflorum*. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 15, p. 41-46, 2003d.

FALEIRO, F.G.; PIRES, J.L.; MONTEIRO, W.R.; LOPES, U.V.; YAMADA, M.M.; PIEDRA, A.G.; MOURA, A.D., ARÉVALO-GARDINI, E.; MARQUES, J.R.B.; GRAMACHO, K.P.; FALEIRO, A.S.G.; SANTOS, M.C.M. Variability in cacao accessions from the Brazilian, Ecuadorian, and Peruvian Amazons based on molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology,** Viçosa, MG, v. 4, p. 227-233, 2004a.

FALEIRO, F. G.; QUEIROZ, V. T.; LOPES, U. V.; GUIMARÃES, C. T.; PIRES, J. L.; YAMADA, M. M.; ARAÚJO, I. S.; PEREIRA, M. G.; SCHNELL, R.; SOUZA FILHO, G. A.; FERREIRA, C. F.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Mapping QTLs for Witches' Broom (*Crinipellis perniciosa*) Resistance in cacao (*Theobroma cacao* L.). **Euphytica**, v. 149, p. 227-235, 2006.

FALEIRO, F. G.; RAGAGNIN, V. A. CORRÊA, R. X.;VINHADELLI, W. S.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Inheritance of the rust resistance of the common bean cultivar Ouro Negro (Honduras-35) and identification of linked rapd markers. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 44, p. 105-106, 2001b.

FALEIRO, F. G.; RAGAGNIN, V. A. CORRÊA, R. X.;VINHADELLI, W. S.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Ligação gênica da resistência à ferrugem e à antracnose na variedade de feijão ouro negro. **Revista Ceres**, v. 47, p. 375-382, 2000b.

FALEIRO, F. G.; RAGAGNIN, V. A.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Use of molecular markers to accelerate the breeding of common bean lines resistant to rust and anthracnose. **Euphytica**, v. 138, p. 213-218, 2004f.

FALEIRO, F. G.; RAGAGNIN, V. A.; SHUSTER, I.; CORRÊA, R. X.; GOOD-GOD, P. I.; BROMMONSHENKEL, S. H.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro-comum à ferrugem, antracnose e mancha-angular com o auxílio de marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 28, p. 59-66, 2003e.

FALEIRO, F. G.; SCHUSTER, I.; RAGAGNIN, V. A.; CRUZ, C. D.; CORRÊA, R. X.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Caracterização de linhagens endogâmicas recombinantes e mapeamento de locos de características quantitativas associadas a ciclo e produtividade do feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, p. 1387-1397, 2003f.

FALEIRO, F. G.; VINHADELLI, W. S.; RAGAGNIN, V. A.; CORRÊA, R. X.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. RAPD markers linked to a block of genes confering rust resistance to the commom bean. **Genetics and Molecular Biology,** Riberão Preto, v. 23, p. 399-402, 2000a.

FALEIRO, F. G.; YAMADA, M. M.; LOPES, U. V.; FALEIRO, A. S. G.; BAHIA, R. C. S.; GOMES, L. M. C.; SANTOS, R. C.; SANTOS, R. F. Genetic similarity of *Theobroma cacao* L. accessions maintained in duplicates in the Cacao Research Center germplasm collection, based on RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 2, p. 435-440, 2002.

FERREIRA, J. J.; ALVAREZ, E.; FUEYO, M. A.; ROCA, A.; GIRALDEZ, R. Determination of the outcrossing rate of *Phaseolus vulgaris* L. using seed protein markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 113, p. 257-261, 2000.

FERREIRA, M. E.; FALEIRO, F. G. Biotecnologia: avanços e aplicações no melhoramento genético vegetal. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L. **Savanas:** desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. p. 765-792.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Genética de associação em plantas.** In: BOREM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). Marcadores moleculares. Viçosa, MG: Editora Folha de Viçosa, 2009. p. 327-370.

FERREIRA, M. E.; RANGEL, P. H. N. **Emprego de espécies silvestres no melhoramento genético vegetal: experiência em outras espécies com análise de retrocruzamento avançado de QTLs (AB-QTL).** In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). Maracujá, germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 111-140.

FONSECA, K. G.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; PEIXOTO, J. R.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, K. P.; SANTOS, E. C. Análise da recuperação do genoma recorrente em maracujazeiro-azedo com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura,** v. 31, n. 1, p. 145-153, 2009.

GEPTS, P. Genetic markers and core collections. In: HODGKIN, T.; BROWN, A. H. D.; HINTUM, TH. J. L. VAN; MORALES, E. A. V. (Ed.). **Core Collections of Plant Genetic Resources.** Chichester: John Wiley & Sons, 1995. p. 127-146.

GETHI, J. G.; LABATE, J. A.; LAMKEY, K. R.; SMITH, M. E.; KRESOVICH, S. SSR variation in important U. S. maize inbred lines. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 4, p. 952-957, 2002.

GHISLAIN, M.; ZHANG, D.; FAJARDO, D.; HUAMAN, Z.; HIJMANS, R. J. Marker-assisted sampling of the cultivated Andean potato *Solanum phureja* collection using RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 46, p. 547-555, 1999.

GODDARD, M. E.; HAYES, B. J. Genomic selection. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 124, p. 323-330, 2007.

GOTO, S.; THAKUR, R. C.; ISHII, K. Determination of genetic stability in long-term micropropagated shoots of *Pinus thunbergii* Parl. using RAPD markers. **Plant Cell Reports**, New York, v.18, p. 193-197, 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; FERREIRA, M. E. **Mapeamento físico e clonagem posicional.** In: BOREM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). Marcadores moleculares. Viçosa, MG: Editora Folha de Viçosa, 2009. p. 275-326.

GREENE, S. L.; HART, T. C.; AFOONIN, A. Using geographic information to acquire wild crop germoplasm for ex situ collections: II. Post-collection analysis. **Crop Science**, v. 39, p. 843-849, 1999.

GRENIER, C; DEU, M.; KRESOVICH, S.; BRAMEL-COX, P. J.; HAMON, P. Assessment of genetic diversity in three subsets constituted from the ICRISAT sorghum collection using random vs non-random sampling procedures B. Using molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 101, p. 197-202, 2000.

GUARINO, L.; JARVIS, A.; HIJMANS, R. J.; MAXTED, N. Geographic information systems (GIS) and the conservation and use of plant genetic resource. In: EGELS, J. M. M.; RAMATHA RAO, V.; BROWN, A. H. D.; JACKSON, M. T. (Ed.). **Managing plant genetic diversity.** Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 387-404.

GUIMARÃES, C. T.; MOREIRA, M. A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas.** Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. p. 715-740.

GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I.; MAGALHÃES, J. V.; SOUZA JÚNIOR, C. L. Marcadores moleculares no melhoramento. In: BOREM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares.** Viçosa, MG: Editora Folha de Viçosa, 2009. p. 129-176.

GUIMARÃES, P. S.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; LÜDERS, R. R.; SOUZA, A. P.; LABORDA, P. R.; OLIVEIRA, K. M.; Correlação da heterose de híbridos de milho com divergência genética entre linhagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 6, p. 811-16, 2007.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics.** 2. ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. Publishers, 1989. 682 p.

HINTUM, TH. J. L. VAN; VISSER, D. L. Duplication within and between germplasm collections. II. Duplication in four European barley collections. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 42, p. 135-145, 1995.

HINTUM, TH. J. L. VAN; BOUKEMA, I. W.; VISSER, D. L. Reduction of duplication in a Brassica oleracea germplasm collection. **Genetic Resources and Crop Evolution,** v. 43, p. 343-349, 1996.

HOKANSON, S. C.; SZEWC-MCFADDEN, A. K.; LAMBOY, W. F.; MCFERSON, J. R. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a Malus x domestica borkh. core subset collection. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, p. 671-683, 1998.

HUAMAN, Z.; ORTIZ, R.; ZHANG, D. P.; RODRIGUEZ, F. Isozyme analysis of entire and core collections of *Solanum tuberosum* subsp *andigena* potato cultivars. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 273-276, 2000.

HUANG, H. W.; LAYNE, D. R.; RIEMENSCHNEIDER, D. E. Genetic diversity and geographic differentiation in pawpaw [*Asimina triloba* (L) Dunal] populations from nine states as revealed by allozyme analysis. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 123, p. 635-641, 1998.

HUANG, X.; BÖRNER, A.; RÖDER, M.; GANAL, M. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 105, p. 699-707, 2002.

ISABEL, N.; TREMBLAY, L.; MICHAUD, M.; TREMBLAY, F. M.; BOUSQUET, J. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 86, p. 81-87, 1993.

JUNQUEIRA, K. P.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BELLON, G.; RAMOS, J. D.; BRAGA, M. F.; SOUZA, L. S. Confirmação de híbridos interespecíficos artificiais no gênero *Passiflora* por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura,** v. 30, n. 1, p. 191-196, 2008.

KARP, A.; KRESOVICH, S.; BHAT, K. V.; AYAD, W. G.; HODGKIN, T. **Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies.** Rome: IPGRI. 1997. 47 p. (Technical Bulletin, 2).

KELLER, B.; FEUILLET, C. Colinearity and gene density in grass genomes. **Trends in Plant Science**, London, v. 5, n. 6, p. 246-251, 2000.

KIM, S. C.; CRAWFORD, D. J.; JANSEN, R. K.; SANTOS-GUERRA, A. The use of a non-coding region of chloroplast DNA in phylogenetic studies of the subtribe Sonchinae (Asteraceae: Lactuceae). **Plant Systematics and Evolution,** New York, v. 215, p. 85–99, 1999.

LAKSHMI, M.; RAJALAKSHMI, S.; PARANI, M.; ANURATHA, C. S.; PARIDA, A. Molecular phylogeny of mangroves I. Use of molecular markers in assessing the intraspecific genetic variability in the mangrove species *Acanthus ilicifolius* Linn. (Acanthaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 94, p. 1121-1127, 1997.

LAMBOY, W. F.; MCFERSON, J. R.; WESTMAN, A. L.; KRESOVICH, S. Application of isozyme data to the management of the United States national *Brassica oleracea* L. genetic resources collection. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 41, p. 99-108, 1994.

LAMBOY, W. F.; YU, J.; FORSLINE, P. L.; WEEDEN, N. F. Partitioning of allozyme diversity in wild populations of *Malus sieversii* L. and implications for germplasm collection. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 121, p. 982-987, 1996.

LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. **Genetics**, v. 124, p. 743-756, 1990.

LI, C. T.; SHI, C. H.; WU, J. G.; XU, H. M.; ZHANG, H. Z.; REN, Y. L. Methods of developing core collections based on the predicted genotypic value of rice (Oryza sativa L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 108, p. 1172–1176, 2004.

LIVINI, C.; AJMONE-MARSAN, P.; MELCHINGER, A. E.; MESSEMER, M. M.; MOTTO, M. Genetic diversity of maize inbred lines within and among heterotic group revealed by RFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 84, p. 17-25, 1992.

MARITA, J. M.; RODRIGUEZ, J. M.; NIENHUIS, J. Development of an algorithm identifying maximally diverse core collections. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 47, p. 515–526, 2000.

McGREGOR, C. E.; LAMBERT, C. A.; GREYLING, M. M.; LOUW, J. H.; WARNICH, L. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. **Euphytica**, Wageningen, v. 113, p. 135-144, 2000.

McGREGOR, C. E.; TREUREN, R. Van; HOEKSTRA, R.; HINTUM, Th. J. L. VAN. Analysis of the wild potato germplasm of the series Acaulia with AFLPs: implications for ex situ conservation. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 104, p. 146-156, 2002.

MILACH, S. C. K. Seleção assistida por marcadores moleculares em programas de melhoramento genético vegetal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1., 2001. 1 CD-ROM.

MILACH, S. C. K.; CRUZ, R. P. Piramidização de genes de resistência às ferrugens em cereais. **Ciência Rural**, v. 27, p. 685-689, 1997.

MOORE, G.; DEVOS, K. M.; WANG, Z.; GALE, M. D. Cereal Genome Evolution: Grasses, line up and from a circle. **Current Biology,** London, v. 5, n. 7, p. 737-749, 1995.

MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G.; PIOVESAN, N. D.; SCHUSTER, I.; OLIVEIRA, M. G. A.; SEDIYAMA, C. S. Programa de melhoramento genético da qualidade da soja para agroindústria em desenvolvimento na UFV. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1., 2001. 1 CD-ROM.

MUSCHNER, V. C. **Filogenia molecular, taxas evolutivas, tempo de divergencia e heranca organelar em** Passiflora **L. (Passifloraceae).** 162 f. 2005. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

NEBAUER, S. G.; DEL CASTILLO-AGUDO, L.; SEGURA, J. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing willow-leaved foxglove (*Digitalis obscura* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 98, p. 985-994, 1999.

NICOLOSI, E.; DENG, Z. N.; GENTILE, A.; LA MALFA, S.; CONTINELLA, G.; TRIBULATO, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 100, p. 1155-1166, 2000.

OLSEN, K. M.; SCHAAL, B. A. Evidence on the origin of cassava: phylogeography of *Manihot esculenta*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 96, p. 5586-5591, 1999.

OPENSHAW, S. J.; JARBOE, S. G.; BEAVIS, W. D. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: ASHS/CSSA JOIN PLANT BREEDING SYMPOSIUM, 2., Corvallis. **Proceedings...** Corvallis: Oregon State University, 1994.

OUBORG, N. J.; PIQUOT, Y.; VAN GROENENDAEL, J. M. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 87, p. 551-568, 1999.

PARZIES, H. K.; SPOOR, W.; ENNOS, R. A. Genetic diversity of barley landrace accessions (*Hordeum vulgare* ssp *vulgare*) conserved for different lengths of time in ex situ gene banks. **Heredity**, Edinburgh, v. 84, p. 476-486, 2000.

PEJIC, I.; AJMONE-MARSAN, P.; MORGANTE, M.; KOZUMPLICK, V.; CASTIGLIONI, P.; TARAMINO, G.; MOTTO, M. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, p. 1248-1255, 1998.

PEREIRA, M. G.; LEE, M.; BRAMEL-COX, P.; WOODMAN, W.; DOEBLEY, J.; WHITKUS, R. Construction of an RFLP map in sorghum and comparative mapping in maize. **Genome,** v. 37, p. 236–243, 1994.

PEREIRA, M. G.; PEREIRA, T. N. S.; COSTA, F. R. Marcadores moleculares no pré-melhoramento. In: BOREM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares.** Viçosa, MG: Editora Folha de Viçosa, 2009. p. 102-128.

PINTO, L. R. M.; PIRES, J. L. **Seleção de plantas de cacau resistentes à vassoura-de-bruxa**. Ilhéus: Ceplac/Cepec, 1998. 35 p. (Boletim técnico, 181).

PINTO, A. C. Q.; FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; CORDEIRO, M. C. R.; ANJOS, J. R. N.; JUNQUEIRA, N. T. V.; RAMOS, V. H. V.; BRAGA, M. F.; ROSSETO, C. J.; SOUZA, V. A. B.; COSTA, J. G.; SCAVANACA JÚNIOR, L.; DIAS, J. N. **Melhoramento genético da mangueira em ambiente tropical por meio da hibridação intervarietal e com auxílio de marcadores moleculares.** In: ANDRADE, S. R. M.; FALEIRO, F. G.; SERENO, J. R. B.; CORTE, J. L. D.; SOUSA, E. S. Resultados de Pesquisa para o Cerrado 2004-2005. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. p. 27-36.

PIRES, J. L.; MARITA, J. M.; LOPES, U. V.; YAMADA, M. M.; AITKEN, W. M.; MELO, G. P.; MONTEIRO, W. R.; AHNERT, D. Diversity for phenotypic traits and molecular markers in CEPEC's germplasm collection in Bahia, Brazil. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL WORKSHOP ON NEW TECHNOLOGIES AND COCOA BREEDING, 16-17, 2000, Kota Kinabalu, Ingenic, 2000. p. 72-88.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 2, p. 225-238, 1996.

RAINA, S. N.; RANI, V.; KOJIMA, T.; OGIHARA, Y.; SINGH, K. P.; DEVARUMATH, R. M. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (Arachis hypogaea) cultivars and wild species. **Genome**, Ottawa, v. 44, p. 763-772, 2001.

REEDY, M. E.; KNAPP, A. D.; LAMKEY, K. R. Isozyme allelic frequency changes following maize (*Zea mays* L.) germplasm regeneration. **Maydica**, Bergamo, v. 40, p. 269-273, 1995.

RESENDE, M. D. V.; LOPES, P. S.; SILVA, R. L.; PIRES, I. E. Seleção genômica ampla (GWS) e maximização da eficiência do melhoramento genético. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 56, p. 63-77, 2008.

RICK, C. M.; ZOBEL, R. W.; FOBES, J. F. Four peroxidase loci in red-fruited tomato species: genetics and geographic distribution. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 71, p. 835-839, 1974.

RUSSELL, J. R.; FULLER, J. D.; MACAULAY, M.; HATZ, B. G.; JAHOOR, A.; POWELL, W.; WAUGH, R. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 95, p. 714-722, 1997.

SCHAEFFER, L. R. Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 123, p. 218-223, 2006.

SCHUSTER, I.; VIEIRA, E. S. N.; PADILHA, L. **Marcadores moleculares no pós-melhoramento.** In: BOREM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). Marcadores moleculares. Viçosa, MG: Editora Folha de Viçosa, 2009. p. 102-128.

SEWELL, M. M.; SHERMAN, B. K.; NEALE, D. B. A consensus map for Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.): I. Construction and integration of individual linkage maps from two outbred three-generation pedigrees. **Genetics,** Baltimore, v. 151, n. 1, p. 321-330, 1999.

SKROCH, P. W.; NIENHUIS, J.; BEEBE, S.; TOHME, J.; PEDRAZA, F. Comparison of Mexican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) core and reserve germplasm collections. **Crop Science**, Madison, v. 38, p. 488-496, 1998.

SMITH, O. S.; SMITH, J. S. C.; BOWEN, S. L.; TENBORG, R. A.; WALL, S. J. Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F_1 grain yield, heterosis, and RFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 80, p. 833–840, 1990.

SMITH, S. Cultivar identification and varietal protection. In: CAETANO ANNOLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. (Ed.). **DNA markers:** Protocols, applications and overviews. New York: Wiley VCH, 1998. p. 383-400.

SPAGNOLETTI-ZEULI, P. L.; SERGIO, L.; PERRINO, P. Changes in the genetic structure of wheat germplasm accessions during seed rejuvenation. **Plant Breeding**, Berlin, v. 114, p. 193-198, 1995.

STEINER, A. M.; RUCKENBAUER, P.; GOECKE, E. Maintenance in genebanks, a case study: contaminations observed in the Nurnberg oats of 1831. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 44, p. 533-538, 1997.

TAI, P. Y. P.; MILLER, J. D. A core collection for *Saccharum spontaneum* L. from the world collection of sugarcane. **Crop Science**, Madison, v. 41, p. 879-885, 2001.

TANKSLEY, S. D.; JONES, R. A. Application of alcohol dehydrogenase allozymes in testing the genetic purity of F1 hybrids of tomato. **HortScience**, Alexandria, v. 16, p. 179-181, 1981.

TANKSLEY, S. D.; GANAL, M. W.; MARTIN, G. B. Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. **Trends Genetics**. v. 11, p. 63-68, 1995.

TANKSLEY, S. D.; GRANDILLO, S.; FULTON, T. M.; ZAMIR, D.; ESHED, Y.; PETIARD, V.; LOPEZ, J.; BECK-BUNN, T. Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, p. 213-224, 1996.

TOHME, J.; GONZALEZ, D. O.; BEEBE, S. DUQUE, M. C. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. **Crop Science**, Madison, v. 36, p. 1375-1384, 1996.

TREUREN, R. VAN; HINTUM, TH. J. L. VAN Identification of intra-accession genetic diversity in selfing crops using AFLP markers: implications for collection management. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 48, p. 287-295, 2001.

UPADHYAYA, H. D.; ORTIZ, R. A mini core subset for capturing diversity and promoting utilization of chickpea genetic resources in crop improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 102, p. 1292-1298, 2001.

UPOV. International Union for the Protection of New Varieties of Plants. INTERNATIONAL CONVENTION FOR THE PROTECTION OF NEW VARIETIES OF PLANTS, 1978, Geneva. **Act of 1978**. Disponível em: <http://www.upov.int/en/publications/conventions/1978/content.htm>. Acesso em: 18 dez. 2009.

VALOIS, A. C. C.; SALOMÃO, A. N.; ALLEM. A. C. (Ed.). **Glossário de recursos genéticos.** Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1996. 62 p.

VALOIS, A. C. C.; SALOMAO, A. L.; ALLEM, A. C. (Ed.). **Glossário de recursos genéticos vegetais.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/recgen/sibrargen/glossario/welcome.html>. Acesso em: 15 out. 2009.

VASCONCELOS, M. J.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A.; VIEIRA, C. Genetic diversity of the common bean *Phaseolus vulgaris* L. determined by DNA-based molecular markers. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 19, p. 447-451, 1996.

VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. F.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G.; FONSECA, K. G.; CARVALHO, L. J. C. B.; SILVA, M. S.; PAULA-MORAES, S. V.; SANTOS FILHO, M. O. S.; SILVA, K. N. Divergência genética entre acessos açucarados e não açucarados de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 12, p. 1707-1715, 2008.

VIRK, P. S.; NEWBURY, H. J.; JACKSON, M. T.; FORD-LLOYD, B. V. The identification of duplicate accessions within a rice germplasm collection using RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 90, p. 1049-1055, 1995.

PINHO, E. V. R. VON; PINHO, R. G. VON; CÍCERO, S. M. Efeito da contaminação genética em campos de produção de sementes sobre o comportamento de diferentes híbridos de milho (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 18, n. 2, p. 256-261, 1996.

WAYCOTT, W.; FORT, S. B. Differentiation of nearly identical germplasm accessions by a combination of molecular and morphologic analyses. **Genome**, Ottawa, v. 37, p. 577-583, 1994.

WU, X. M.; WU, N. F.; QIAN, X. Z.; LI, R. G.; HUANG, F. H.; ZHU, L. Phenotypic and genotypic changes in rapeseed after 18 years of storage and regeneration. **Seed Science Research**, Oxon, v. 8, p. 55-64, 1998.

XIAO, J. H.; GRANDILLO, S., AHN, S. N.; MCCOUCH, S. R.; TANKSLEY, S. D.; LI, J. M.; YUAN, L. P. Genes from wild rice improve yield. **Nature**, v. 384, p. 223-224, 1996.

YAMADA, M. M.; LOPES, U. V. Paternity analysis of cacao trees selected for resistance to witches' broom disease in plantations of Bahia, Brazil. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 11, p. 83-88, 1999.

YAMADA, M. M.; GAIOTTO, F.A.; FLORES, A. B.; FALEIRO, F. G. Parent pair analysis of cacao trees selected in farms for resistance to *Moniliophthora perniciosa* using microsatellites. **Agrotrópica**, v. 21, n. 2, p. 123-126, 2009

YAMADA, M. M.; FALEIRO, F. G.; LOPES, U. V.; DANTAS NETO, A.; PIRES, J. L.; FLORES, A. B.; FALEIRO, A. S. G.; BAHIA, R. C. S. Use of RAPD markers in the germplasm collection of the Cacau Reseach Center (CEPEC) for genotype identification. **Agrotrópica**, v. 16, n. 2, p. 35-38, 2004.

YOUNG, N. D.; TANKSLEY, S. D. Restriction fragment length polymorphism maps and the concept of graphical genotypes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 77, p. 95-101. 1989.

ZIMMERER, K. S.; DOUCHES, D. S. Geographical approaches to crop conservation: the partitioning of genetic diversity in Andean potatoes. **Economic Botany**, New York, v. 45, p. 176-189, 1991.

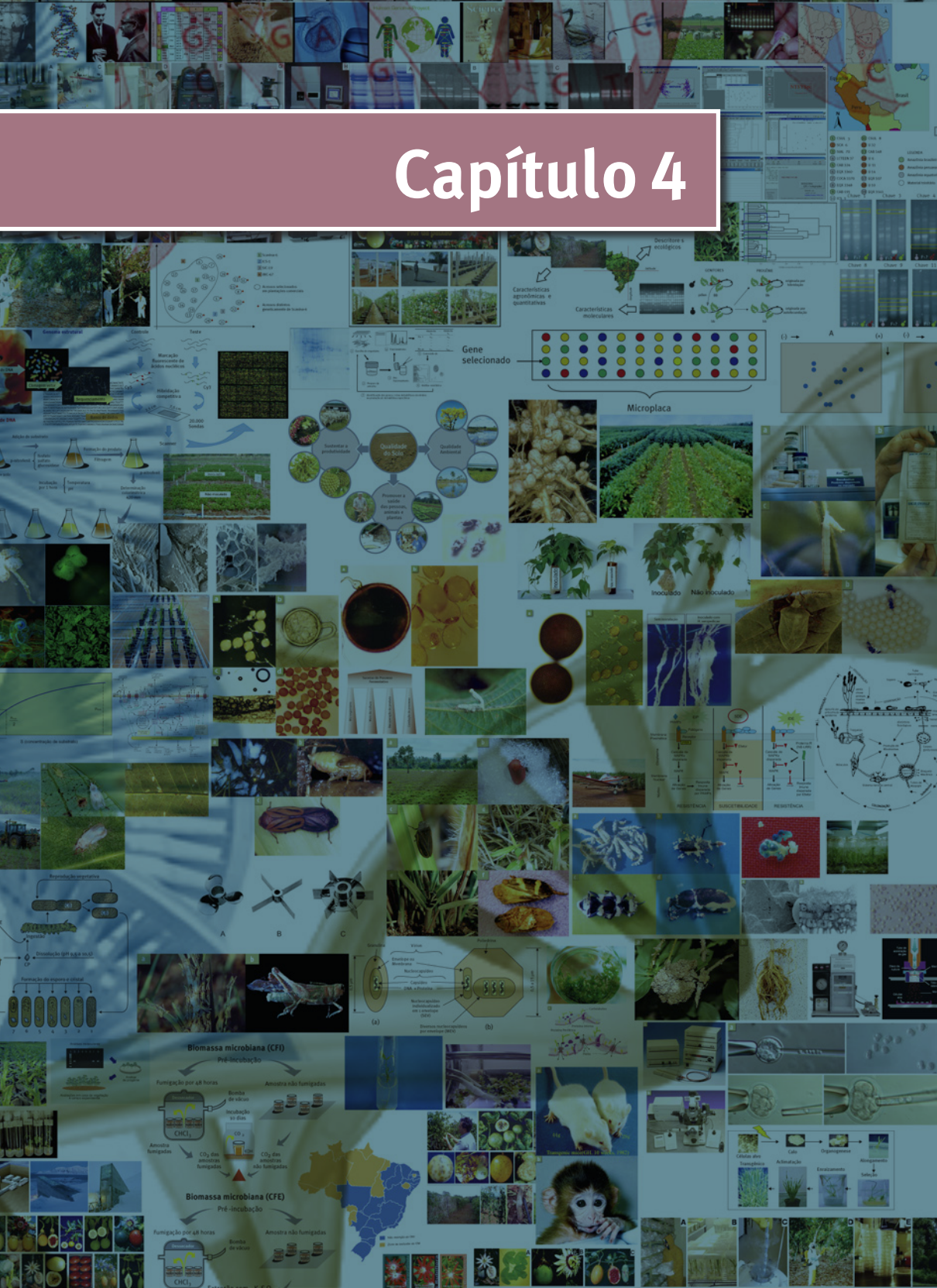
ZORO BI, I.; MAQUET, A.; DEGREEF, J.; WATHELET, B.; BAUDOIN, J. P. Sample size for collecting seeds in germplasm conservation: the case of the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, p. 187-194, 1998.

Bibliografia Complementar

BOREM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares.** Viçosa, MG: Editora Folha de Viçosa, 2009. 532 p.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.


Capítulo 4
Gene selecionado
Microplaca
Inoculado
Não inoculado
Biomassa microbiana (CFI)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas
Biomassa microbiana (CFE)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas

Prospecção gênica e bioinformática

Ana Maria Costa

Introdução

A biotecnologia vem contribuindo significativamente para a geração de novos produtos como fármacos e alimentos. Genes isolados de diferentes organismos hoje são transferidos para outros, conferindo-lhes novas propriedades. Por exemplo, a insulina disponível para tratamento do diabetes e o hormônio GH utilizado no controle de distúrbios do crescimento, que antes eram extraídos de suínos e cadáveres, são produzidos atualmente por microorganismos portadores de genes humanos construídos por engenharia genética. Como resultado, a sociedade pôde usufruir de medicamentos de melhor qualidade a preços mais acessíveis e sem os riscos à saúde decorrentes do processo de obtenção antigo.

Hoje a indústria biotecnológica emprega microorganismos, plantas e animais como biofábricas de substâncias de interesse. Plantas e animais geneticamente modificados estão sendo construídos para usos especiais dos mais diversos. Como por exemplo, temos os "alimentos vacinas", que são alimentos que carregam informações genéticas que promovem imunização para diferentes doenças e fibras de alta qualidade para confecção de tecidos produzidos no leite de animais (TRIPURANI et al., 2003; BOLDUC; LAZARIS, 2002).

Na agropecuária, a biotecnologia vem contribuindo para acelerar os programas de melhoramento genético. Os marcadores moleculares do DNA, regiões que cossegregam com genes de interesse, são empregados para selecionar plantas e animais que apresentem as propriedades desejadas antes que elas se manifestem. Permitindo, assim, que produtos dos cruzamentos sejam selecionados logo nas primeiras etapas do desenvolvimento da planta ou do embrião de animais, economizando tempo e recursos dos programas de pesquisa.

É evidente, portanto, a importância da biotecnologia para a melhoria da qualidade de vida do homem. A questão é: como são identifi-

cados os genes de interesse para a construção de organismos geneticamente modificados e marcadores moleculares? A seguir serão apresentadas algumas estratégias comumente empregadas pelos profissionais da área.

Projetos genoma

Os projetos genomas foram criados para compreender as bases do funcionamento dos seres vivos. É a partir das informações geradas nesses estudos que se obtêm os segmentos genômicos utilizados no desenvolvimento biotecnológico.

Genoma estrutural

A palavra "genoma" foi cunhada por Hans Winkler, em 1920, como uma conjugação de gene e cromossomo. No entanto, o conceito geral de genoma pode ser atribuído ao século IV antes da era cristã, quando Aristóteles apontou os primeiros conceitos em relação à hereditariedade. Embora os trabalhos de Mendel no final do século XIV tenham trazido grandes contribuições no campo da hereditariedade, essa área mostrava-se ainda bastante abstrata. Com o avanço dos métodos científicos e das tecnologias, a hereditariedade passou a ser associada às estruturas presentes no núcleo das células chamadas cromossomos (final do século XIX e início do século XX) e finalmente com os polímeros de nucleotídeos dupla-fita chamados de DNA (meados do século XX) que formam os cromossomos (COSTA; MARTINS, 2010).

No DNA, encontram-se codificados segmentos associados à expressão de cadeias polipeptídicas e regiões estruturais diversas, importantes na manutenção da estrutura do cromossomo e divisão celular. Denomina-se de genoma estrutural ao conjunto das informações contidas nos cromossomos e de projeto genoma estrutural ao programa de pesquisa que vem determinando a ordem das bases nitrogenadas dos polímeros de DNA dos genomas de diversos organismos (Figura 1). Os resultados do sequenciamento dos segmentos clonados são depositados nos bancos de dados internacionais, sendo o mais comum e mais importante na atualidade o do NCBI (NCBI, 2009

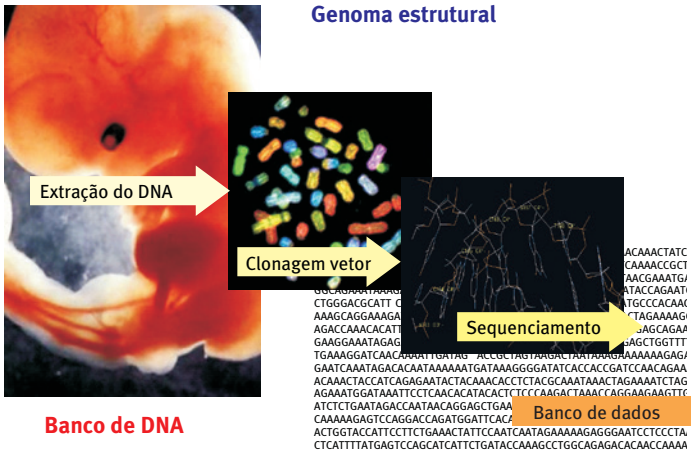


Figura 1. Sequência de eventos para obtenção das informações genéticas que alimentam o banco de dados do genoma estrutural a partir de um banco de DNA.

Genoma funcional

Todas as células de um mesmo indivíduo, salvo algumas exceções, possuem o mesmo genoma estrutural, ou seja, apresentam todas as informações genéticas necessárias para gerar um organismo inteiro. Contudo, cada célula, ao se especializar, passa a expressar somente uma parte dessas informações. Nos estudos de genômica funcional, obtêm-se as informações do que está sendo expresso nas células e tecidos (RNAs e proteínas) do organismo. Como se trata de uma análise fenotípica, as informações expressas podem se modificar em função das variações ambientais, tais como temperatura, umidade, nutrição, estágio de desenvolvimento e idade do organismo.

A genômica funcional, portanto, compreende a análise das sequências de RNAs mensageiros e do padrão proteico codificado pelo genoma estrutural numa determinada condição ambiental. São chamados de transcriptomas os bancos de genéticos construídos com os RNAs de um determinado tipo celular (Figura 2). O estudo proteômico determina o padrão de proteínas/peptídeos peculiar à cada tipo celular (Figura 3). E o estudo metabolômico avalia e organiza em mapas metabólicos os compostos químicos resultantes da expressão gênica (Figura 4).

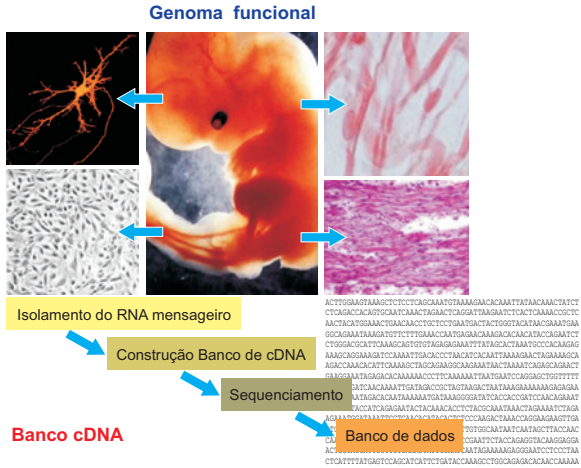


Figura 2. Sequência de eventos para obtenção das informações genéticas expressas na forma de RNA mensageiro (transcriptoma) para compor o banco de dados do genoma funcional de transcritos.

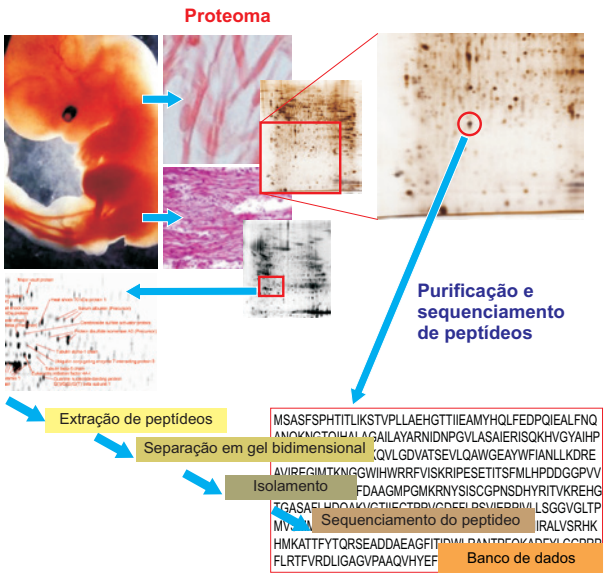


Figura 3. Sequência de eventos para obtenção das informações genéticas expressas na forma de RNA mensageiro (transcriptoma) para compor o banco de dados do genoma funcional de transcritos.

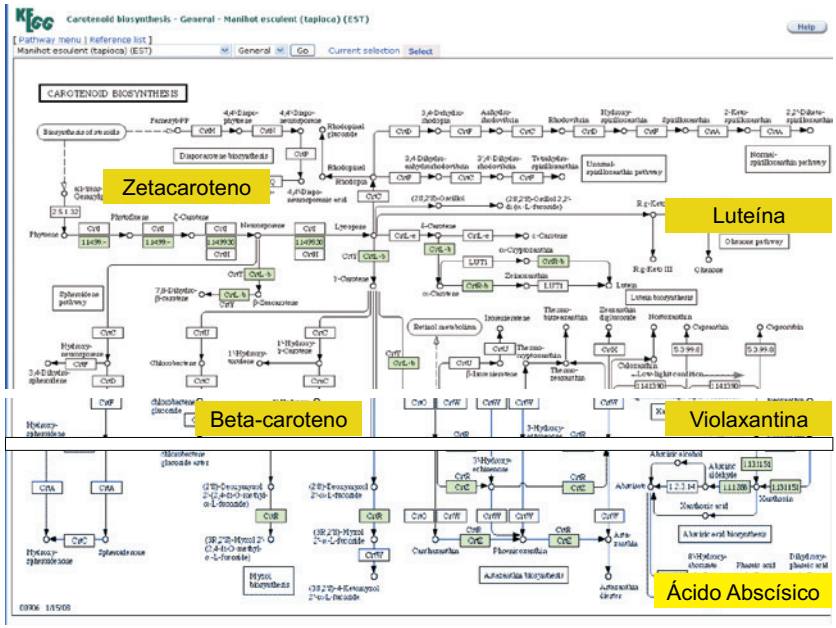


Figura 4. Exemplo de mapa metabólico disponível nos bancos de dados.

Os resultados depositados nos bancos de dados no caso de DNAs e ou cDNAs (DNA sintetizado a partir da fita de RNA mensageiro) em geral são sequência de letras que representam a ordem das bases nitrogenadas orientadas da extremidade 5'fosfato para a extremidade 3' OH. No caso das proteínas, as sequências de letras representam a ordem dos aminoácidos da cadeia polipeptídica da extremidade amino para a carboxiterminal (Figura 5). A grande questão é como decifrar o significado biológico das frases fornecidas pelas centenas de milhares de sequências obtidas dos diferentes materiais genéticos, para que se possa utilizar a informação gerada nos sequenciamentos.

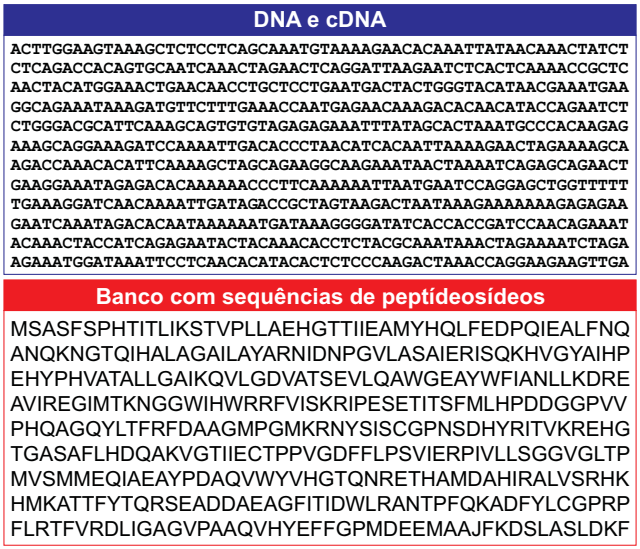


Figura 5. Exemplo de resultados gerados a partir do sequenciamento de DNAs e peptídeos.

Ferramentas de bioinformática

As ferramentas de bioinformática são programas de computador que auxiliam na interpretação dos resultados gerados pelos diferentes sequenciamentos. Permitem identificar um possível papel biológico para os segmentos de DNAs e proteínas, por meio de comparações com sequências e estruturas depositadas em bancos de dados e desenvolver marcadores moleculares específicos e iniciadores de replicação (primers) para identificação e ou captura de genes de interesse.

Na pesquisa biotecnológica, existem duas situações corriqueiras em que o pesquisador busca as ferramentas de bioinformática:

1) Quando se tem uma ou conjunto de sequências da qual se deseja identificar a função biológica.
2) Quando se tem um problema biológico para o qual há necessidade de se identificar os genes ou rotas metabólicas.

A seguir serão apresentadas algumas dessas ferramentas no contexto da situação um e dois.

Ferramentas para anotação de sequências genômicas

Nos estudos de genômica, proteômica, engenharia genética e desenvolvimento de marcadores moleculares, frequentemente o pesquisador tem necessidade de confirmar se o segmento obtido realmente é o desejado. Para tanto, faz-se a determinação da ordem das bases nitrogenadas (no caso de DNAs) ou dos aminoácidos (no caso de peptídeos) pelo método de sequenciamento de DNA ou de peptídeos. Uma vez obtidos os dados dos sequenciadores, inicia-se a etapa de tratamento informatizado para interpretação dos resultados.

No caso específico de DNAs, chama-se de sequência bruta àquela recém-obtida da leitura do eletroferograma (representação gráfica da ordem das bases nitrogenadas gerado pelo sequenciador automático de DNA). Essas sequências podem conter, além do DNA de interesse, segmentos do vetor de clonagem que necessitam ser identificados e removidos antes de qualquer estudo para se evitar interpretações errôneas. A remoção de vetores da sequência bruta é feita comparando-se o segmento com bancos genéticos de vetores de clonagem. Identificada a similaridade, faz-se a retirada da região correspondente ao vetor. Esse processo pode ser feito visualmente e o próprio pesquisador analisa e identifica a sequência do vetor, ou com auxílio de programas de bioinformática.

Após esse tratamento inicial, faz-se o envio da sequência para a comparação com outras depositadas em bancos de dados. O objetivo da etapa de comparação é identificar similaridades com segmentos de DNA ou de peptídeos disponíveis nos bancos de dados, permitindo atribuir prováveis funções ao segmento em estudo. O programa de busca de similaridades mais conhecido na atualidade é o Blast, que está disponível na página inicial do NCBI (NCBI, 2009; BLAST, 2009).

A Embrapa desenvolveu um programa de bioinformática que permite, de forma automatizada, identificar e retirar o vetor, enviar e recuperar as sequências similares dos bancos de dados. O programa dispõe de um tutorial e está disponível para pesquisadores cadastrados no site: www.genoma.embrapa.br (SISGEN, 2009).

Na Figura 6, ilustra-se o resultado de uma pesquisa de similaridade em bancos de dados provenientes do Blast. No exemplo, foi identifi-

cado apenas um segmento similar à sequência pesquisada, contudo é comum aparecer múltiplas sequências ou a situação inversa em que não aparecem similaridades.

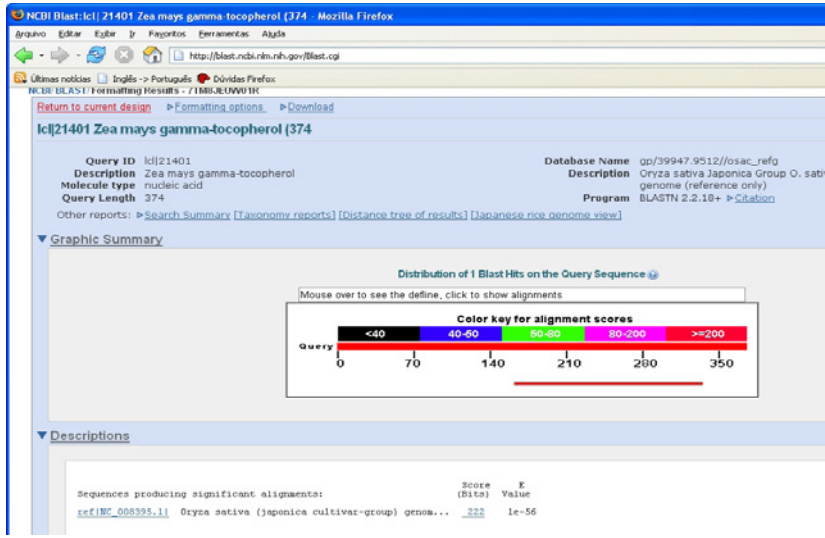


Figura 6. Página de resultados da busca de similaridades com sequências depositadas no banco de dados BLAST. No exemplo foi pesquisada a similaridade no banco de arroz da sequência de tocoferol obtida do sequenciamento do banco genômico do milho. A representação gráfica mostra a região do segmento do milho com similaridade ao clone NR008395.1 do banco de arroz.

Igualmente comum é a situação em que apenas uma parte da sequência apresenta similaridade com outras provenientes dos bancos de dados. Esses casos geralmente ocorrem quando existem domínios conservados entre famílias gênicas ou genes com origem evolutiva comum, ou mesmo em virtude da presença de elementos repetitivos diversos de origem viral ou não viral (COSTA; MARTINS, 2010). Identificada a similaridade, faz-se a anotação das bases e (ou) aminoácidos de início e fim e sua função hipotética, destacando o termo "hipotético" quando a função não tiver sido comprovada experimentalmente.

O Blast permite identificar e recuperar dos bancos de dados as fases abertas de leitura (open reading frame – ORF), ou seja, possíveis peptídeos que poderiam ser codificados pelo segmento se a região cor-

respondesse a um gene. Esse procedimento pode ser feito de forma menos automatizada por meio de outros programas de bioinformática disponíveis gratuitamente ou não para esse fim (ex.: ORF finder encontrado no próprio site do ncbi: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/) (Figura 7).

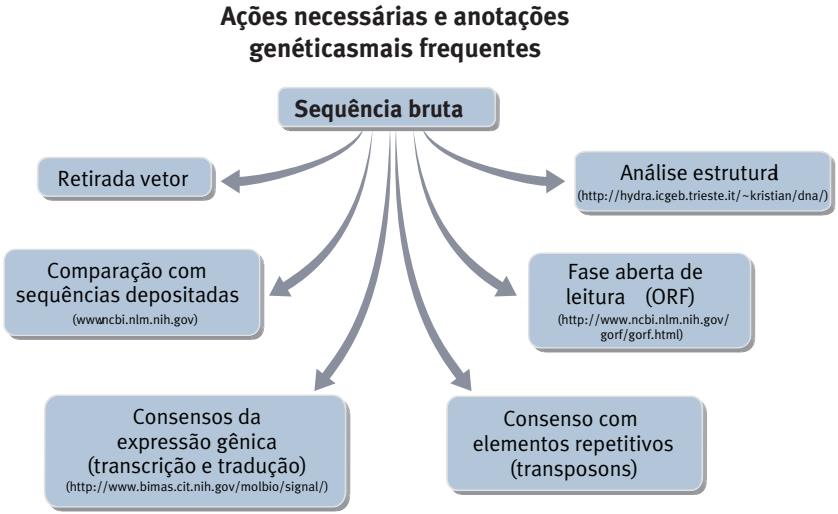


Figura 7. Anotações mais comuns realizadas nas sequências brutas: (1) retirada da região do vetor; (2) Comparação com sequências depositadas em banco de dados; (3) Identificação de fases abertas de leitura; (4) Identificação de consensos da transcrição ou tradução; (5) Identificação de elementos repetitivos; e (6) Análise estrutural.

No caso particular de não existirem similaridades com as sequências depositadas nos bancos de dados, dependendo da necessidade do pesquisador, faz-se uso de outros programas de bioinformática que permitam identificar outras informações que possam auxiliar na identificação do papel biológico. Entre esses programas, destacam-se aqueles que identificam consensos ativadores ou repressores da transcrição, segmentos característicos de região promotora. Essas regiões podem ser caracterizadas com o auxílio de programas do tipo "Signal scan". Também, podem-se fazer análises de curvaturas e dobramentos de DNAs e cadeias polipeptídicas com ferramentas específicas disponíveis para tal (Figura 7).

Após a etapa de anotação, em geral as sequências caracterizadas são enviadas para depósito nos bancos de DNA ou de proteínas. A forma de envio e depósito depende do banco de dados. No caso do site do NCBI, há a possibilidade de se depositar a sequência de forma unitária ou em conjunto por meio do programa específicos. No caso de depósito no NCBI, o tutorial encontra-se na página http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/update.html. (UPDATING INFORMATION ON GENBANK RECORDS, 2009).

Com base no conhecimento gerado pelas anotações, é possível definir as estratégias para comprovação da função do segmento no organismo. Portanto, a anotação é bastante útil na situação em que o pesquisador tem alguma sequência (ou conjunto de sequências) da qual necessita identificar a função biológica.

De tempos em tempos, as sequências depositadas nos bancos de dados são atualizadas. Somente a equipe que as depositou poderá promover modificações nas informações disponibilizadas. Essa situação é comum quando são disponibilizados os resultados de sequenciamentos parciais ou quando se deseja atualizar as anotações.

Uma vez publicadas as sequências pelos bancos, qualquer usuário pode salvar a informação em seu computador. Os arquivos no formato Genebank fornecem a sequência com todas as informações anotadas pelo depositante (Figura 8). Por meio desse arquivo, é possível conectar as informações complementares disponibilizadas na internet como, por exemplo, a bibliografia relacionada ao arquivo.

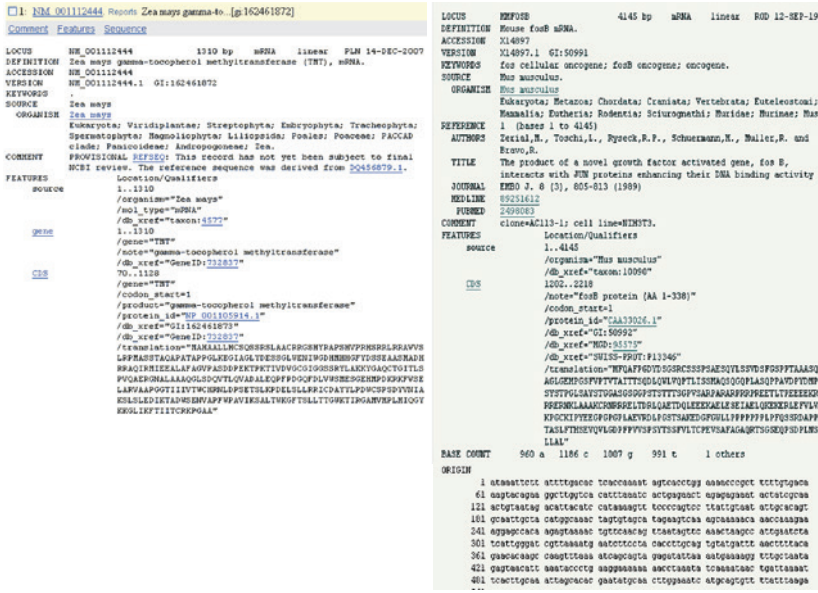


Figura 8. Exemplo de sequência no format Genebank. As anotações em azul permitem o acesso ao detalhamento da informação, incluindo acesso às publicações via ligação com o Medline e Pubmed (seta em vermelho).

O formato Fasta disponibiliza a sequência sem as anotações (Figura 9). Esse formato de apresentação é útil quando a informação obtida é utilizada em algum programa de análise de bioinformática, como no caso de desenho de primers para amplificação de regiões específica do genoma.

FASTA

```
>C5 região hibrida humana/minicírculo kDNA, 1075 bp
GAATTCTCTGTGGCATAGTTCCCAACTTCGATGGCTTACCCTGTTACTCAGCAACATCCTAG
GACTGTCCATCCTGCTTGAAAAATAAGGAAGTTGGCCAAAGTTATGGTTCAGAGGGTAACAT
ACTTGTGGAACAGCATGAGGGACCTCAGTTTGAATCCCCAGCGACCCTGTAAAAGTCAGTTG
TGACTGTACTACAAGTATCATGCTATAACTCCAGTTCTGGGAGGCAGAGACAGGTGGGTCCC
TGGAGTTCACAAGTCAGTCATCCTATTTCAATAGATAGTTTTATGTTCAGGGAAAGGGACTG
TCTCAAAATCGAGGAAGATACACGCACAACTCTGGTATACACACACACACACACACACAC
ACACACACACACACTCACACACAGTTTTCAGCACCTCCATTTACCATAAAACACCACAACTA
TCACCAAACTCTCTATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACCTCCCGTAAACAACCCCCC
ACTTTCGGCCAAATAATGTACGGGGGAGATGCATGAATTTTCCGGCCAAAATCTGA

>FOSB_MOUSE Protein fosB. 338 bp
MFQAFPGDYDSGSRCSSSPSAESQYLSSVDSFGSPPTAAASQECAGLGEMPGSFVPTVTA
ITTSQDLQWLVQPTLISSMAQSQGQPLASQPPAVDPYDMPGTSYSTPGLSAYSTGGASGS
GGPSTSTTTSGPVSARPARARPRRPREETLTPEEEEKRRVRRERNKLAAAKCRNRRRELT
DRLQAETDQLEEEKAELESEIAELQKEKERLEFVLVAHKPGCKIPYEEGPGPGPLAEVRD
LPGSTSAKEDGFGWLLPPPPPPPLPFQSSRDAPPNLTASLFTHSEVQVLGDPFPVVSPSY
TSSFVLTCPEVSAFAGAQRTSGSEQPSDPLNSPSLLAL
```

Figura 9. Exemplo de sequência de DNA (A) e de peptídeo (B) no formato fasta. O sinal "maior" (>) indica que a linha é o cabeçalho da sequência e que o parágrafo seguinte contém a sequência.

A segunda situação muito comum enfrentada pelos profissionais que atuam na área de biotecnologia é aquela em que se tem um problema biológico para o qual há a necessidade de se identificar os genes ou rotas metabólicas. Nesses casos, os bancos de dados podem ser muito úteis para obter as informações desejadas. Entre os bancos, destacam-se os do NCBI (ENTREZ, 2009) e os do KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (KEGG,2009).

A pesquisa do tema é geralmente feita por meio de palavras-chave grafadas em inglês. Os resultados são páginas com dados gerais e links para o acesso às informações específicas.

O NCBI é um portal que integra diferentes bancos de dados por meio do sistema Entrez (NCBI, 2009; ENTREZ, 2009). A entrada para o sistema é feita pela página inicial do NCBI (Figura 10). Nessa página, o usuário visualiza dois campos. O campo 1 é destinado à colocação da palavra-chave, e o segundo, marcado com a frase "All Database", permite a escolha do banco de dados onde será realizada a busca, clicando-se na seta ao lado da frase. Ao realizar o procedimento, abre-se uma janela com as opções: Pubmed, Protein, Nucleotide, EST, GSS, Structure, Genome, Biosystems, Books, Cancercromossome, Conserved Domains, 3D Domains, Gene, Genome Project, DBGAP, Gensat, Geoprofiles, Unigene, entre outros. Após a escolha do banco

de dados e colocação da palavra-chave, o usuário deverá clicar na palavra "Go" para iniciar a consulta. Para a busca geral, a pesquisa é feita sem a definição de um banco. Nesse caso, todos os bancos serão consultados, gerando-se uma relação com o número de ocorrências da palavra-chave em cada um dos bancos e chamadas para acesso.

Figura 10. Resultado da pesquisa da palavra-chave tolerância à seca no Entrez. Os números à esquerda de cada ícone indicam a quantidade de arquivos obtidos com a palavra-chave em cada banco de dados. Para acessar o resultado, basta clicar sobre o ícone.

A seguir serão apresentados alguns dos bancos disponíveis no site com maior utilidade geral. Contudo, em virtude da importância específica de algumas das ferramentas, sugerimos a navegação no Entrez para maiores detalhes.

O Pubmed é um banco de dados que disponibiliza os trabalhos publicados conforme a palavra-chave (resumos e artigos). É muito útil no caso de revisões bibliográficas, principalmente em temas volta-

dos para a área de saúde, veterinária, bioquímica, genética molecular, fisiologia vegetal e ciências biológicas em geral. Contudo, o sistema não varre as revistas que focam temas agronômicos ou zootécnicos propriamente ditos (sistemas de cultivo, adubação, mecanização agrícola, manejo animal, etc.), fazendo-se necessária a busca em outros portais como o Science Direct (SCIENCE DIRECT, 2009).

Os bancos Protein, Nucleotide, EST, GSS disponibilizam acessos às sequências de proteínas e de DNAs obtidos por diferentes métodos biotecnológicos (isolamento e sequenciamento de peptídeos, clonagem e sequenciamento de bancos genômicos, sequenciamento de segmentos de DNA expressos, sequenciamento de segmentos de DNA isolados, clonados ou não, entre outros). A consulta a esses bancos gera uma página com relação de arquivos Genbank classificada por organismo. Por sua vez, cada arquivo permite o acesso às publicações correspondentes e outras informações quando disponíveis, como localização do segmento visualizado no cromossomo, número de cópias, via metabólica, etc.

O banco Estructure é útil quando se deseja consultar a estrutura cristalográfica relacionada à palavra-chave permite acesso aos arquivos de banco de dados de proteínas (PDB). Da mesma forma, permite recuperar a literatura correspondente.

O Biosystems disponibiliza o acesso às rotas de síntese metabólica que envolvem a palavra-chave. Interliga-se com o banco de dados KEGG. O portal KEGG é especialmente útil quando se deseja correlacionar vias celulares, genes e fenótipos, e na predição de comportamento biológico do organismo em função do ambiente ou do perfil alélico. O banco oferece mapas metabólicos com acesso a informações de sequências de proteínas e DNAs, estruturas químicas, cinéticas enzimáticas, além de acesso às publicações correspondentes. Entre os mapas, destacam-se os das rotas fotossintéticas e dos carboidratos, síntese de vitaminas, metabolismo secundário (Figura 11 e 12).

O banco Books disponibiliza os livros sobre o assunto. O Cancercromossome possibilita a localização e informações cromossômicas relacionadas à palavra-chave e relacionadas à formação de tumores. Conserved Domains e 3D Domains são bancos úteis quando se realiza estudos de distâncias genéticas e elaboração de iniciali-

zadores (primers) para amplificar genes em organismos aparentados. O banco DBGAP disponibiliza os projetos e estudos que correlacionam os padrões genotípicos aos fenotípicos, compreendendo a diversidade alélica e documentações. O Gensat acessa o banco de dados do projeto que objetiva o mapeamento dos genes expressos no sistema nervoso central de camundongo. O Geoprofiles e Unigene disponibilizam a organização e análises de transcriptomas.

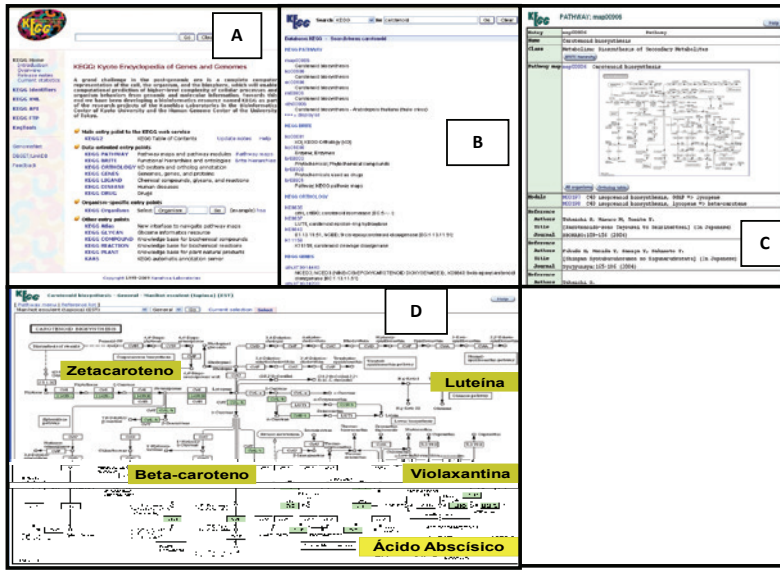


Figura 11. Sequência de busca da via de síntese de carotenóides via banco de dados Kegg. **(A)** Página inicial do Kegg. Verifica-se o campo para a colocação da palavra chave e recursos do KEGG; **(B)** Resultado da busca com a palavra chave "carotenoid"; **(C)** Mapa de síntese de carotenoide; **(D)** detalhamento do mapa: enzimas e substratos.

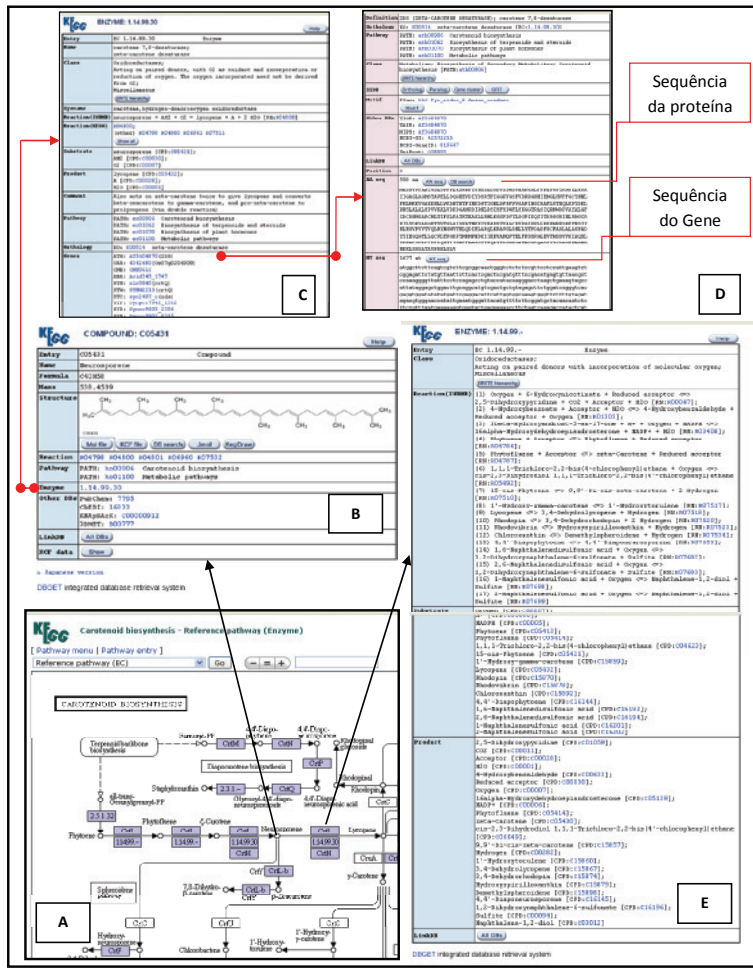


Figura 12. Detalhamento do mapa de síntese de carotenoides. Os símbolos são portas de acesso para o detalhamento da informação (A): Ao clicar no círculo, visualiza-se a estrutura do substrato (B), que, por sua vez, permite o acesso a outras informações como as das enzimas envolvidas no processo (C e E) e sequência da proteína/gene (D) entre outras informações.

Exemplo de problema biológico aplicado ao melhoramento genético

Existe hoje uma grande expectativa da sociedade por alimentos mais ricos em nutrientes e benéficos à saúde, os chamados alimentos funcionais. Uma categoria de composto correlacionada a propriedades funcionais é a dos antioxidantes. Para tanto, alguns grupos de pesquisa desenvolveram alimentos com maiores teores de compostos fenólicos e carotenoides. No melhoramento genético clássico, identificam-se os materiais genéticos ricos nesses compostos e, por meio de cruzamentos e seleções, agregam-se as propriedades benéficas às características agronômicas da variedade comercial. Mas, como predizer o comportamento biológico da planta rica em carotenoide? Como identificar as variantes alélicas da via dos carotenoides para síntese em sistemas biotecnológicos com o auxílio das ferramentas de bioinformática? Como aplicar as ferramentas de bioinformática para desenvolver marcadores moleculares específicos para acelerar os programas de melhoramento genético?

Para responder essas questões, há a necessidade de se identificar os genes envolvidos na via de síntese dos carotenoides. A pesquisa pode ser feita pelo Entrez (NCBI, 2009; ENTREZ, 2009), no banco Biosystems ou consultar diretamente a existência dos mapas metabólicos no Kegg (KEGG, 2009), utilizando-se a palavra-chave "carotenoid" nos campos de busca correspondentes. Nas Figura 11 e 12, mostra-se o resultado da pesquisa realizada no banco de dados Kegg.

A análise da via permite identificar uma correlação da via de síntese dos carotenoides com a de síntese de ácido abscísico. O ácido abscísico é um hormônio vegetal associado aos processos de maturação de frutos, queda de folhas e proteção da planta ao estresse ambiental. Esse hormônio provoca dormência das sementes e diminuição do porte da planta. Como existe ligação entre as duas vias, é possível inferir que plantas ricas em carotenoides podem, eventualmente, apresentar maior expressão do hormônio, o que poderia afetar no porte e dormência das sementes.

A manifestação ou não do prognóstico, entretanto, vai depender da combinação alélica da planta. No caso do exemplo, para haver acú-

mulo dos carotenoides, faz-se necessário combinações alélicas mais eficientes na síntese do composto. Como esse produto é substrato de outras vias biossintéticas, é necessário também que essas vias possuam alelos menos eficientes no consumo do composto.

No momento, ainda não estão disponíveis programas de predição do comportamento fenotípico em função do perfil alélico. A dificuldade está na falta de informações organizadas sobre o comportamento genético dos alelos frente às variações ambientais que permitam subsidiar a elaboração de programas preditivos. Contudo já existem alguns estudos em andamento conforme pode ser constatado na lista de projetos sobre o assunto disponibilizado pelo Entrez (DBGAP, 2009).

Para se identificar os alelos conhecidos de um determinado gene, o interessado pode fazer a busca nos bancos Protein ou Nucleotide, EST, GSS do Entrez (ENTREZ, 2009) ou pelo Kegg (KEGG, 2009). Se o usuário dispuser de informação da sequência gênica ou da proteína, também o Blast pode ser útil na pesquisa (BLAST, 2009).

Recuperados os alelos, faz-se o alinhamento das sequências para identificar as regiões mutadas e não mutadas. Existem programas que auxiliam nesse processo, sendo um dos mais utilizados o ClustalW (CLUSTALW, 2009). O ClustalW pode ser utilizado online ou instalado no terminal do usuário. O programa aceita a comparação de sequências que estejam no formato Fasta. Essas podem ser copiadas e coladas diretamente no campo disponibilizado na página inicial do programa ou podem ser carregadas pelo programa a partir de arquivos tipo DOC ou TXT (Figura 13).

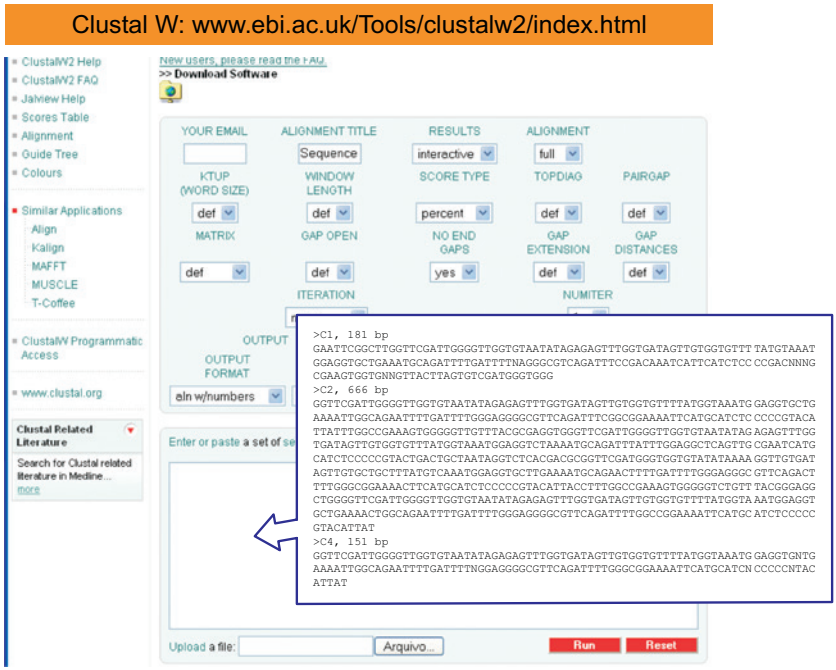


Figura 13. Página inicial do programa ClustalW. As sequências devem ser colocados no formato Fasta.

Na Figura 14, mostra-se o resultado da comparação de segmentos de DNA por meio do ClustalW. Identificada as regiões similares e não similares, a informação pode servir para diferentes finalidades, incluindo o desenvolvimento de marcadores moleculares ou para desenho de inicializadores que irão amplificar regiões específicas para estudo e uso biotecnológico.

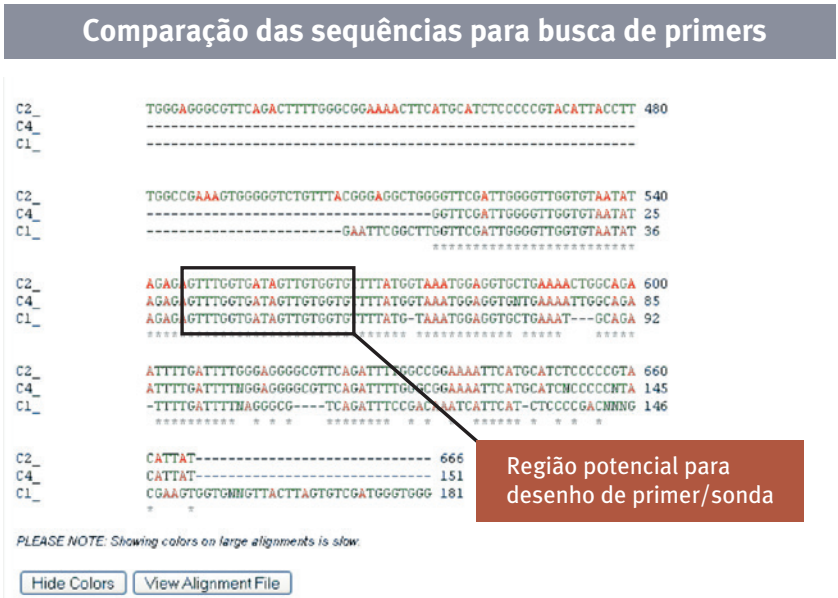


Figura 14. Exemplo de comparação de três alelos realizada com o auxílio do programa ClustalW. A linha pontilhada indica ausência das bases no alelo. O símbolo estrela na linha abaixo dos clones indica que todos os alelos apresentam a mesma base no ponto indicado. Os números à direita indicam a posição no alelo da ultima base visualizada na linha.

Considerações finais

As ferramentas de bioinformática e bancos de dados permitem que o usuário adquira uma noção do estado da arte e acesso ao detalhamento de informações biológicas úteis, tais como sequências de DNA e de proteína, estruturas tridimencionais de ácidos nucleicos e peptídeos, localização de segmentos gênicos e não gênicos nos cromossômicos, identificação de rotas metabólicas, entre outros. Esse conhecimento é de extrema utilidade na geração, interpretação e discussão de dados e formulação de hipóteses.

Como qualquer fronteira do conhecimento, os programas de bioinformática estão em constante aprimoramento. Dia após dia, novas ferramentas surgem no mercado, exigindo atenção e esforços por

parte do usuário no sentido de conhecer os novos recursos. Contudo, trata-se de um esforço compensador que resulta em grande economia de tempo e também de esforços, que, se bem explorado, pode ser uma poderosa ferramenta para o avanço tecnológico.

Referências

BLAST. 2009. Disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acesso em: nov. 2009.

BOLDUC, M.; LAZARIS, A. **Spider Silk-based advanced performance fiber for improved personnel ballistic protection systems.** Defence R&D Canada Valcartier. Technical Memorandum DRDC Valcartier TM 2002.222. 2002. Disponível em: < http://cradpdf.rddc.gc.ca/PDFS/unc07/p518792.pdf >. Acesso em: nov. 2009.

CLUSTALW. 2009. Disponível em: <www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. Acesso em: nov. 2009.

COSTA, A. M.; MARTINS, C. Estrutura e evolução dos genomas. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2010. 110 p.

DBGAP. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gap>. Acesso em: nov. de 2009.

ENTREZ. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/> . Acesso em: nov. de 2009.

KEGG. Disponível em: <http://www.genome.jp/kegg/>. Acesso em: nov. de 2009.

MARTINS, C.; BARROS, A. M. **Estrutura e evolução de genomas.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007.

NCBI. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov.br>. Acesso em: nov. 2009.

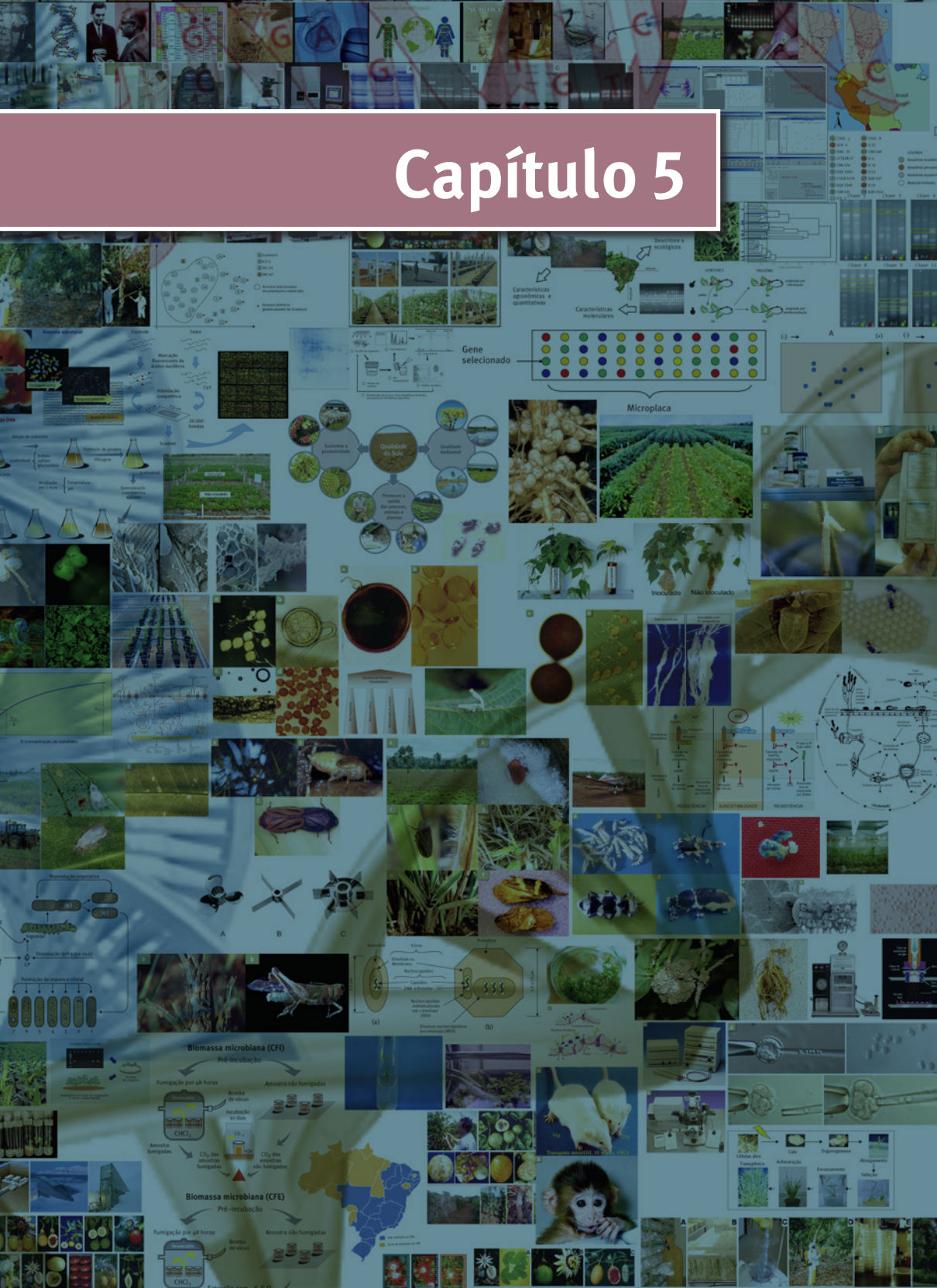
SCIENCE DIRECT. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/>. Acesso em: nov. 2009.

SISGEN. Disponível em: <www.genoma.embrapa.br>. Acesso em: nov. 2009.

TRIPURANI, S. K.; REDDY, N. S.; RAO, K. R. S. S. Green revolution vaccines, edible vaccines. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 679-683, Dec. 2003. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/AJB>. Acesso em: nov. 2009.

UPDATING INFORMATION ON GENBANK RECORDS. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/update.html>. Acesso em: nov. 2009.

Capítulo 5


Gene selecionado
Microplaca
Inoculado
Não inoculado
Biomassa microbiana (CFI)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas
Biomassa microbiana (CFE)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas

Genômica funcional

Rodrigo da Rocha Fragoso
Erich Yukio Tempel Nakasu
Thales Lima Rocha
Artur Jordão de Magalhães Rosa

Introdução

A biodiversidade existente hoje, ou mesmo a extinta, que é observada nos registros fósseis desde 3 billhões de anos atrás, nos mostra uma infinita variedade de formas, tamanhos, cores, nichos e relações ecológicas. Paradoxalmente, os seres vivos são bioquimicamente iguais e, essa infinita variabilidade é constituída basicamente de umas dezenas de precursores moleculares idênticos. Da mesma forma, é incrível que quase toda informação biológica esteja armazenada no ácido desoxirribonucleico, o DNA, que apresenta apenas quatro tipos de bases nitrogenadas diferentes (Adenina, Citosina, Timina ou Guanina). Da mesma forma, quase todas proteínas são constituídas de apenas 20 tipos de aminoácidos, encadeados sequencialmente. A variação de número e de sequência nucleotídica é o que pode gerar teoricamente infinitos genes diferentes (para uma introdução detalhada, CORDEIRO, 2003). De forma semelhante, essa informação do gene pode ser utilizada para determinar a sequência precisa de aminoácidos que constitui uma determinada proteína, que após seu enovelamento, endereçamento e ativação, irá assumir sua função celular. Como os carboidratos, lipídeos e metabólitos podem ser observados como produtos enzimáticos gerados por proteínas específicas, muito pode ser entendido a partir dos genes e suas proteínas codificadas, num único mecanismo de fluxo de informação biológica, que está baseado num número ínfimo de precursores moleculares.

O conjunto completo dos genes de determinado ser vivo é chamado de genoma. A genômica é a ciência que trata do sequenciamento e os diversos estudos da informação gerada. Já a genômica funcional é um campo da Biologia Molecular e Bioquímica que descreve a função específica de genes e proteínas, relacionando as etapas do fluxo de

informação biológica, relacionando a regulação da expressão gênica com mecanismos bioquímicos e fisiológicos. A genômica funcional inclui estudo da atividade molecular, que compreende várias ômicas (Figura 1), como transcriptômica (expressão gênica), proteômica (expressão proteica) e, mais recentemente, metabolômica (presença e abundância de metabólitos).

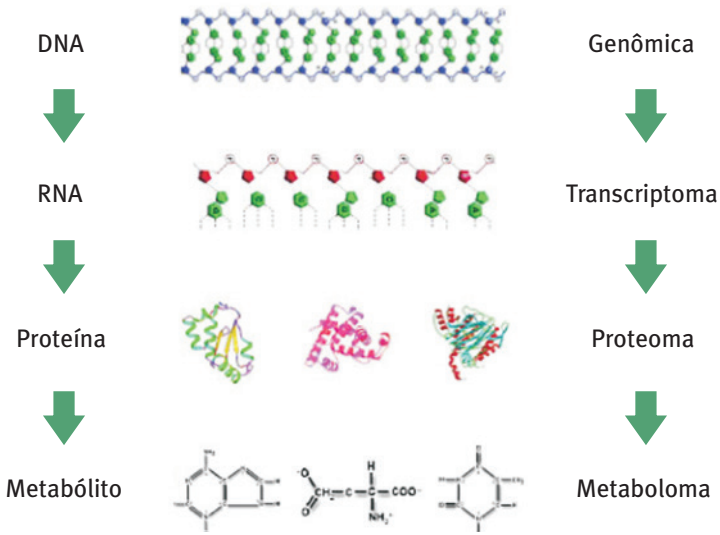


Figura 1. Ciências ômicas e os tipos de biomóleculas estudadas. As setas mostram o sentido direto do fluxo de informação biológica, onde a informação genética é transmitida do DNA do núcleo para o citoplasma na forma de RNA, cuja informação é utilizada para síntese de proteínas nos ribossomos. Enzimas controlam o transporte, a síntese e a degradação dos metabólitos celulares .

Ao contrário da genômica, a genômica funcional focaliza os aspectos dinâmicos como transcrição gênica, tradução proteica, interação proteína-proteína e alteração metabólica, alternativamente aos aspectos estáticos da informação genômica como sequência de DNA e estrutura gênica. Por natureza, a genômica estuda um fenômeno populacional e apresenta enfoque genético e evolutivo, enquanto a genômica funcional aborda um fenômeno fisiológico com enfoque celular, molecular e bioquímico.

Considerando a reprodução sexuada de espécies diploides, cada indivíduo herda dois genomas haploides, cada qual oriundo de um gameta e constituído de segmentos cromossomais que podem sofrer mutação, recombinação, duplicação, transposição e segregados pela meiose, que foram combinados pela fecundação. A grande variabilidade gerada é matéria-prima para a seleção natural dos indivíduos, e para seus genomas únicos, que apresentam características mais vantajosas em determinadas condições (adaptação). Salvo raras exceções, todas as células de determinado indivíduo compartilham o mesmo genoma, do momento de sua formação até a sua morte. A genômica tem gerado descobertas fascinantes com relação à evolução das espécies, comparando tanto a sequência dos genes e famílias gênicas como sua arquitetura nos cromossomos em estudos de sintenia.

Entretanto, sendo o genoma funcional um fenômeno fisiológico. Quando um indivíduo modifica sua fisiologia em resposta a variações ambientais (aclimatação), o que ocorre em nível celular é a alteração da expressão gênica (transcrição) e expressão proteica (tradução), que refletem nos metabólitos. Ou seja, o genoma funcional varia conforme diversos estímulos do próprio organismo (local e tipo de tecido, fase da vida, hormônios, etc) e do meio ambiente (temperatura, fotoperíodo, umidade, altitude, latitude, estação do ano, patógenos, etc).

A questão principal é como atribuir uma função específica a genes e proteínas dentro de células extremamente complexas e pequenas? As melhores abordagens de estudo são baseadas em comparação entre espécies, indivíduos ou tratamentos. Conceitualmente simples, a solução está organizada em três princípios comparativos:

a) Comparativo de sequência – Assumindo a ancestralidade comum de todos os seres vivos e sua diversificação conforme a evolução biológica, faz-se a comparação da informação biológica. Constata-se que é alta a probabilidade de que moléculas com sequências similares desempenhem papel semelhante, mesmo comparando espécies bem diversificadas. Logicamente, espécies mais distantes filogeneticamente apresentam menor identidade de sequência de determinada molécula, assim como espécies mais próximas evolutivamente têm sequências com alta identidade. Normalmente, mecanismos

biológicos básicos são idênticos em todas as espécies, e seus genes, transcritos e proteínas relacionados são extremamente conservados ao longo do tempo. Considerando isso, infere-se a função predita a uma molécula recém-descoberta com base na função confirmada numa outra espécie, desde que compartilhem relativa identidade de sequência nucleotídica ou peptídica. As bioinformática genômica se encarrega dessa comparação em larga escala de sequências de genes, mRNAs (cDNAs) e proteínas, assim como das relações evolutivas entre as espécies estudadas.

b) Comparativo de abundância – Indivíduos da mesma espécie submetidos a diferentes condições e tratamentos são comparados com relação à resposta fisiológica que é induzida e quais moléculas são utilizadas nesse mecanismo, observando quais mRNAs, proteínas e metabólitos aumentam e quais diminuem de abundância. As principais técnicas de genômica funcional atuam na identificação, isolamento e quantificação de mRNAs, proteínas e metabólitos para comparação entre situações contrastantes. Infere-se a função relacionada a determinadas situações por quantificação diferencial das moléculas.

c) Comparativo de fenótipo – A comparação de indivíduos com alterações genéticas e indivíduos sem alterações genéticas pode indicar a função específica do gene mutante. Infere-se a função da molécula nos indivíduos silvestres ou selvagens pela observação da perda de função nos mutantes. Essa forma de estudo é conhecida como genética reversa e dispõe de várias técnicas. Inicialmente, os mutantes de várias espécies, inclusive humanos, eram detectados para serem estudados e relacionados aos genes mutantes. Depois, mutantes podiam ser gerados por mutação gênica aleatória induzida por irradiação ou quimicamente, principalmente em fungos, drosófilas e plantas. Com o advento das técnicas de Biologia Molecular, genes específicos podiam ser introduzidos, modificados ou nocauteados (OGM), gerando indivíduos sob encomenda para estudo da função de genes específicos.

A genética reversa é muito poderosa e reúne os trabalhos que de fato demonstram a relação de causa e efeito e formou grande parte da base do conhecimento atual da Biologia e áreas correlatas. Porém, a geração de OGM é demorada, laboriosa e onerosa, mesmo para organismos modelo, sendo, portanto, atualmente impraticável a geração de em torno de 25 mil OGMs (número predito para vários eucariotos multicelulares) para estudar a função de todos os genes para cada espécie. O silenciamento gênico, entretanto, é relativamente mais rápido, fácil e acessível, pois não envolve transformação genética e, sim, ingestão e (ou) injeção e (ou) infecção viral de moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) no organismo em estudo. O gene específico é desligado e a função individual perdida é observada. Gene a gene, são meticulosamente estudados.

Utilizando essas estratégias é possível: comparar padrões de expressão gênica e proteica entre diferentes tecidos, diferentes estádios de desenvolvimento, processos patológicos e imunológicos; correlacionar abundância diferencial de mRNA, proteínas e metabólitos com mudanças fisiológicas; descobrir mecanismos biológicos; estudar as respostas celulares a drogas, diferentes condições fisiológicas e exposições ao ambiente; descobrir relações funcionais entre genes, proteínas e metabólitos; rastrear genes de interesse para melhoramento genético, transgenia, desenvolvimento de fármaco entre outros.

Transcriptômica

Transcriptômica é a ciência que estuda o transcriptoma, que, por definição, é o conjunto completo de RNA transcritos de determinado indivíduo, de determinada espécie, de determinada idade, de determinado tecido, em determinadas condições ambientais, sob determinado tratamento experimental, etc. Ou seja, se o genoma é o conjunto de genes de um certo indivíduo, ele não varia para aquele indivíduo. Todas as células daquele indivíduo apresentam o mesmo genoma, exceto linfócitos e células germinativas devido a peculiaridades funcionais. Bastaria fazer um genoma por espécie, determinando todos os alelos para cada lócus gênico. No entanto, um enorme número de diferentes transcriptomas pode ser gerado de um único indivíduo, considerando todas as condições específicas utilizadas para coletar as

amostras. Se a soma dos recursos aplicados para obter cada genoma atualmente conhecido (4.955 incompletos e 1.043 completos, http://www.genomesonline.org/gold.cgi) fosse aplicada em transcriptomas de uma única espécie, por exemplo *Homo sapiens*, seriam, quem sabe, uns 3 mil transcriptomas. Entretanto, se for considerado que o ser humano apresenta diversas fases da vida, centenas de tipos celulares, dezenas a centenas de disfunções fisiológicas, doenças genéticas, parasitas e patógenos, provavelmente esse número de transcriptomas não atenderia a todas as perguntas biológicas. Por isso, várias estratégias metodológicas foram criadas para abordar transcriptômica sem necessariamente sequenciar transcritos em larga escala.

Biblioteca de cDNA

Moléculas de RNA são sintetizadas (transcrição) para cumprir diversas funções, sendo o mRNA responsável por levar a informação biológica armazenada no DNA para os ribossomos, local da síntese de proteínas (tradução). Em eucariotos, a grande maioria dos mRNA possui na sua extremidade 3' uma sequência homopolimérica de adenosinas (cauda PoliA). Tal característica é explorada nas técnicas de transcriptômica para excluir outros tipos funcionais de RNA. Utilizando um iniciador oligonucleotídeo com sequência homopolimérica de timidinas (Oligo-dT) e uma DNA polimerase RNA-dependente (transcriptase reversa viral), é possível sintetizar in vitro moléculas de DNA complementar (cDNA), que podem ser clonados (ligados em plasmídeos com DNA ligase e inseridos em células bacterianas de *Escherichia coli* por eletroporação) para produção de massa e sequenciamento (GUBLER; HOFFMAN, 1983). A biblioteca de cDNA representa todos os genes expressos nas condições de coleta da amostra.

Ferramentas de bioinformática para análise de sequência são utilizadas para inferir função gênica, mecanismos fisiológicos, vias metabólicas, etc que atuam em determinada situação. Quando se pretende comparar tratamentos experimentais, devem ser geradas bibliotecas de cDNA para cada situação. Posteriormente, faz-se a subtração *in silico* por bioinformática, que resulta na discriminação de quais genes ocorrem apenas em um tratamento, apenas no outro tratamento ou

ambos, ou seja, é um resultado qualitativo. Apenas quando um grande número de clones é sequenciado (alta taxa de redundância), os dados podem ser considerados quantitativos com certa confiança, mas com custo muito elevado.

Biblioteca subtrativa

A biblioteca subtrativa representa o subconjunto de cDNA que ocorre exclusivamente em uma determinada situação. Apesar de haver certas variações, os protocolos se baseiam na extração de RNA de dois tratamentos (A e B, por exemplo) e na incubação conjunta dos respectivos cDNA desnaturados para subtração in vitro, que teoricamente seleciona os exclusivos (ocorre em A, mas não em B, ou vice-versa). Assim, apenas são clonados e sequenciados os cDNA diferencialmente expressos, diminuindo o tempo e o custo em relação à subtração *in silico*, que é sua principal vantagem (SARGENT; DAVID, 1983). Na verdade, essa estratégia de subtração foi idealizada para permitir a clonagem de genes com baixa taxa de expressão, em que a amostra de cDNA era subtraída dela mesma usando uma massa de 10 a 30 vezes da mesma amostra (TIMBERLAKE, 1980; ZIMMERMANN et al., 1980).

Apesar das vantagens de se clonar cDNA raros ou comparar dois tratamentos sem a necessidade de sequenciar dezenas de milhares de clones (SAMBROOK et al., 1989), tal estratégia não está tão presente nas publicações mais recentes devido provavelmente ao surgimento de novas estratégias e a geração de grande número de falsos positivos, ou seja, genes expressos nos dois tratamentos são clonados como sendo genes diferencialmente expressos. Outra desvantagem é que variações quantitativas menores não são detectadas e, inversamente, grandes variações quantitativas podem ser confundidas com variações qualitativas.

DDRT-PCR

A estratégia de apresentação diferencial por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (DDRT-PCR, do inglês Differential Display RT-PCR) é uma poderosa técnica de identificação

e isolamento de genes diferencialmente expressos (LIANG; PARDEE, 1992). Essa técnica consiste na síntese de cDNA em subconjuntos utilizando oligo-dT diferentes. Por exemplo, utilizando paralelamente os oligo-dT terminados em A, C ou G (M) e transcriptase reversa, os mRNAs servem de molde para a síntese de três subpopulações de cDNA que terminam em T, G ou C logo antes da cauda PoliA. Também é possível separar a população de mRNA em doze subpopulações utilizando iniciadores oligo-dT diferenciados nos dois últimos nucleotídeos (AA, AC, AG, CA, CC, CG, TA, TC, TG, GA, GC e GG, ou NM). Dessa forma, considerando dois tratamentos amostrados, os cDNAs de cada subpopulação são separados por tamanho em gel de poliacrilamida por eletroforese. Como os cDNAs são marcados com radioatividade (normalmente fósforo 33, mais seguro que o fósforo 32) ou digoxigenina (epítopo para anticorpo fusionado com enzima), eles são selecionados como diferencialmente expressos visualmente e as bandas cortadas do gel são diretamente sequenciadas ou são primeiro clonadas em *E. coli*. Apesar de laborioso, normalmente depender de radioatividade e demorar algumas semanas, é uma técnica eficiente para isolamento de genes diferencialmente expressos, incluindo genes desconhecidos.

Macroarranjo de DNA

O princípio do macroarranjo de DNA está baseado na técnica de hibridização, sendo uma estratégia de análise interessante para organismos que já apresentam estudos genômicos prévios. A utilização de uma coleção de DNA distintos arranjados para observação do padrão de expressão foi primeiramente descrito por Kulesh et al. (1987). O macroarranjo pode ser interpretado como o inverso de um Southern blot (SOUTHERN, 1975), que tem como princípio a separação das amostras de DNA por eletroforese em gel desnaturante, transferência do DNA para membrana, imobilização por ligação covalente do DNA com a membrana e a hibridização com sondas de DNA marcadas com radioatividade correspondentes a um único gene (Figura 2).

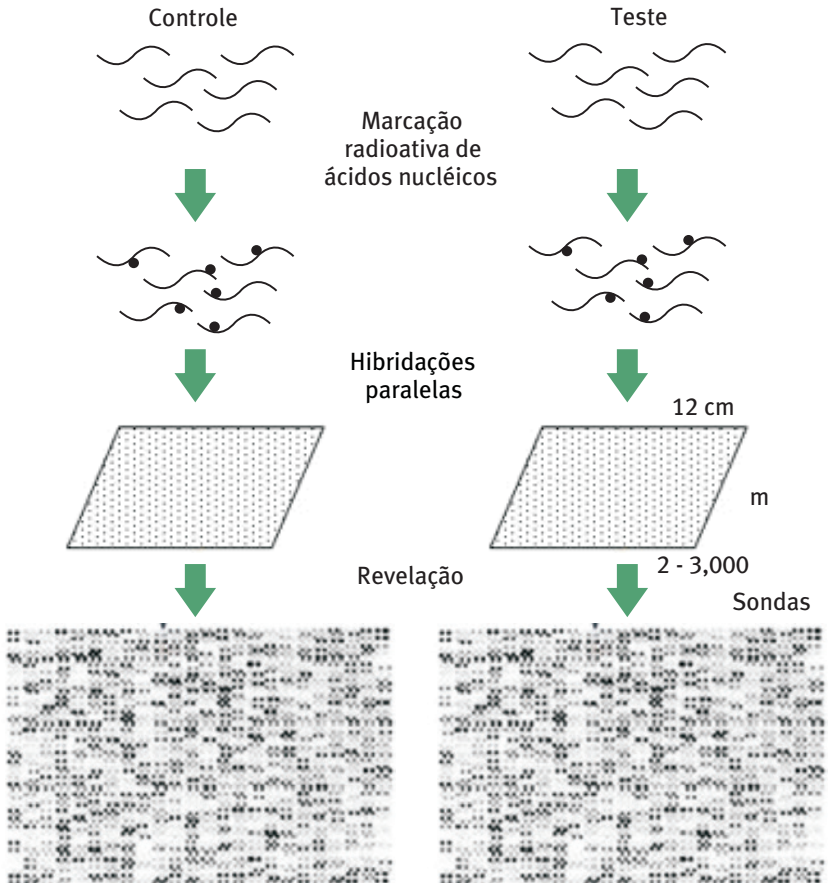


Figura 2. Esquema representativo de um Macroarranjo. Duas situações são contrastadas, controle e o teste (tratamento). Amostras de RNA são obtidas para síntese de cDNA, em que essas moléculas recebem uma marcação normalmente radioativa. Robôs, em larga escala, ou carimbos, em menor escala, são utilizados para aplicação uniforme e localizada das sondas específicas (até 3 mil sondas). A hibridização das sondas assegura uma marcação detectável por revelação fotográfica. Dessa forma, a presença e abundância são percebidas como sinais escuros na membrana, indicando uma análise de expressão diferencial qualitativa e quantitativa.

Inversamente, a estratégia de macroarranjo inicia com a imobilização em membrana de nylon de produtos de PCR ou cDNA clona-

dos, com sequência, nome e função conhecidos, de forma que, em cada posição exata (spot), tem um único cDNA associado para posterior hibridização com uma população de cDNA marcado com radioatividade ou digoxigenina. Robôs podem ser utilizados para depositar os cDNA nas membranas de nylon numa densidade aproximada de 40 spots/cm^2. Também é possível utilizar um carimbo próprio (para placa de 96 poços) para aplicar o cDNA em estudos de menor escala. Quando existe complementaridade com alguma sequência imobilizada, o cDNA marcado que é sondado fica pareado e pode ser detectado em filme fotográfico devido às emissões. Alternativamente, existe um tipo de marcação enzimática, sendo aplicada às mesmas etapas iniciais, variando apenas a forma de detecção. Nesse caso, o cDNA é sintetizado com um epítopo para reconhecimento por anticorpos fusionados a enzimas. Ao se adicionar o substrato incolor, aqueles spots sem homologia permanecem incolores e os spots com homologia ficam coloridos. A coloração se deve a uma sequência de eventos: (a) o DNA fixado na membrana forma ligações de hidrogênio com o cDNA complementar sondado; (b) essa sonda é sintetizada com nucleotídeo contendo digoxigenina, um epítopo; (c) um anticorpo antidigoxigenina se liga nos spots; (d) conjugado ao anticorpo está a fosfatase alcalina; e (e) essa enzima cataliza a conversão do substrato incolor em um produto colorido, marcando os spots onde houve as etapas anteriores.

Dessa forma, centenas de cDNA, vistos como pontos na membrana, são sondados simultaneamente para geração de dados qualitativos e quantitativos de expressão gênica. Utilizando algum programa dedicado para detectar os spots, quantificar a intensidade das imagens geradas, procede-se a análise estatística considerando as duplicatas e os controles. Assim, diferentes tratamentos são observados quanto à expressão diferencial de centenas de genes conhecidos, de modo que é possível relacioná-los com os mecanismos bioquímicos que atuam nos processos fisiológicos estudados.

Microarranjo de DNA

O microarranjo de DNA (Microarray) tem sido a principal ferramenta de transcriptômica e que mais contribuiu para o avanço do

conhecimento na era pós genômica até o momento. A miniaturização do macroarranjo foi relatada em 1995 (SCHENA et al., 1995) e, apenas dois anos depois, já era possível organizar o primeiro genoma eucariótico completo, da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em uma única e pequena lâmina (LASHKARI et al., 1997).

A metodologia do microarranjo apresenta algumas melhorias em relação à estratégia anterior. Inicialmente, robôs depositam dezenas de milhares de sondas específicas em lâminas de vidro ou silicone (6.000 spots/cm^2) em empresas privadas que comercializam chips de DNA, padronizados ou encomendados (Figura 3). Assim, instituições de pesquisa e universidades realizam seus experimentos de expressão gênica em larga escala, gerando grande quantidade de dados com alta reprodutibilidade e confiabilidade, sem precisar investir nos equipamentos de elevado custo de aquisição, operação e manutenção.

Outra melhoria foi na forma de marcação. No lugar da radioatividade, os cDNAs são marcados com dois fluoróforos, ficando cada tratamento com uma determinada cor. Após a hibridização, modernos aparelhos excitam as moléculas fluoróforas com laser e captam imagens coloridas com alta resolução em escaner fluorescente para compor os dados de expressão gênica quando comparadas pela intensidade e coloração apresentada em cada ponto que representa um determinado gene. O uso de diferentes fluorocromos permite que os sinais de hibridização sejam determinados para os dois tratamentos distintos em um único experimento. Cada spot apresenta uma cor que é resultante da mistura dos dois fluorocromos, cada qual com sua intensidade, e representa aquela sequência de DNA em relação aos dois tratamentos observados. Dessa forma, o microarranjo de DNA permite a análise simultânea de expressão de milhares de genes. Também existe o chip de DNA para genotipagem, em que os pontos fixados correspondem a marcadores moleculares (normalmente do tipo SNPs) que se correlacionam com fenótipos conhecidos.

A maior desvantagem do microarranjo de DNA é sua dependência de genes previamente caracterizados. Por isso, existem alguns estudos de hibridização heteróloga, em que amostras de espécies sem genoma utilizam chip de DNA da espécie-modelo filogeneticamente mais próxima. A dependência de empresas privadas eleva o custo, porém os

arranjos montados em laboratórios são tecnicamente trabalhosos e podem resultar em dados não tão confiáveis. A análise estatística é igualmente trabalhosa e a imensa quantidade de dados pode dificultar a interpretação final.

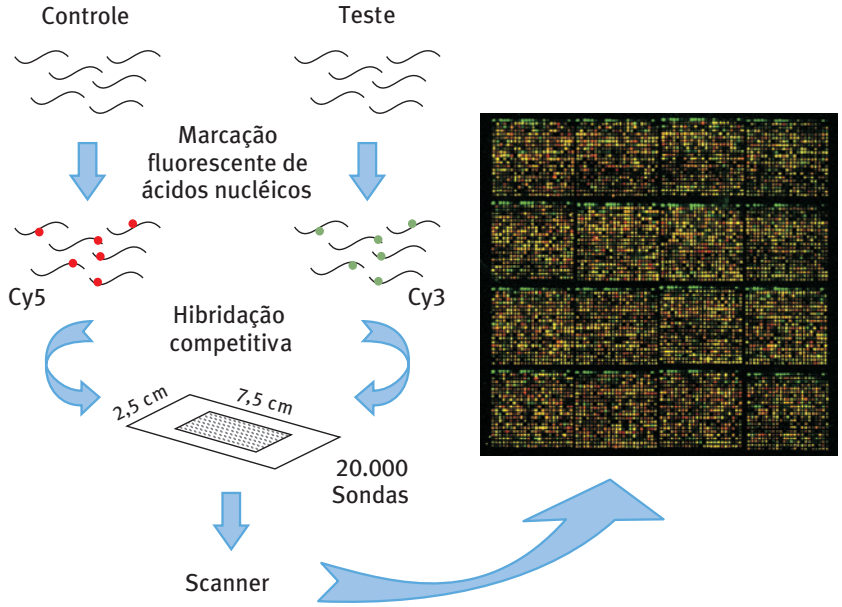


Figura 3. Esquema representativo de um Microarranjo. Duas situações são contrastadas: controle e teste (tratamento). Amostras de RNA são obtidas para síntese de cDNA, em que essas moléculas recebem uma marcação fluorescente distinta. Robôs são utilizados para aplicação uniforme e localizada das sondas específicas (20 mil sondas). A hibridização competitiva ocorre no mesmo suporte sólido. A cor resultante está associada à combinação de cores das amostras, controle ou teste, indicando a presença e abundância de cada, resultando numa análise de expressão diferencial qualitativa e quantitativa em larga escala.

SAGE

A poderosa técnica de análise seriada da expressão gênica (SAGE, do inglês Serial Analysis of Gene Expression) permite estudar o padrão global de expressão gênica e foi desenvolvida e publicada em

1995 (VELCULESCU et al., 1995). O SAGE pode ser utilizado para identificar e quantificar a expressão de genes novos ou previamente conhecidos.

Sua metodologia se baseia na geração de etiquetas de cDNAs (tags) de 10 a 14 pares de bases, que contêm informação suficiente para identificação específica de transcritos. Os tags são gerados de uma única posição dentro de cada transcrito, evitando redundância ou superestimativa. Os tags gerados são ligados numa molécula longa e serial de DNA (concatâmero), que é clonado e sequenciado. Dessa forma, cada clone sequenciado traz informação de dezenas de transcritos, multiplicando a geração de dados e minimizando custo. Todas sequências obtidas devem ser processadas por programas de bioinformática para reconhecer e separar os tags dos concatâmeros, anotar individualmente e fazer a contagem das vezes que cada tag específico é representado.

Por ser um método direto e quantitativo de medir abundância dos transcritos, seu resultado de nível de expressão gênica é muito confiável e tem alta correlação com experimentos confirmatórios utilizando PCR em tempo real.

Entretanto, o SAGE tem como desvantagens alto custo e longo tempo demandado para clonar, sequenciar e analisar os tags, além da maior dependência de genomas completamente sequenciados para a associação entre os tags e os genes correspondentes. Outro problema é que os tags representam as extremidades 3' dos mRNAs e, em alguns genes, essa região pode ser muito polimórfica, dificultando a análise.

Algumas melhorias técnicas foram desenvolvidas em estratégias derivadas, como LongSAGE, RL-SAGE e SuperSAGE, para capturar tags mais longos, melhorando a correta identificação do gene correspondente.

Sequenciamento de nova geração

Mais recentemente, novas tecnologias de sequenciamento de DNA (conhecidas como Next Generation Sequencing) foram desenvolvidas e novos equipamentos estão sendo comercializados, como o 454 FLX (Roche), SoLiD (Applied Biosystems) e Solexa (Illumina). Considerando apenas os últimos sete anos, o custo do sequencia-

mento foi reduzido mais de 100 vezes e a capacidade de sequenciamento por máquina aumentou mais de 1.000 vezes. De fato, está acontecendo uma mudança de paradigma na execução dos experimentos. Os fatores tempo e dinheiro, que determinaram o sucesso e insucesso de adoção das estratégias anteriormente descritas, já iniciam um redirecionamento metodológico.

Num futuro bem próximo, teoricamente qualquer ser vivo conhecido poderá ter seu genoma completamente sequenciado para estudos de genômica comparativa. Imaginem a geração de milhares de genomas de indivíduos da mesma espécie para genotipagem total e identificação de marcadores moleculares para todos os genes e seus alelos. Ou milhares de transcriptomas de uma espécie direcionados para responder questões biológicas, médicas, patológicas, fisiológicas e tantas outras. Ou ainda, genomas de inúmeras amostras complexas de água e solo (metagenômica), sem identificação prévia dos seres vivos presentes.

Entretanto, novos desafios são lançados para a bioinformática, pois o tipo de dado gerado requer novos programas dedicados, e o volume de dados que pode ser gerado a baixo custo em curto tempo é absurdamente grande, dificultando seu armazenamento e análise. Curiosamente, maior custo e tempo serão necessários para armazenar e analisar os dados do que para gerar as sequências, ou seja, o inverso do que vinha ocorrendo com a utilização do sequenciamento automático (SMITH et al., 1985; SMITH et al., 1986), baseado no método de Sanger (SANGER; COULSON, 1975).

Considerando essa transição, o sequenciamento de nova geração oferece nova perspectiva para genômica funcional. A rapidez e baixo custo tornam o sequenciamento completo do transcriptoma melhor que qualquer técnica atual, que foram desenvolvidas justamente para contornar a demora e alto custo necessários para sequenciar um transcriptoma. Provavelmente, em pouco tempo, não haverá mais interesse em se executar microarranjo ou SAGE para avaliar e comparar a expressão gênica. O transcriptoma reúne todos os transcritos, sejam conhecidos ou não, codificadores ou não, mais abundantes ou não. Seu dado é quantitativo podendo ser utilizado para determinar níveis de expressão gênica.

Proteômica

A proteômica pode ser definida como a varredura, em larga escala, de proteínas provenientes de uma célula, organismo ou fluido biológico. O estudo de proteomas é desafiador, uma vez que a expressão genética de uma célula é muito dinâmica e dependente do seu estádio de desenvolvimento, da presença de ativadores e inibidores e das condições ambientais. Apesar disso, a proteômica, por estudar os produtos finais do genoma, oferece as ferramentas mais adequadas para a análise e interpretação das funções gênicas.

Os dados gerados pela proteômica, pela alta capacidade de resolver diferenças mínimas entre proteínas, incluem importantes descobertas relacionadas a vias de transdução de sinais, proteínas reguladoras, modificações pós-traducionais, assim como condições fisiológicas e patológicas de células e organismos (WESTERMEIER; NAVEN, 2002). Do ponto de vista agronômico, a proteômica de plantas cultivadas pode fornecer informações como diferenças de expressão proteica entre cultivares com níveis variados de produção, de resistência a estresses bióticos e abióticos, bem como no desenvolvimento de alimentos com altos valores nutritivos.

O estudo de um determinado proteoma tem aplicações diretas na descoberta de vias metabólicas em todos os estádios do ciclo celular, gerando uma massiva quantidade de conhecimento em biologia celular e bioquímica. Além disso, permite a identificação de novas moléculas bioativas em extratos naturais, levando ao desenvolvimento de novos medicamentos e a caracterização de marcadores biológicos, incluindo moléculas endógenas e exógenas específicas a um estado patológico. Atualmente, as principais técnicas utilizadas para análise de proteomas são a eletroforese bidimensional, a cromatografia líquida e a identificação por espectrometria de massa (MS, do inglês mass spectrometry).

Eletroforese bidimensional

A eletroforese bidimensional (2-DE, do inglês Two-Dimensional Electrophoresis) é uma técnica amplamente utilizada para a análise de misturas complexas de proteínas extraídas de células, tecidos ou

outras amostras biológicas. Esse método permite separar proteínas de acordo com duas propriedades independentes, em duas etapas distintas (O'FARRELL, 1975). Inicialmente, há separação de proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico (p*I*), etapa conhecida como primeira dimensão ou focalização isoelétrica (IEF, do inglês isoelectric focusing); posteriormente, as proteínas são separadas de acordo com suas massas moleculares por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, do inglês Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis), etapa essa conhecida como segunda dimensão (Figura 4). Dessa forma, pequenos pontos ou spots aparecem no gel, cada um deles potencialmente correspondendo a uma única forma de uma proteína. Uma característica marcante de 2-DE é a capacidade de separar de centenas a milhares de proteínas em uma amostra, podendo gerar informações como p*I*, massa molecular aparente e a quantidade relativa de cada proteína. Após a separação e geração desses dados, os spots podem ser identificados por diferentes técnicas de espectrometria de massa.

Outras características inerentes à técnica de 2-DE incluem a detecção de modificações pós transcricionais e pós-traducionais, que não podem ser preditas a partir de sequências genômicas.

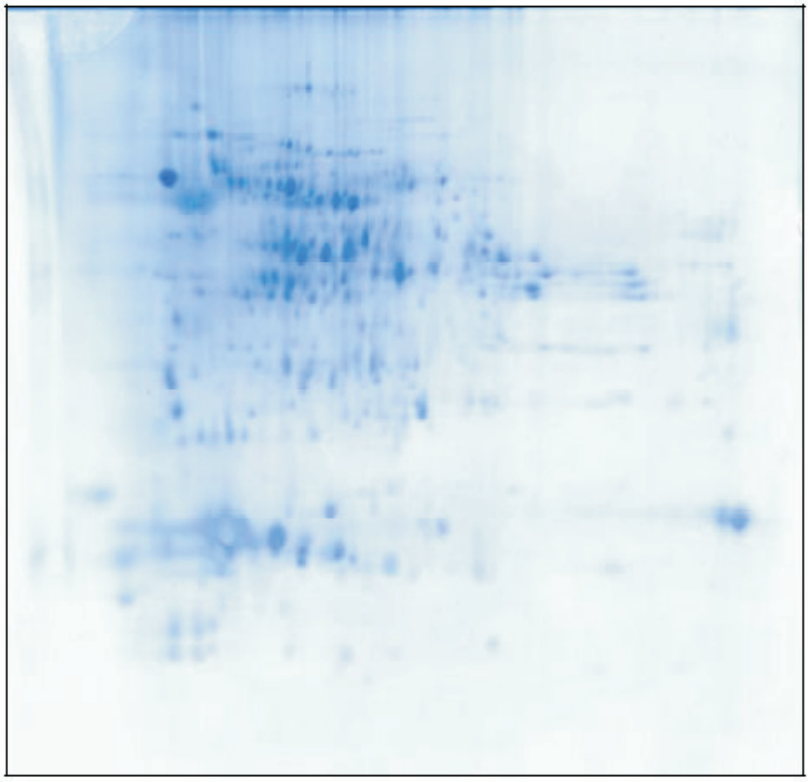


Figura 4. Eletroforese bidimensional de proteínas de raízes de algodoeiro. Horizontalmente as proteínas foram separadas levando em conta a variação de carga pI intrínseca de cada proteína, o que depende da composição dos aminoácidos carregados positivamente ou negativamente. Verticalmente, as proteínas foram separadas por massa, característica que considera todos os aminoácidos que constituem a proteína.

Imagem: Dr. Thales Lima Rocha.

Preparação de amostras

O preparo de amostras para 2-DE é essencial para aumentar a resolução e representatividade dos spots derivados de misturas complexas (ROCHA et al., 2005). Devido à grande diversidade das proteínas,

a otimização do preparo de amostras deve ser feita empiricamente. Idealmente, o processo resultará em completa solubilização, desagregação, desnaturação e redução das proteínas na amostra. Diálises, precipitações (usualmente utilizando ácido tricloroacético – TCA) e (ou) tratamentos com nucleases podem ser utilizadas para aumentar a qualidade dos géis bidimensionais, evitando a presença de ácidos graxos, sais, metabólitos secundários e ácidos nucleicos como interferentes. Alguns cuidados especiais devem ser levados em consideração quando amostras ricas em proteínas hidrofóbicas com baixa abundância ou com valores extremos de p*I* e (ou) massa molecular são analisadas. Recentemente, métodos alternativos foram desenvolvidos para contornar essas limitações, como adição de detergentes para solubilizar amostras muito hidrofóbicas, métodos de extração diferencial de proteínas e faixas contendo pH extremos.

Focalização isoelétrica

A focalização isoelétrica (IEF, do inglês Isoelectric Focusing) é um método eletroforético que separa as proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos. Na IEF, os gradientes são normalmente imobilizados em tiras contendo um intervalo específico de pH (por exemplo, pH 3-10, pH 4-7). As proteínas são moléculas anfotéricas, podendo ter carga positiva, negativa ou igual à zero, dependendo do pH do meio. A carga líquida de uma proteína pode ser calculada pela soma de todas as cargas positivas e negativas dos grupos laterais dos resíduos de aminoácidos e extremidades amino- e carboxi-terminais. O ponto isoelétrico é o pH específico onde à carga líquida da proteína é zero. Proteínas são carregadas positivamente em pH abaixo do seu p*I* e negativamente carregadas em pH acima do p*I*.

A presença de um gradiente de pH é essencial para a técnica de IEF. Em um gradiente de pH e sob influência de um campo elétrico, as proteínas movem-se para a posição onde sua carga será igual à zero. Dessa forma, uma proteína com carga positiva migrará na direção do cátodo, tornando-se progressivamente menos positiva ao mover-se pelo gradiente, até chegar ao seu próprio p*I*. Inversamente, uma proteína com carga negativa migrará para o ânodo, até atingir a carga zero. Se uma proteína difunde de seu p*I*, ela imediatamente adquire uma

carga, migrando novamente para a faixa de pH correspondente ao p*I*. Esse é o efeito focalizador da IEF, concentrando proteínas em seus respectivos p*I*s, permitindo separá-las por diferenças de carga ínfimas.

Para aplicar as amostras nessa primeira dimensão, é recomendável quantificar por métodos como Bradford, Lowry ou BCA e verificar integridade das moléculas utilizando SDS-PAGE. Adicionalmente, o método de coloração a ser utilizado deve levar em consideração a complexidade (extratos proteicos ou proteínas purificadas) e a quantidade da amostra.

Segunda dimensão (SDS-PAGE)

Após a IEF, as tiras são posicionadas sobre um gel de poliacrilamida contendo o detergente SDS. Dessa forma, as proteínas são separadas de acordo com sua massa molecular. O gel, constituído de polímeros de acrilamida com N-metil-bis-acrilamida, permite escolha da porosidade da malha. Assim, o poder de resolução do SDS-PAGE é selecionado pela porcentagem de acrilamida contida no gel. De uma forma geral, géis contendo uma determinada porcentagem contínua de acrilamida oferecem uma resolução eficiente para proteínas presentes em uma faixa específica de tamanho. Entretanto, quando um gradiente de concentração de acrilamida é utilizado, o intervalo de separação é maior. A escolha de um ou outro método está diretamente relacionada ao tipo de amostra a ser analisada.

Métodos de coloração de géis

Os métodos mais comuns de coloração de géis são aqueles que utilizam Coomassie Brilliant Blue ou nitrato de prata, que diferem em relação à sensibilidade de detecção. Enquanto a coloração com nitrato de prata oferece um poder de detecção cerca de 50 vezes maior que Coomassie Brilliant Blue, essa técnica é laboriosa e de relativa baixa reprodutibilidade. Entretanto, outras estratégias, como eletroforese em gel diferencial (DIGE, do inglês Differencial Gel Electrophoresis), empregam marcações fluorescentes, podendo-se analisar mais de uma amostra em um único gel, comparando-se diferenças de expressão gênica e abundância relativa de proteínas. Marcações contendo

radioatividade como 35P, 14C, 3H e 32P podem ser feitas in vivo e possuem alta capacidade de detecção por autoradiografia.

Espectrometria de massa

A espectrometria de massa (MS, do inglês Mass Spectrometry) é uma ferramenta amplamente utilizada para identificação de proteínas, podendo caracterizar ainda modificações pós-traducionais, assim como interações proteína-proteína e formação de complexos.

As proteínas a serem identificadas podem ser inicialmente separadas eletroforeticamente (proteômica top-down) ou cromatograficamente (bottom-up ou mudpit). Utilizando-se hidrólise enzimática dessas proteínas, comumente utilizando tripsina, é possível identificá-las por um perfil de digestão ou impressão digital de peptídeos (PMF, do inglês Peptide Mass Fingerprinting) utilizando MS ou sequenciamento de novo via tandem MS (MS/MS).

Para a geração desses dados, dois tipos de ionização são mais comumente utilizados: aqueles do tipo MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) e ionização do tipo eletrospray (ESI). No primeiro caso, as amostras são cocristalizadas com moléculas pequenas de ácidos orgânicos em placas metálicas, seguindo-se dessorção e ionização por pulsos intensos e curtos de uma fonte de laser. Na ESI, peptídeos em solução acídica são dispersos por um spray e a solução em gotículas evapora, deixando os peptídeos ionizados.

Os analisadores de massa mais empregados em estudos proteômicos são os baseados em tempo de voo (TOF, do inglês time of flight), quadrupolo, ion trap (IT) e Fourier transform ion cyclotron (FTIC), apresentando interfaces ou com MALDI ou com ESI. Cada um desses analisadores possui características específicas, podendo ser utilizados dois ou mais analisadores de massa em um mesmo aparelho, possibilitando separar íons de acordo com sua razão massa/carga. Finalmente, um detector é utilizado para registrar o número de íons que emergem de um analisador.

Os dados gerados por espectrometria são confrontados com bancos de dados computacionais, como NCBI e Swiss-Prot, que contêm milhares de sequências peptídicas e nucleotídicas, que podem ser convertidas em sequências de aminoácidos.

Metabolômica

Metabolômica é a ciência que estuda o metaboloma, definido como o conjunto total de metabólitos de um indivíduo em condições específicas. Essas moléculas podem atuar como precursores de importantes rotas metabólicas, bem como substratos, inibidores ou ativadores alostéricos de diferentes enzimas. De uma forma geral, os metabólitos são divididos em duas classes: primários e secundários, cuja composição varia enormemente conforme as condições genéticas, fisiológicas e ambientais.

Os metabólitos primários são encontrados dissolvidos no citosol de qualquer célula, estando envolvidos nas principais rotas metabólicas. Entre esses, estão os aminoácidos, nucleotídeos, lipídeos, carboidratos e seus derivados fosforilados, além de um grande número de ácidos mono-, di- e tricarboxílicos. São moléculas altamente polares ou carregadas eletricamente, solúveis em água e presentes nas células em pequenas concentrações (entre milimolar e micromolar).

Existe outro grupo de pequenas biomoléculas que, ao contrário dos metabólitos primários, são específicas de certos tipos de células ou organismos. Essas moléculas são comumente chamadas de metabólitos secundários (DIXON, 2001). Os principais grupos de metabólitos secundários são os alcaloides, terpenos, taninos, flavonoides e glicosídeos (HALL, 2006). Os alcaloides são bases nitrogenadas com grande variação na estrutura molecular. Possuem sabor amargo e pH alcalino quando em solução. Nas plantas, têm função de regulação do crescimento e de proteção. Os terpenos são moléculas de estrutura cíclica, também conhecidos como óleos essenciais. Eles são voláteis e por isso são responsáveis pelos odores dos vegetais.

Quanto ao número de átomos de carbono, podem ser classificados como mono, sesqui, di e triterpenos. Nas plantas, possuem funções como estimular polinização por insetos, proteção contra patógenos etc. Os taninos são compostos fenólicos (poli fenóis) de estrutura variável. Apresentam atividade adstringente, ou seja, precipitam proteínas. Nos vegetais, têm função de proteção. Os flavonoides são heterosídeos contendo uma porção açúcar (diferente da glicose) ligada a uma porção não-glicídica (aglicônio), que, neste caso, é um pigmento. Esses compostos possuem cores de acordo com o tipo de pigmento

presente na molécula; como exemplo, as flavonas são amarelas e os flavonoides antociânicos são azuis. Nas plantas atuam na coloração dos órgãos vegetais e na diferenciação celular. Por fim, os glicosídeos são compostos que contêm um açúcar ligado a um aglicônio, sendo esse a porção ativa da molécula. Possuem gosto amargo e são classificados de acordo com o tipo de aglicônio. Por exemplo, em glicosídeos alcoólicos o aglicônio é um álcool; os glicosídeos cianogênicos liberam ácido cianídrico quando hidrolisados; glicosídeos esteróides possuem um esteróide como aglicônio; glicosídeos antraquinônicos possuem antraquinona como aglicônio etc. Nos vegetais, a função varia de acordo com a porção não-glicídica (MARASCHIN; VERPOORTE, 1999; ZHANG et al., 2003).

Metaboloma, metabolômica, "metabolic profiling" e engenharia de metabolismo

A metabolômica, em virtude do seu objetivo de estudar a composição metabólica, não utiliza parâmetros, mas sim os determina. Após serem determinados, o "metabolic profiling" os utiliza (ROBERTSON, 2005; WECKWERTH; MORGENTHAL, 2005). A linha que divide essas duas plataformas geralmente é muito tênue. Técnicas como a Ressonância Magnética Nuclear de biofluidos ou a Espectrometria de Massa de biofluidos são utilizadas para os dois propósitos. No entanto, o que se sabe acerca do biofluido e o conhecimento prévio de parâmetros a serem analisados é que vai definir se a análise se enquadra na metabolômica ou no "metabolic profiling".

Após a descoberta dos metabólitos de uma amostra qualquer e a identificação de algum composto de interesse (farmacêutico, por exemplo), é possível iniciar os estudos de engenharia de metabolismo (Figura 5). Tais estudos primam por identificar os genes e as rotas metabólicas desses compostos, visando aumentar ou diminuir a sua produção. Além disso, a engenharia de metabolismo pode ser aplicada na modificação genética de outro organismo, para que este possa produzir o metabólito em questão (AHARONI et al., 2005).

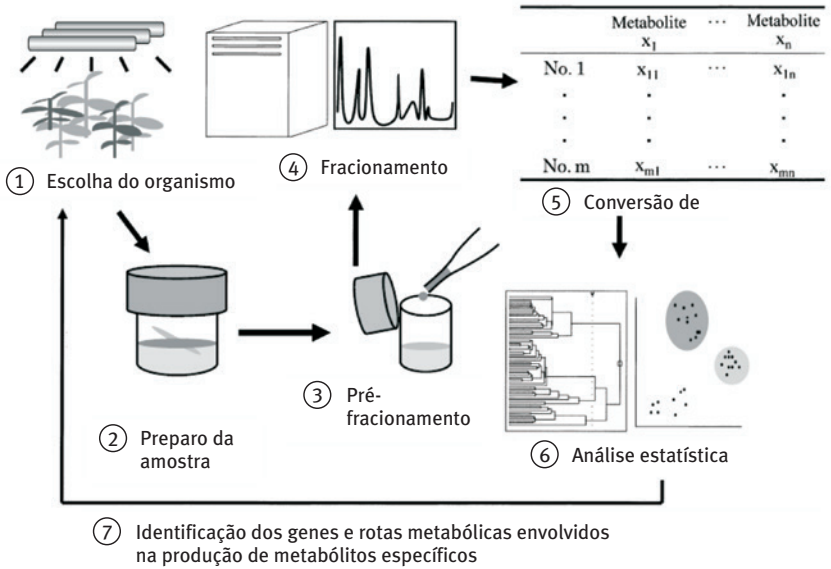


Figura 5. Esquema básico de análise metabólica de plantas.

Fonte: adaptado de Fukusaki e Kobayashi (2005).

Muitas amostras, antes de serem analisadas, necessitam de um pré-fracionamento, que tem por finalidade agrupar os compostos de acordo com suas características moleculares utilizando diferentes solventes (WANT et al., 2006). O ponto mais crítico desse pré-fracionamento é a escolha do solvente usado para a separação (FUKUSAKI; KOBAYASHI, 2005). Deve-se prestar muita atenção nas possíveis interferências que esse solvente pode causar nos equipamentos de análise, assim como nas possíveis reações indesejadas que podem ocorrer entre o solvente e a amostra, produzindo novos compostos (ROBERTSON et al., 2000; BECKWITH-HALL et al., 2002; ROBERTSON, 2005; WANT et al., 2006).

Embora qualquer ferramenta que permita mensurar os metabólitos possa ser usada na metabolômica, a Espectrometria de Massa (MS) acoplada a Cromatografia líquida, Cromatografia Gasosa ou Eletroforese Capilar, juntamente com a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), são as mais utilizadas (NICHOLSON et al., 1999;

FIEHN, 2002; REO, 2002; LINDON et al., 2003, 2004ª; NICHOLSON; WILSON, 2003; WECKWERTH, 2003; BINO et al., 2004; FERNIE et al., 2004; GOODACRE et al., 2004; ROBERTSON, 2005; WECKWERTH; MORGENTHAL, 2005). A MS é muito mais sensível do que a RMN, muito embora isso nem sempre represente uma vantagem. Essa maior sensibilidade implica em uma menor reprodutibilidade da análise no mesmo equipamento ou em equipamentos equivalentes (FUKUSAKI; KOBAYASHI, 2005; ROCHFORT, 2005; WECKWERTH; MORGENTHAL, 2005; WILSON et al., 2005). Uma variação da RMN, conhecida como "Magic Angle Spinning" (MAS), permite a análise direta de tecidos, não necessitando das etapas de extração e pré-fracionamento. Entretanto essa técnica necessita de equipamentos especiais e recursos humanos altamente qualificados, acabando por limitar seu uso (STRAUS, 2004). Devido a essas peculiaridades, a maioria dos grupos de pesquisa voltados aos estudos de metabolômica está usando tanto os equipamentos associados a MS quanto os associados a RMN (ROBERTSON, 2005).

Após todos os passos de fracionamento, faz-se necessária a conversão dos valores obtidos por diferentes equipamentos para uma unidade padrão. Contudo, isso nem sempre é fácil, ainda mais se forem utilizados muitos passos para o fracionamento (FUKUSAKI; KOBAYASHI, 2005; ROBERTSON, 2005; ROCHFORT, 2005). Dados obtidos por cromatografias, eletroforeses ou mesmo RMN necessitam ser convertidos em uma linguagem digital que possa ser utilizada em análises multivariadas utilizando ferramentas estatísticas (FIEHN, 2002; DURAN et al., 2003; STEUER et al., 2003; FUKUSAKI; KOBAYASHI, 2005; MUNGUR et al., 2005; ROBERTSON, 2005; ROCHFORT, 2005; WECKWERTH; MORGENTHAL, 2005).

A escolha do tipo de análise estatística a ser utilizada nos dados obtidos pelas técnicas de fracionamento varia de acordo com a estrutura dos dados e da intenção da análise. Entretanto, a Análise de Componente Principal (ACP) é a mais utilizada na metabolômica (NICHOLLS et al., 2001; NICHOLSON et al., 2002). Essa análise é útil para se reduzir grupos de dados muito grandes e identificar sinais importantes nesses grupos, sobretudo se o fracionamento não foi bem sucedido. A partir de uma série de cálculos conhecidos por análise dos vetores de Eigen,

a ACP permite identificar os compostos mais abundantes e, a partir disso, visualizar as diferenças dentro da amostra e agrupar os compostos hierarquicamente (FUKUSAKI; KOBAYASHI, 2005).

Associando-se todo esse conhecimento gerado pela metabolômica àqueles obtidos pelas outras ômicas, é possível determinar quais são as rotas metabólicas e os genes que possivelmente estejam envolvidos na produção dos compostos de maior destaque. Essa integração entre as diferentes plataformas tecnológicas é chamada de Biologia de Sistemas.

Aplicabilidade da metabolômica

As informações obtidas pela metabolômica, assim como aquelas obtidas pelo "metabolic profiling", têm sido frequentemente usadas em pesquisas de diversas áreas. Exemplos específicos para indicar o alcance dessa tecnologia incluem a correlação entre perfis metabólicos dos biofluidos e doenças em animais, na influência da dieta no padrão metabólico do indivíduo, na investigação dos efeitos causados pela inserção de um gene em um organismo transgênico, entre outras (BRINDLE et al., 2003; FUKUSAKI; KOBAYASHI, 2005; GIBNEY et al., 2005; ROBERTSON, 2005; ROCHFORT, 2005; WECKWERTH; MORGENTHAL, 2005).

Farmacologia

A metabolômica tem uma gama de aplicações na área farmacêutica, tendo grande destaque as pesquisas para seleção de fármacos efetivos e seguros, a identificação de marcadores biológicos de toxicidade e doenças e o entendimento dos mecanismos de toxicidade (ROBERTSON, 2005).

Certamente, a maior parte do esforço em prol da utilização da metabolômica para esse fim é realizada pelo Consórcio de Metabolômica aplicada a Toxicologia (Comet). Esse consórcio visa montar um banco de dados com milhares de espectros de RMN utilizando biofluidos de animais tratados com toxinas modelo. Esse grupo é formado pela Imperial College de Londres e mais seis companhias farmacêuticas que investem milhões de dólares na seleção e produção de fármacos.

Nutrição

Assim como na farmácia, a metabolômica tem varias aplicações na área nutricional. Como a dieta influencia diretamente no desenvolvimento do indivíduo, a metabolômica possibilita conhecer os arranjos e desarranjos metabólicos causados pela alimentação (GERMAN et al., 2005). Dessa forma, o papel que os componentes alimentares desempenham na saúde e na doença, assim como os efeitos causados pela falta ou excesso de determinados nutrientes podem muito bem ser conhecidos pela metabolômica (WATKINS et al., 2001; GERMAN et al., 2003).

Ecologia e evolução

Outro campo de notória aplicabilidade da metabolômica é a ecologia (ROBERTSON, 2005; ROCHFORT 2005). A utilização dessa plataforma nos estudos com vegetais tem sido constante nos últimos anos. A realização desses estudos visa entender, sobretudo, o mecanismo de ação de compostos bioativos e a diferenciação de variedades selvagens daquelas modificadas geneticamente (OTT et al., 2003; FUKUSAKI; KOBAYASHI, 2005; MUNGUR et al., 2005; RISCHER, H.; OKSMAN-CALDENTEY, 2006).

Outra aplicação da metabolômica na botânica reside no entendimento da relação planta-patógeno. Ao serem parasitadas por insetos ou nematoides, por exemplo, as plantas produzem e liberam uma série de compostos como fenóis, terpenos ou alcaloides. Esse aumento de produção é induzido pelo contato com sinalizadores químicos oriundos dos patógenos. Contudo, apesar de todas as plantas reagirem ao parasitismo, nem todas produzem os metabólitos necessários para o controle do patógeno. Dessa forma, a metabolômica pode ser aplicada na identificação dos metabólitos diferenciais entre variedades resistentes e susceptíveis a uma determinada praga. Esse tipo de trabalho já é largamente efetuado a nível transcriptômico e proteômico. Entretanto, em se tratando de metabolômica, isso já é bem mais incomum (FORST, 2006).

Considerações finais

Devido ao grande avanço das modernas tecnologias de detecção, isolamento e quantificação em larga escala de genes, transcritos, proteínas e metabólitos, cujos estudos são organizados em ômicas (genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica) e da capacidade de armazenamento e análise de dados pela bioinformática (BINNECK, 2004), já é possível formar uma visão ampla de toda malha bioquímica de interação, sinalização, regulação e conversão metabólica, que permeia os mecanismos moleculares, processos bioquímicos e fisiologia celular, considerando cada ômica.

Mais recentemente, surgiu um novo conceito científico cunhado como Biologia Sistêmica ou Biologia de Sistemas (do inglês Systems Biology), que objetiva compreensão funcional abrangente devido à integração das ciências ômicas. Idealizada como a sobreposição de dados de transcriptômica, proteômica, metabolômica, glicômica (todos carboidratos de uma célula) e lipidômica (conjunto completo de lipídeos), a Biologia Sistêmica opera numa visão holística sobre os fenômenos biológicos. Dessa forma, espera-se que os complexos fenômenos biológicos sejam desvendados profundamente, gerando novas aplicações biotecnológicas em prol da saúde humana, maior qualidade de vida e uso sustentável dos recursos naturais.

Referências

AHARONI, A.; JONGSMA, M. A.; BOUWMEESTER, H. J. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 12, p. 594-602, 2005.

BECKWITH-HALL, B. M.; HOLMES, E.; LINDON, J. C.; GOUNARIDES, J.; VICKERS, A.; SHAPIRO, M.; NICHOLSON, J. K. NMR-based metabonomic studies on the biochemical effects of commonly used drug carrier vehicles in the rat. **Chemical Research in Toxicology**, v. 15, p. 1136-1141, 2002.

BINNECK, E. As ômicas: integrando a bioinformação. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 1, n. 32, p. 28-37, 2004.

BINO, R. J.; HALL, R. D.; FIEHN, O.; KOPKA, J.; SAITO, K.; DRAPER, J.; NIKOLAU, B. J.; MENDES, P.; ROESSNER-TUNALI, U.; BEALE, M. H. Potential of metabolomics as a functional genomics tool. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 418-425, 2004.

BRINDLE, J. T.; NICHOLSON, J. K.; SCHOFIELD, P. M.; GRAINGER, D. J.; HOLMES, E. Application of chemometrics to 1H NMR spectroscopic data to investigate a relationship between human serum metabolic profiles and hypertension. **The Analyst**, v. 128, p. 32-36, 2003.

CORDEIRO, M. C. R. **Engenharia genética**: conceitos básicos, ferramentas e aplicações. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2003. 43 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 86).

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v. 411, p. 843-847, 2001.

DURAN, A. L.; YANG, J.; WANG, L.; SUMNER, L. W. Metabolomics spectral formatting, alignment and conversion tools (MSFACTs). **Bioinformatics**, v. 19, p. 2283-2293, 2003.

FERNIE, A. R.; TRETHEWEY, R. N.; KROTZKY, A. J.; WILLMITZER, L. Metabolite profiling : From diagnostics to systems biology. **Natural Review of Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 763-769, 2004.

FIEHN, O. Metabolomics–the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 155-171, 2002.

FORST, C. V. Host–pathogen systems biology. **Drug Discovery Today,** v. 11, n. 6, p. 220-227, 2006.

FUKUSAKY, E.; KOBAYASHI, A. Plant metabolomics: potential for practical operation. **Journal of Bioscience and Bioengineering,** v. 100, n. 4, p. 347-354, 2005.

GERMAN, J. B.; ROBERTS, M. A.; WATKINS, S. M. Genomics and metabolomics as markers for the interaction of diet and health: lessons from lipids. **Journal of Nutrition,** v. 133, n. 2078-2083, 2003.

GERMAN, J. B.; WATKINS, S. M.; FAY, L. B. Metabolomics in practice: emerging knowledge to guide future dietetic advice toward individualized health. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 105, p. 1425-1432, 2005.

GIBNEY, M. J.; WALSH, M.; BRENNAN, L.; ROCHE, H. M.; GERMAN, B.; VAN OMMEN, B. Metabolomics in human nutrition: opportunities and challenges. **The American Journal of Clinical Nutrition,** v. 82, p. 497-503, 2005.

GOODACRE, R.; VAIDYANATHAN, S.; DUNN, W. B.; HARRIGAN, G. G.; KELL, D. B. Metabolomics by numbers: Acquiring and understanding global metabolite data. **Trends in Biotechnology**, v. 22, p. 245-252, 2004.

GUBLER, U.; HOFFMAN, B. J. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. **Gene,** v. 25, p. 263-269, 1983.

HALL, R. D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. **New Phytologist**, v. 169, p. 453-468, 2006.

KULESH, D. A.; CLIVE, D. R.; ZARLENGA, D. S.; GREENE, J. J. Identification of interferon-modulated proliferation-related cDNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, p. 8453-8457, 1987.

LASHKARI, D. A.; DeRISI, J. L.; McCUSKER, J. H.; NAMATH, A. F.; GENTILE, C.; HWANG, S. Y.; BROWN, P.O.; DAVIS, R. W. Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 13057-13062, 1997.

LIANG, P.; PARDEE, A. B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, v. 257, p. 967-971, 1992.

LINDON, J. C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. Metabolomics and its role in drug development and disease diagnosis. **Expert Review of Molecular Diagnosis**, v. 4, p. 189-1999, 2004.

LINDON, J. C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. So what's the deal with metabonomics? **Analitical Chemistry**, v. 75, p. 384-391, 2003.

MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 23, p. 24-28, 1999.

MUNGUR, R.; GLASS, A. D. M; GOODENOW, D. B.; LIGHTFOOT, D. A. Metabolite fingerprinting in Nicotiana tabacum altered by the Escherichia coli glutamate desidrogenase gene**. Journal of Biomedicine and Biotechnology,** v. 2, p. 198-214, 2005.

NICHOLLS, A. W.; HOLMES, E.; LINDON, J. C.; SHOCKCOR, J. P.; FARRANT, R. D.; HASELDEN, J. N.; DAMMENT, S. J.; WATERFIELD, C. J.; NICHOLSON, J. K. Metabonomic investigations into hydrazine toxicity in the rat. **Chemical Research in Toxicology**, v. 14, p. 975-987, 2001.

NICHOLSON, J. K.; CONNELLY, J.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. **Nature Reviews Drug Discovery,** v. 1, p. 153-161, 2002.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica**, v. 29, p. 1181-1189, 1999.

NICHOLSON, J. K.; WILSON, I. D. Opinion: understanding 'global' systems biology: metabonomics and the continuum of metabolism. **Natural Review of Drug Discovery**, v. 2, p. 668-676, 2003.

OTT, K. H; ARANIBAR, N.; SINGH, B.; STOCKTON, G. W. Metabonomics classifies pathways affected by bioactive compounds. Artificial neural network classification of NMR spectra of plant extracts. **Phytochemistry,** v. 62, n. 6, p. 971-985, 2003.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 4007-4021, 1975.

Reo, N.V. NMR-based metabolomics**. Drug Chemical Toxicology**, v. 25, p. 375-382, 2002.

RISCHER, H.; OKSMAN-CALDENTEY, K. M. Unintended effects in genetically modified crops: revealed by metabolomics? **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 102-104, 2006.

ROBERTSON, D. G.; REILY, M. D.; SIGLER, R. E.; WELLS, D. F.; PATERSON, D. A.; BRADEN, T. K. Metabonomics: evaluation of nuclear magnetic resonance (NMR) and pattern recognition technology for rapid in vivo screening of liver and kidney toxicants. **Toxicological Science**, v. 57, p. 326-337, 2000.

ROBERTSON, D. G. Metabonomics in toxicology: a review. **Toxicological Sciences**, v. 85, p. 809-822, 2005.

ROCHA, T. L.; COSTA, P. H. A.; MAGALHÃES, J. C. C.; EVARISTO, R. G. S; VASCONCELOS, E. A. R.; COUTINHO, M. V.; PAES, N. S.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. **Eletroforese bidimensional e análise de proteomas**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 12 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 136).

ROCHFORT, S. Metabolomics Reviewed: a new "omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research. **Journal of Natural Products**, v. 68, n.12, p. 1813-1820, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal Molecular Biology**, v. 94, p. 3, p. 441-448, 1975.

SARGENT, T. D.; DAVID, I. B. Differential gene expression in the gastrula of Xenopus laevis. **Science**, v. 222, p. 135-139, 1983.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R. W.; BROWN, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, v. 270, p. 467-470, 1995.

SMITH, L. M.; FUNG, S.; HUNKAPILLER, M. W.; HUNKAPILLER, T. J.; HOOD, L. E. The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus: synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis. **Nucleic Acids Researches**, v. 13, n. 7, p. 2399-412, 1985.

SMITH, L. M.; SANDERS, J. Z.; KAISER, R. J.; HUGHES, P.; DODD, C.; CONNELL, C. R.; HEINER, C.; KENT, S. B.; HOOD, L. E. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. **Nature**, v. 321, n. 6071, p. 674-679, 1986.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, **Journal of Molecular Biology**, v. 98, p. 503-517, 1975.

STEUER, R.; KURTHS, J.; FIEHN, O.; WECKWERTH, W. Observing and interpreting correlations in metabolomic networks. **Bioinformatics**, v. 19, n. 8, p. 1019-1026, 2003.

STRAUS, S.K. Recent developments in solid-state magic-angle spinning, nuclear magnetic resonance of fully and significantly isotopically labelled peptides and proteins. Philosophical transactions of the Royal Society of London. **Series B, Biological sciences**, v. 359, n. 1446, p. 997-1008, 2004.

TIMBERLAKE, W. E. Developmental gene regulation in Aspergillus nidulans. **Developmental Biology**, v. 78, p. 497-510, 1980.

VELCULESCU, V. E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER K. W. Serial analysis of gene expression. **Science**, v. 270, n. 5235, p. 484-487, 1995.

WANT, E. J.; O'MAILLE, G.; SMITH, C. A.; BRANDON, T. R.; URITBOONTHAI, C. Q.; TRAUGER, S. A.; SIUZDAK, G. Solvent-dependent metabolite distribution, clustering, and protein extraction from serum profiling with mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 743-752, 2006.

WATKINS, S. M.; HAMMOCK, B. D.; NEWMAN, J. W.; GERMAN, J. B. Individual metabolism should guide agriculture toward foods for improved health and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 283-286, 2001.

WECKWERTH, W. Metabolomics in systems biology. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 669-689, 2003.

WECKWERTH, W.; MORGENTHAL, K. Metabolomics: from patterns recognition to biological interpretation. **Drug Discovery Today: Targets**, v. 10, n. 22, p. 1551-1558, 2005.

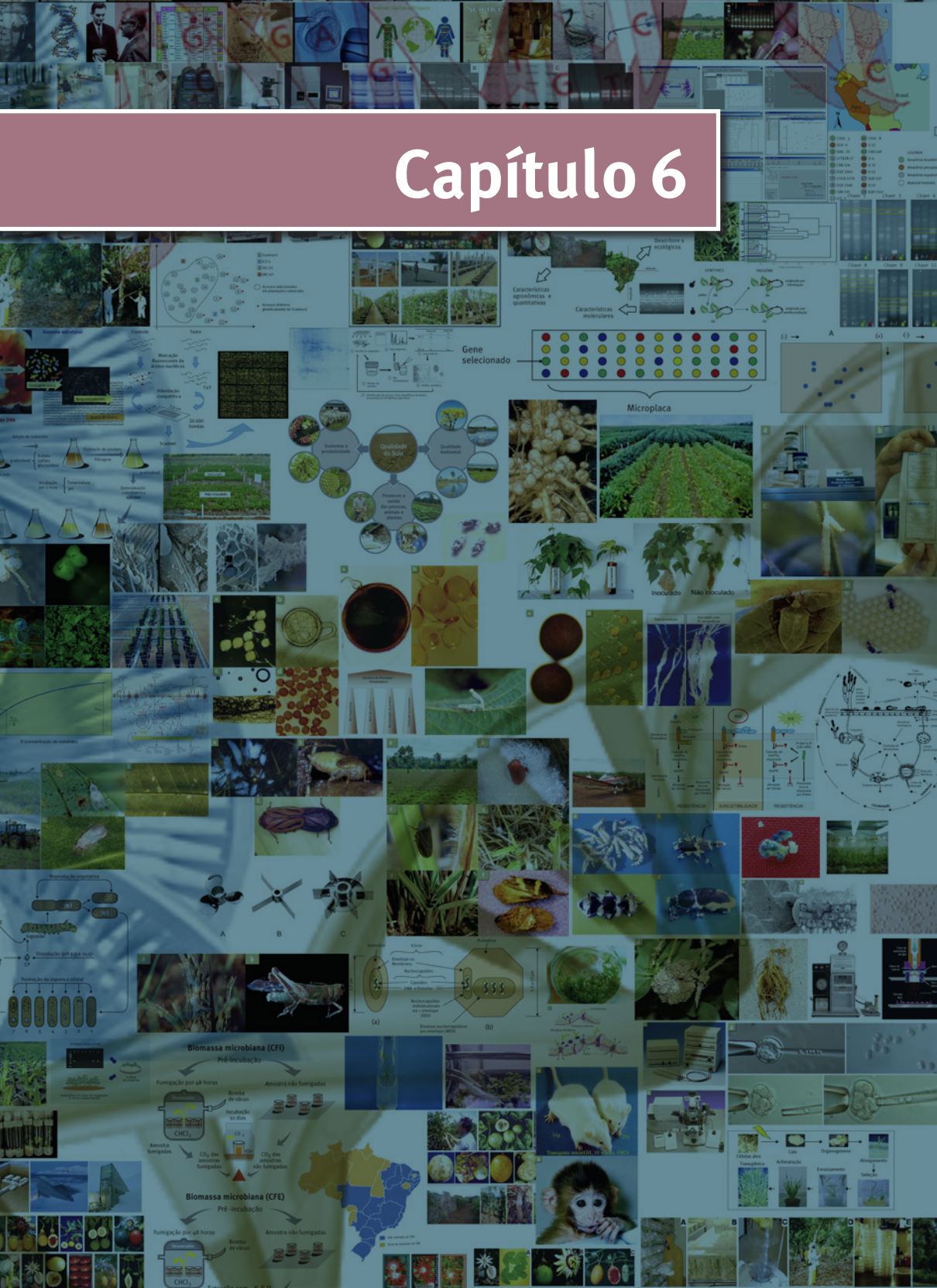
WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. **Proteomics in practice**: a laboratory manual of proteome analysis. Weinheim: Wiley-VCH, 2002.

WILSON, I. D.; PLUMB, R.; GRANGER, J.; MAJOR, H.; WILLIAMS, R.; LENZ, E. M. HPLC-MS-based methods for the study of metabonomics. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 817, p. 67-76, 2005.

ZIMMERMANN, C. R.; ORR, W. C.; LECLERC, R. F.; BARNARD, E. C.; TIMBERLAKE, W. E. Molecular cloning and selection of genes regulated in Aspergillus development. **Cell**, v. 21, p. 709-715, 1980.

ZHANG, Q.; ZHAO, Y.; WANG, B.; TU, G. New Triterpenoid Saponins from Stelmatocrypton khasianum. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 51, n. 5, p. 574-578, 2003.

Capítulo 6


Gene selecionado
Microplaca
Inoculado
Não inoculado
Biomassa microbiana (CFI)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas
Biomassa microbiana (CFE)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas

Metagenômica: princípios e aplicações

Marco Aurélio Caldas de Pinho Pessoa Filho

Introdução

O primeiro genoma microbiano sequenciado por completo foi o do patógeno *Haemophilus influenzae* (FLEISCHMANN et al., 1995). Nesse mesmo ano, o genoma de outro patógeno humano – *Mycoplasma genitalium* – também foi publicado (FRASER et al., 1995). Desde então, dados genômicos têm sido gerados de forma exponencial para centenas de microrganismos. O sucesso na realização de projetos genoma dos mais diversos organismos de interesse biotecnológico é evidenciado pela elevada quantidade de informações presentes em bancos de dados genômicos públicos, disponíveis online. Uma consulta ao banco Entrez Genome, pertencente ao National Center for Biotechnolgy Information (NCBI), demonstra que existem informações armazenadas – sejam elas sobre genomas, cromossomos completos, mapas de sequência com *contigs*, ou mapas genéticos e físicos integrados – sobre 6.527 espécies. Considerando-se somente genomas microbianos, uma busca no banco Entrez Genome Project lista mais de 1.000 projetos já completos, de organismos pertencentes aos mais variados grupos microbianos.

Para aqueles organismos cujo genoma completo já foi obtido, uma série de produtos e ferramentas resultantes do esforço de sequenciamento de DNA pode ser desenvolvida com maior rapidez. A posterior montagem genômica e anotação gênica e a integração entre mapa físico e mapas genéticos, permitem a elaboração e o teste de hipóteses visando à comparação entre dados genotípicos e fenotípicos. Estratégias como a genômica comparativa e estudos de sintenia permitem que conhecimento baseado em experimentos prévios possa ser transferido para novos genomas, e que ferramentas criadas – como o desenvolvimento de marcadores moleculares – possam ser aplicadas em organismos evolutivamente próximos, para os quais pouco

conhecimento acerca de genômica tenha sido gerado. Dessa forma, nos casos em que as bases sobre a compreensão do genoma já estão em fase avançada, é possível mudar o foco das iniciativas de estudo: esforços em sequenciamento e (ou) genotipagem teriam como objetivo a predição de características de interesse, a fim de se compreender a sua base genética (TRINGE; RUBIN, 2005). A quantidade de informação armazenada e disponível para consulta em bancos de dados é significativa.

Historicamente, os projetos genoma focaram em organismos possuidores de uma característica distinta, que vai além do próprio interesse científico ou econômico na espécie: a facilidade em se obter amostras biológicas – como é o caso de animais e plantas e, no caso de microrganismos, daqueles que poderiam ser facilmente cultivados em laboratório (TRINGE; RUBIN, 2005). Isso fica claro a partir da constatação de que a maioria dos genomas microbianos já publicados pertence a espécies patogênicas (BINNEWIES et al., 2006). Essa tendência reflete a própria história da pesquisa em microbiologia e diversidade microbiana, brevemente apresentada a seguir.

Mudanças de paradigma em diversidade microbiana

Por muitos anos, o foco de pesquisa em microbiologia estava localizado na rica fonte de descobertas existentes nos microrganismos cultiváveis, já estabelecidos como modelo biológico. As raízes da microbiologia estão associadas ao advento da microscopia, com o primeiro relato da visualização de uma célula bacteriana datando de 1663, por Antonie van Leeuwenhoek. Por 200 anos, o microscópio permitiu a visualização de bactérias heterotróficas, autotróficas, ou de parasitas obrigatórios (HANDELSMAN, 2004).

A primeira mudança de paradigma em microbiologia surgiu com os trabalhos de Robert Koch. A partir dos anos 1880, seus postulados e sua inovação no desenvolvimento de meios de cultura levaram à divisão do mundo microbiológico em cultivável e não cultivável. O interesse de pesquisadores foi dedicado ao estudo de bactérias mantidas em cultura pura, gerando a considerável quantidade de informações contidas em livros-texto de microbiologia. Por muito tempo, microbiologistas ignoraram o desafio de identificar e caracterizar organis-

mos não cultiváveis. Entre os anos 1960 e 1970, tal trabalho foi deixado nas mãos de cientistas que persistiam em acumular informações que sugeriam que meios de cultura não capturavam o espectro completo da diversidade microbiana (HANDELSMAN, 2004).

De fato, trabalhos de levantamento da atividade de microrganismos aquáticos não fotossintéticos evidenciaram que grande parte do mundo microbiano não era representada pelos organismos cultiváveis (STALEY; KONOPKA, 1985). Havia uma grande discrepância entre os tamanhos populacionais estimados por diferentes métodos de quantificação. Esse fenômeno ficou conhecido como "a grande anomalia em contagem em placas". Era comum o relato de valores muito maiores de células bacterianas por contagem microscópica direta do que por contagem em placa de cultivo. Especulava-se que as bactérias que não cresciam em meio de cultura não eram viáveis, ou como alternativa, que elas poderiam ser consideradas vivas, mas incapazes de crescer sob as condições fornecidas pelo procedimento de cultivo (STALEY; KONOPKA, 1985). Em ambientes como o solo, os valores chegavam a 0,1 % a 1 % de bactérias presentes no ambiente que poderiam ser cultivadas em meios de uso padrão (TORSVIK et al., 1990).

Uma nova mudança de paradigma aconteceu em 1985, com um grande avanço experimental embasado no trabalho pioneiro de Carl Woese, que demonstrou que genes do RNA ribossomal (rRNA) poderiam ser utilizados como ferramentas de medida de divergência evolutiva (WOESE, 1987). A análise direta das sequências dos genes rRNA 5S e 16S foi utilizada para a descrição da diversidade de microrganismos em uma amostra ambiental, sem isolamento ou cultivo (LANE et al., 1985). Essa metodologia ficou conhecida como filotipagem. Na época, essa abordagem apresentava o grande desafio técnico de se trabalhar com sequenciamento direto de RNA ou de cópias de DNA geradas por transcriptase reversa. O desenvolvimento da tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR) e o desenho de iniciadores que poderiam ser utilizados na amplificação do gene ribossomal aceleraram a descoberta de novos táxons nos mais diversos ambientes terrestres (HANDELSMAN, 2004).

A partir daí, diferentes técnicas moleculares foram implementadas para a utilização do gene ribossomal bacteriano como medida de

diversidade filogenética. A amplificação da região 16S a partir de uma amostra ambiental, com iniciadores conservados, foi seguida da utilização de técnicas como eletroforese em agarose ou poliacrilamida, eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) (MUYZER et al., 1993), ou eletroforese capilar. A amplificação da região espaçadora entre as unidades 16S e 23S (a região ITS) também foi utilizada como medida de diversidade entre táxons mais próximos, em razão da sua maior taxa de mutação e maiores níveis de diversidade de sequência. Essa tecnologia ficou conhecida como RISA (do inglês rRNA internal spacer analysis) (BORNEMAN; TRIPLETT, 1997). A posterior fragmentação do *amplicon* por enzimas de restrição (ARDRA) também foi implementada como ferramenta molecular de análise de diversidade bacteriana. A técnica é, na verdade, um tipo de RFLP, e envolve a fragmentação – por uma ou várias enzimas de restrição – do fragmento ribossomal amplificado, seja ele 16S, 23S, ou espaçador, dependendo do tipo de aplicação desejado (REIS JUNIOR et al., 2002).

A inclusão de um passo de clonagem de fragmentos de DNA "ambiental" em um hospedeiro cultivável levou ao surgimento de uma nova linha de pesquisa em diversidade microbiana e na biotecnologia de microrganismos. A análise genômica de uma população de microrganismos surgiu como peça chave de um novo avanço na pesquisa em microbiologia. Assim, capturado para estudo e preservação, DNA microbiano poderia ser utilizado na busca de informações sobre a fisiologia e a genética de organismos não cultiváveis (HANDELSMAN, 2004). A esse novo insight no mundo das bactérias não cultiváveis foi dado o nome de metagenômica.

Metagenômica – análise genômica de populações microbianas

O primeiro relato de clonagem de DNA diretamente extraído e purificado de amostras ambientais foi feito em uma análise de comunidades microbianas marinhas (SCHMIDTet al., 1991). Esse trabalho tratava da amplificação e clonagem do gene 16S, e posterior sequenciamento de clones dessa biblioteca, permitindo um levantamento da diversidade filogenética das populações de picoplâncton marinho.

Posteriormente, a construção de uma biblioteca metagenômica a partir de uma mistura de organismos enriquecidos em gramíneas ressecadas em laboratório permitiu a detecção de clones que expressavam atividade celulolítica (HEALY et al., 1995). A partir daí, estavam embasados dois dos componentes principais da pesquisa em metagenômica: a análise de diversidade microbiana da fração não cultivável de organismos e a análise funcional de genes de organismos presentes em um ambiente de interesse, independente do cultivo desses.

O termo metagenômica foi descrito pela primeira vez por Jo Handelsman, da Universidade de Wisconsin (EUA), a partir da sugestão de uma série de procedimentos para acessar o metabolismo de microrganismos desconhecidos no solo. Seu propósito era avançar a pesquisa em produtos naturais. Partindo do pressuposto de que a grande maioria dos microrganismos de solo nunca foi isolada nem cultivada em laboratório, foi sugerido que esse ambiente poderia constituir a maior fonte de recursos intocados para a química de produtos naturais (HANDELSMAN et al., 1998). A maneira sugerida seria a clonagem de metagenomas a fim de se acessar os genomas coletivos e o maquinário biossintético da microbiota de solos.

Dessa forma, assim como a genômica, a metagenômica consiste tanto de um conjunto de técnicas de pesquisa, contendo diferentes abordagens e metodologias, bem como de uma área de pesquisa propriamente dita. O significado do prefixo *meta* (além, transcendente, em grego) inclui o ideal de se superar a impossibilidade de se isolar e avaliar a diversidade genômica da grande maioria dos microrganismos. Por um lado, a metagenômica busca a compreensão da biologia em um nível de comunidades, transcendendo o organismo individual e focando em genes e seus efeitos na própria comunidade. Por outro, expressa a necessidade do desenvolvimento de métodos computacionais que maximizem o entendimento da composição genética e das atividades de comunidades por vezes tão complexas que só podem ser avaliadas por amostragem, e nunca completamente caracterizadas (RESEARCH COUNCIL (U.S.), 2007).

Em termos práticos, as diversas abordagens que compõem o que se chama hoje de metagenômica incluem a caracterização de comunidades microbianas ou seus membros por métodos que não depen-

dem de cultivo, aplicando técnicas de análise em alta escala (ferramentas da genômica, proteômica, transcriptômica, etc.)(RESEARCH COUNCIL (U.S.), 2007).

A metagenômica difere da genômica na medida em que independe do isolamento de um organismo em particular para posterior análise de seu genoma individual. A princípio, a metagenômica poderia acessar 100 % dos recursos genéticos presentes em um ambiente, enquanto métodos tradicionais de cultivo e da genômica acessariam 1 % dessa diversidade. Os primeiros estudos de filotipagem respondiam com confiança perguntas sobre "quem" estava presente no ambiente amostrado, sem grandes possibilidades de responder "o que" esses organismos estavam fazendo, ou seja, que funções eles potencialmente exerciam nesses ambientes. As técnicas aplicadas atualmente em metagenômica aprofundam a capacidade de avaliar ecossistemas como unidades biológicas, possuidoras dos seus próprios mecanismos genéticos, indo além da consideração de espécies individuais. Sugere-se que a pergunta principal em projetos em metagenômica seja "O que está sendo feito pela comunidade microbiana?" (RESEARCH COUNCIL (U.S.), 2007)..

Principais abordagens em projetos de metagenômica

Em linhas gerais, análises metagenômicas consistem no isolamento de DNA proveniente de uma amostra ambiental, fragmentação e clonagem do DNA em um vetor adequado, inserção dos clones em um hospedeiro bacteriano, e *screening* das células transformadas. Os clones podem ser avaliados quanto à presença de marcadores filogenéticos (conhecidos como âncoras), tais como o próprio gene rRNA 16S ou o gene *recA*, ou de outros genes conservados. Também podem ser testados quanto à expressão de fenótipos ou características específicas, tais como atividades enzimáticas ou a produção de antibióticos. Por fim, outra possibilidade é o sequenciamento aleatório de clones da biblioteca (HANDELSMAN, 2004). Na Figura 1, mostra-se um organograma clássico em projetos de metagennômica.

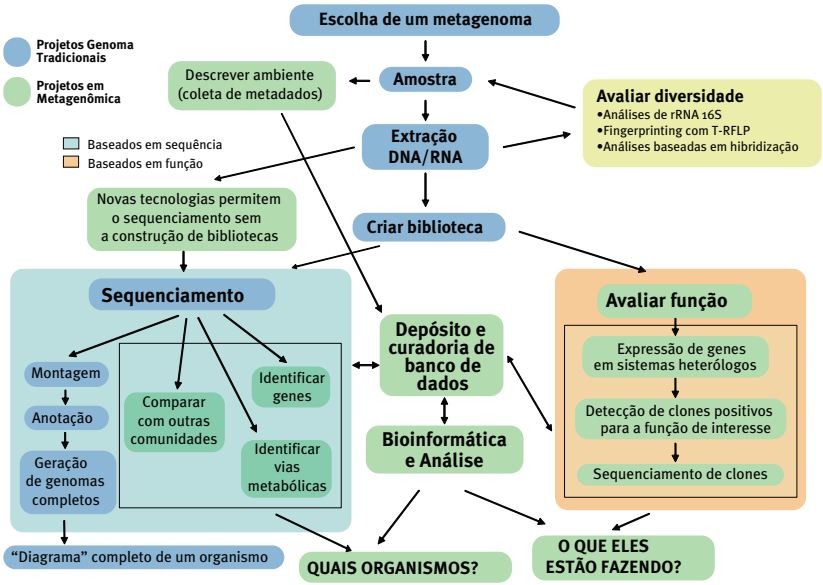


Figura 1. Organograma das diferentes etapas de um projeto em metagenômica .

Fonte: Traduzido e adaptado de Research Council (US). Committee on Metagenomics: Challenges and Functional Application, 2007.

Dessa forma, duas estratégias são mais frequentemente utilizadas na busca de alvos funcionais presentes em bibliotecas metagenômicas, sendo possível dividir os estudos nos seguintes tipos de abordagens: *screenings* baseados em análise funcional e *screenings* baseados em sequenciamento.

Uma abordagem baseada em função gênica busca por clones que expressam a característica de interesse nas bibliotecas construídas. A partir da seleção de clones positivos, é possível a obtenção de informações acerca do controle genético da característica em estudo. Isso pode ser realizado por subclonagem e sequenciamento do fragmento metagenômico inserido no vetor de expressão, e posterior anotação gênica para definição das ORFs presentes no fragmento clonado (MIRETE et al., 2007). Uma das vantagens desse tipo de estratégia está na possibilidade de se capturar clones com potencial aplicação direta – por

exemplo, na descoberta de enzimas de interesse biotecnológico para a indústria. Outra vantagem é a chance de descoberta de sequências funcionais não descritas em estudos anteriores, com papéis distintos de biocatalisadores já conhecidos (YUN; RYU, 2005).

Por outro lado, para que os fragmentos metagenômicos inseridos nos hospedeiros de expressão (por exemplo, *E. coli*) possibilitem a detecção de clones positivos para a característica de interesse na biblioteca, é preciso que os genes contidos nos fragmentos sejam corretamente transcritos, traduzidos e que as enzimas sintetizadas sejam biologicamente funcionais. Além disso, caso a função biológica exija a expressão de múltiplos genes, é necessária a presença de todos os genes da via em questão, para que esta seja identificada. Em uma situação em que centenas ou milhares de clones precisam ser avaliados, essa estratégia exige o estabelecimento de métodos eficientes e econômicos para que a avaliação seja feita em alta escala (YUN; RYU, 2005).

Os primeiros estudos que utilizaram um *screening* baseado em sequência fizeram uso de hibridização ou PCR para a detecção de genes de interesse, tendo como referência sequências de DNA conservadas. Assim, essa estratégia não poderia ser aplicada para um número grande de alvos, e também não garantiria a obtenção de genes completos, ou grupos gênicos necessários para a síntese de um produto desejado. Apesar de já ter sido utilizada na descoberta de várias enzimas de importância industrial, a aplicação típica para esse tipo de abordagem acabou sendo a amplificação de genes ribossomais em estudos de diversidade filogenética (YUN; RYU, 2005).

Estudos de sequenciamento de bibliotecas metagenômicas têm feito uso de sequenciamento *shotgun*, e mais recentemente, sequenciamento de nova geração (como, por exemplo, pirosequenciamento). Essas metodologias fornecem uma grande quantidade de informação, desde relações filogenéticas, descoberta de novos genes e dedução de vias metabólicas em bactérias não cultiváveis. A quantidade de dados leva a análises laboriosas para as quais novos paradigmas de estudo em bioinformática ainda estão sendo estabelecidos.

Tanto os estudos baseados em prospecção de função, quanto os estudos que fazem uso de sequenciamento de DNA apresentam uma baixa frequência de detecção de clones positivos (tão baixas quanto

quatro clones positivos em 930.000 clones avaliados) (HENNE et al., 2000). Várias estratégias foram implementadas para aumentar a eficiência no *screening*. Entre elas, o uso de organismos hospedeiros como *Streptomyces lividnas* ou *Pseudomonas putida* e *E. coli* a fim de se superar as limitações e dificuldades da expressão heteróloga de metabólitos secundários (KOMATSU et al., 2010). Etapas de enriquecimento de microrganismos não cultiváveis que contêm as características de interesse também têm sido empregadas antes da construção de bibliotecas metagenômicas (ENTCHEVA et al., 2001).

Outra abordagem de *screening* (*Screening* de Expressão Gênica Induzida por Substrato – SIGEX, em sua sigla em inglês) foi proposta como alternativa para o aumento na frequência de detecção de clones positivos (UCHIYAMA et al., 2005), tendo sido testada inicialmente na busca por genes induzidos por hidrocarbonetos aromáticos em uma biblioteca metagenômica de águas subterrâneas.

Sua lógica se baseia no fato de a expressão de genes catabólicos ser, em geral, induzida por substratos ou metabólitos de enzimas catabólicas. Além disso, a expressão de genes catabólicos é controlada por elementos regulatórios em grande parte localizados em regiões próximas aos genes. Dessa forma, a técnica detecta clones que hospedam genes catabólicos expressos na presença de substratos, e não expressos na ausência destes. A estratégia faz uso de um vetor (p18GFP) no qual o sítio de clonagem divide o promotor *lac* e o gene *gfp*. Após a construção da biblioteca metagenômica utilizando esse vetor, clones sem inserto e clones expressando GFP constitutivamente na ausência de substrato são removidos por indução por IPTG. A expressão de genes catabólicos na biblioteca é determinada pela expressão de GFP na presença do substrato. Dessa forma, clones positivos são separados em placas contendo ágar e posteriormente caracterizados (YUN; RYU, 2005).

Evidentemente, um dos primeiros e mais importantes passos em qualquer projeto em metagenômica é o isolamento de DNA do ambiente em estudo. Não existe um único protocolo adequado para a extração de DNA de todos os ambientes imagináveis. Quantidade, pureza, integridade e representatividade do DNA após o isolamento são elementos-chave passíveis de consideração. A extração pode ser realizada por lise direta ou indireta, ou seja, diretamente da amostra

ambiental ou após a separação e concentração das células microbianas presentes na matriz ambiental (LEVEAU, 2007). O tipo de protocolo escolhido é altamente dependente do ambiente em estudo, dada a diferença gritante entre fatores como densidade microbiana, presença de contaminantes ou inibidores de amplificação por PCR, por exemplo. Em alguns casos, um passo de purificação é incluído no protocolo após a extração, a fim de se minimizar a contaminação com substâncias indesejáveis. Vários kits comerciais também estão disponíveis no mercado, otimizados para tipos específicos de amostra.

Outros fatores que também devem ser levados em consideração envolvem a representatividade microbiana na amostra de DNA extraído. Em alguns casos, o método de extração necessário na obtenção de DNA de um organismo pode degradar o DNA de outro. Dessa forma, é possível que, em algumas situações, mais de um método de extração deva ser utilizado na construção de uma biblioteca metagenômica. Além disso, a integridade do DNA isolado vai refletir no tipo de uso posterior desse material no fluxo do projeto: procedimentos que envolvem lise por trituração com *beads* tendem a fragmentar o DNA e são mais adequados à construção de bibliotecas de pequenos insertos, como, por exemplo, para sequenciamento *shotgun*. Por outro lado, protocolos de lise química de células recuperadas de plugues de ágar podem produzir fragmentos clonáveis de tamanho superior a 1 milhão de pares de base, adequados ao *screening* de âncoras filogenéticas ou de fenótipos de interesse (LEVEAU, 2007).

Projetos pioneiros

Projeto Efluente Ácido de Mineração

A produção de ácidos a partir da oxidação de minerais sulfídicos expostos ao ar é consequência de atividade mineradora em várias partes do mundo. As soluções ácidas que se formam nesses casos são denominadas efluentes ácidos de mineração (EAM). Comunidades microbianas conduzem essa acidificação, e elas foram foco de uma importante análise em metagenômica, com o objetivo de explorar a distribuição e a diversidade de vias metabólicas envolvidas com o

EAM. Exemplos dessas vias são a fixação de nitrogênio e a oxidação de enxofre e ferro. Esse estudo permitiria compreender como microrganismos toleram ambientes altamente ácidos, avaliando como estes mecanismos de tolerância afetam a geoquímica do ambiente (RESEARCH COUNCIL (U.S.), 2007; TYSON et al., 2004).

A comunidade avaliada nesse tipo de ambiente estabeleceu um paradigma de análise em metagenômica em virtude de seu nível de complexidade relativamente simples: havia somente cinco principais organismos (três espécies bacterianas e duas espécies de Archaea) formando um denso biofilme no local de coleta. Isso também permitiu que o ambiente fosse estudado em grande profundidade. Por causa da baixa complexidade da comunidade microbiana, um processo de sequenciamento *shotgun* do DNA do ambiente permitiu a montagem quase completa de dois genomas (dos cinco presentes) e a recuperação parcial dos outros três. O desafio na montagem simultânea de múltiplos genomas foi atingido por procedimentos de direcionamento de *contigs* genômicos a cada genoma específico, tendo como base a composição de bases da sequência e frequência de recuperação (RESEARCH COUNCIL (U.S.), 2007)

A análise de dados de sequência por bioinformática demonstrou as interações bioquímicas que poderiam ocorrer entre os membros da comunidade microbiana, além de evidenciar interações genéticas em termos de recombinação e transferência genética lateral. Foi possível se determinar a presença de um processo de fixação de nitrogênio ligado a uma espécie não abundante. Essa informação permitiu que essa bactéria fosse isolada em laboratório em forma pura, a partir da elaboração de métodos de isolamento baseados em informação de metabolismo bacteriano gerada por sequenciamento e análises do genoma do organismo. Foi demonstrado, então, um dos benefícios de estudos em metagenômica: a possibilidade de se cultivar organismos previamente não cultiváveis, a partir da compreensão das necessidades metabólicas destes microrganismos (RESEARCH COUNCIL (U.S.), 2007).

Um dos principais motivos do sucesso e rápido avanço do projeto relacionado aos efluentes ácidos de mineração foi a baixa complexidade da comunidade microbiana em estudo. A maioria dos conjuntos

microbianos na natureza não possui o mesmo nível básico de complexidade, sendo este um caso raro – a exceção, e não a regra. Para os níveis de complexidade mais altos encontrados em outros objetos de estudo, sabe-se que somente o sequenciamento *shotgun* não pode ser utilizado com o propósito de se montar genomas microbianos completos, mesmo que essa complexidade seja moderada. Nesses casos, outras metodologias se fazem necessárias (RESEARCH COUNCIL (U.S.), 2007).

O Projeto Mar de Sargasso

A iniciativa de se sequenciar, em altíssima escala, DNA presente em menos de 2m^3 de água do Mar de Sargasso (VENTER et al., 2004) demonstrou o potencial de geração de dados de projetos em metagenômica. Aproximadamente 1 Gpb de sequência não redundante, o que representava entre duas a três ordens de magnitude mais dados do que aqueles gerados pelo Projeto Genoma Humano, foi produzido. A quantidade de informação em diversidade microbiana era sem precedentes: 148 filotipos bacterianos desconhecidos e 1.200.000 genes, também desconhecidos, foram listados (LEVEAU, 2007). Somente essa quantidade de proteínas putativas era dez vezes maior do que as sequências presentes em todos os bancos de dados curados à época (RESEARCH COUNCIL (U.S.), 2007). Estimou-se a presença de aproximadamente 1.800 espécies na amostra, a maioria consistentes com o que se esperava ser prevalente em oceanos.

Devido à complexidade da comunidade amostrada, foi evidenciada a dificuldade em se montar *contigs* de grande tamanho a partir de dados de sequenciamento *shotgun* de comunidades mais abundantes em espécies. Nenhum genoma completo foi gerado no Projeto Mar de Sargasso, e somente poucos *contigs* puderam ser agrupados a partir da população microbiana (RESEARCH COUNCIL (U.S.), 2007). A contaminação amostral também foi um problema detectado nesse projeto, indicando a necessidade de esforços integrados de amostragem cuidadosa.

Projeto Resistoma do Solo

Esse projeto utilizou uma abordagem de metagenômica funcional na busca de genes de resistência a antibióticos presentes no solo. Em suma, fragmentos de DNA metagenômico do solo foram clonados, e os clones foram avaliados quanto à presença de fenótipos expressando resistência a antibióticos (D'COSTA et al., 2006). O projeto levou ao isolamento de novos grupos de genes de resistência a antibióticos. O fato de o objeto de estudo – a resistência a antibióticos – representar um fenótipo de fácil seleção foi uma das vantagens do projeto. Clones positivos crescem na presença de antibiótico, sendo possível a avaliação de bibliotecas contendo milhões de clones. Genes de resistência a aminoglicosídeos, que codificam um grupo de enzimas chamadas acetiltransferases, foram descritos (RIESENFELD et al., 2004), além de genes de resistência a β-lactâmicos (semelhantes a penicilina), distintos de enzimas descritas anteriormente (RESEARCH COUNCIL (U.S.), 2007).

Aplicações da metagenômica

A metagenômica possibilita aplicações de ordem prática em diferentes áreas, como, por exemplo, em biomedicina, agricultura, indústria e meio ambiente. Na agropecuária, por exemplo, existe potencial no desenvolvimento de metodologias de detecção precoce de ameaças à produção de alimentos como patologias vegetais ou animais. Em segurança alimentar, pode-se monitorar e detectar contaminantes microbianos nocivos. Além disso, permite estudos que possibilitam o desenvolvimento de estratégias e práticas que maximizam os benefícios de comunidades microbianas agindo em conjunto com culturas de importância agronômica, ou animais. Na pesquisa em bioenergia, permite estudos para o desenvolvimento de sistemas microbianos capazes de processar novas fontes de bioenergia, mais sustentáveis economicamente e ambientalmente. Ferramentas biotecnológicas provenientes de estudos em metagenômica levariam à identificação e exploração de mecanismos metabólicos microbianos gerando benefícios em produtos industrias, alimentícios e de saúde. Em meio-ambiente, ferramentas como a biorremediação podem ser resultantes de projetos em metagenômica, a partir do desenvolvimento de técnicas de

monitoramento de dano ambiental em diferentes níveis, levando a métodos de restauração de ambientes com a utilização de microrganismos biorremediadores (RESEARCH COUNCIL (U.S.), 2007).

Na pesquisa em agricultura, provavelmente a maior contribuição da metagenômica resida em estudos de comunidades microbianas presentes no solo, em associação ou não com plantas de interesse agronômico. Uma série de projetos em metagenômica de solos já identificou diversos tipos de genes de interesse, entre pigmentos, antibióticos, enzimas lipolíticas, e outros biocatalistas (DANIEL, 2005). Há possibilidade de aplicação da metagenômica no estudo de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR) (LEVEAU, 2007)

No Cerrado, levantamentos de diversidade microbiana de bactérias e fungos já foram realizados por meio do sequenciamento de bibliotecas 16S e 18S, respectivamente (DE CASTRO et al., 2008; QUIRINO et al., 2009). No caso do levantamento de populações bacterianas, detectou-se uma maior riqueza de espécies no Cerrado *sensu stricto* em relação a Cerrado convertido em pastagem. A riqueza esperada de espécies no Cerrado *sensu stricto* seria 10 vezes maior do que a do Cerrado convertido em pastagem, por meio da plotagem de linhagens através do tempo (QUIRINO et al., 2009). No caso das populações fúngicas, foi detectada uma redução na diversidade de espécies, associada a atividades antropogênicas como o cultivo de soja, em comparação com Cerrado nativo (DE CASTRO et al., 2008).

Um exemplo de uso da metagenômica em projetos envolvendo meio-ambiente e potenciais aplicações biotecnológicas de recursos genéticos microbianos envolve a descoberta de mecanismos metabólicos relacionados com a resistência ao excesso de níquel em uma população bacteriana. Populações de bactérias da rizosfera de *Erica andevalensis* (MIRETE et al., 2007), presentes em áreas de oxidação de sulfetos minerais, ricas em metais tóxicos e altamente ácidas, foram analisadas em termos de sua diversidade filogenética, e do potencial de expressão de genes de tolerância ao excesso de níquel. O artigo apresenta o primeiro relato sobre a descoberta de genes de resistência a Ni a partir de uma comunidade microbiana desse tipo de ambiente. Genes já conhecidamente envolvidos com resistência a Ni foram detectados, e de um total de 13 clones positivos, 5 codifica-

vam proteínas já conhecidas, porém nunca associadas à resistência à Ni, enquanto 6 clones codificavam proteínas hipotéticas ou de função desconhecida. Este trabalho demonstra a possibilidade de aplicação de abordagens recentes em microbiologia ambiental, associando genômica avançada em alta escala, prospecção de função gênica, além da análise em alta escala de diversidade de populações microbianas.

Na busca de genes de interesse na produção de biocombustíveis, diversos trabalhos já foram publicados. Um deles (BRULC et al., 2009) fez uso de pirosequenciamento, uma tecnologia de sequenciamento de nova geração que gera uma quantidade de dados maior que o sequenciamento tradicional de Sanger, a um custo mais baixo, permitindo estudos em altíssima escala. Essa metodologia elimina a necessidade de clonagem, partindo diretamente para o sequenciamento (LIU, 2009; SNYDER et al., 2009). O trabalho de Brulc e colaboradores também utilizou uma abordagem de metagenômica comparativa entre 3 microbiomas aderidos a fibras e 1 amostra líquida. Os microbiomas dos três animais amostrados foram completamente diferentes, apesar da dieta similar, quanto a sua estrutura, diversidade filogenética e potencial metabólico.

Na indústria, a busca por enzimas de interesse como biocatalisadores tem ligado a metagenômica a aplicações e processos industriais. Diversos empreendimentos em biotecnologia têm sido estabelecidos com o propósito de prospectar enzimas com potencial aplicação industrial (LORENZ; ECK, 1988).

Considerações finais

Apesar do enorme potencial de uso da metagenômica em diferentes objetos de pesquisa, o conhecimento de suas limitações permite um uso racional de suas metodologias e um melhor planejamento de futuros projetos. Abordagens que fazem uso de uma triagem funcional dependem da expressão bem sucedida de genes clonados na bactéria hospedeira, conforme já mencionado anteriormente. Em triagens baseadas em sequenciamento, não é possível a obtenção de genes completamente novos. Além disso, pode ocorrer a clonagem de genes parciais, e a seleção de genes não funcionais (DANIEL, 2005).

O pesquisador deve ter em mente que o valor de predição e interpretação de dados em metagenômica é limitado pela validade de informação presente em banco de dados. A quantidade de genes listados com função desconhecida é enorme, e para aqueles genes com função inferida a partir de análises de similaridade, ainda é necessária validação experimental. Nesse sentido, o progresso no cultivo de bactérias antes não cultiváveis, a fim de se obter representantes isolados do ambiente em estudo, é de extremo valor. Dessa forma, a metagenômica deve ser recebida como uma metodologia complementar a abordagens tradicionais em testes de hipótese sobre a composição, diversidade e funcionalidade de comunidades microbianas (LEVEAU, 2007).

A mudança de paradigmas de sequenciamento que tem ocorrido nos últimos anos também é um fator limitante de abordagens que geram quantidades exorbitantes de informação. Serão necessários avanços em bioinformática diante da adaptação à enorme quantidade de dados de sequenciamento gerados. Em virtude da inexistência de pacotes para análise global de dados, devem ser levados em conta, em projetos de metagenômica, a complexidade da amostra e a montagem de genomas a partir de amostras complexas. Vale salientar que todo o progresso e desenvolvimento em bioinformática atenderam a projetos que utilizavam a tecnologia de sequenciamento de Sanger, sendo necessária uma renovação e adequação de processos e metodologias que atendam projetos futuros (CHEN; PACHTER, 2005; KUNIN et al., 2008; RESEARCH COUNCIL (U.S.), 2007).

Referências

BINNEWIES, T. T.; MOTRO, Y.; HALLIN, P. F.; LUND, O.; DUNN, D.; LA, T.; HAMPSON, D. J.; BELLGARD, M.; WASSENAAR, T. M.; USSERY, D. W. Ten years of bacterial genome sequencing: comparative-genomics-based discoveries. **Functional and Integrative Genomics**, v. 6, n. 3, p. 165-85, 2006.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2647-2653, 1997.

BRULC, J. M.; ANTONOPOULOS, D. A.; MILLER, M. E. B.; WILSON, M. K.; YANNARELL, A. C.; DINSDALE, E. A.; EDWARDS, R. E.; FRANK, E. D.; EMERSON, J. B.; WACKLIN, P.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B.; NELSON, K. E.; WHITE, B. A. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 106, n. 6, p. 1948-53, Feb. 2009.

CHEN, K.; PACHTER, L. Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. **PLoS Computational Biology**, v. 1, n. 2, p. 106-112, 2005.

D'COSTA, V. M.; MCGRANN, K. M.; HUGHES, D. W.; WRIGHT, G. D. Sampling the antibiotic resistome. **Science**, v. 311, n. 5759, p. 374-7, Jan. 2006.

DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 470-478, 2005.

DE CASTRO, A. P.; QUIRINO, B. F.; PAPPAS, G.; KUROKAWA, A. S.; NETO, E. L.; KRÜGER, R. H. Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields. **Archives of Microbiology**, v. 190, n. 2, p. 129-139, 2008.

ENTCHEVA, P.; LIEBL, W.; JOHANN, A.; HARTSCH, T.; STREIT, W. R. Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 89-99, Jan. 2001.

FLEISCHMANN, R. D.; ADAMS, M. D.; WHITE, O.; CLAYTON, R. A.; KIRKNESS, E. F.; KERLAVAGE, A. R.; BULT, C. J.; TOMB, J. F.; DOUGHERTY, B. A.; MERRICK, J. M. Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 496-512, Jul. 1995.

FRASER, C. M.; GOCAYNE, J. D.; WHITE, O.; ADAMS, M. D.; CLAYTON, R. A.; FLEISCHMANN, R. D.; BULT, C. J.; KERLAVAGE, A. R.; SUTTON, G.; KELLEY, J. M.; FRITCHMAN, R. D.; WEIDMAN, J. F.; SMALL, K. V.; SANDUSKY, M.; FUHRMANN, J.; NGUYEN, D.; UTTERBACK, T. R.; SAUDEK, D. M.; PHILLIPS, C. A.; MERRICK, J. M.; TOMB, J. F.; DOUGHERTY, B. A.; BOTT, K. F.; HU, P. C.; LUCIER, T. S.; PETERSON, S. N.; SMITH, H. O.; HUTCHISON, C. A.; VENTER, J. C. The minimal gene complement of Mycoplasma genitalium. **Science**, v. 270, n. 5235, p. 397-403, Oct. 1995.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 669, 2004.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemical Biology**, v. 5, n. 10, p. R245-9, Oct. 1998.

HEALY, F. G.; RAY, R. M.; ALDRICH, H. C.; WILKIE, A. C.; INGRAM, L. O.; SHANMUGAM, K. T. Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 4, p. 667-74, Aug./Sep. 1995.

HENNE, A.; SCHMITZ, R. A.; BOMEKE, M.; GOTTSCHALK, G.; DANIEL, R. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on Escherichia coli. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 3113-6, Jul. 2000.

KOMATSU, M.; UCHIYAMA, T.; OMURA, S.; CANE, D. E.; IKEDA, H. Genome-minimized Streptomyces host for the heterologous expression of secondary metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 6, p. 2646-2651, Feb. 2010.

KUNIN, V.; COPELAND, A.; LAPIDUS, A.; MAVROMATIS, K.; HUGENHOLTZ, P. A bioinformatician's guide to metagenomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 4, p. 557, 2008.

LANE, D.; PACE, B.; OLSEN, G.; STAHL, D.; SOGIN, M.; PACE, N. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 82, n. 20, p. 6955-6959, Jan, 1985.

LEVEAU, J. The magic and menace of metagenomics: prospects for the study of plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 3, p. 279-300, 2007.

LIU, G. Applications and Case Studies of the Next-Generation Sequencing Technologies in Food, Nutrition and Agriculture. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 75-79, 2009.

LORENZ, P.; ECK, J. Metagenomics and industrial applications. **Genomics**, v. 2, p. 231-239, 1988.

MIRETE, S.; DE FIGUERAS, C. G.; GONZÁLEZ-PASTOR, J. E. Novel nickel resistance genes from the rhizosphere metagenome of plants adapted to acid mine drainage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 19, p. 6001-11, Oct. 2007.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

QUIRINO, B. F.; PAPPAS, G. J.; TAGLIAFERRO, A. C.; COLLEVATTI, R. G.; NETO, E. L.; DA SILVA, M. R. S. S.; BUSTAMANTE, M. M. C.; KRÜGER, R. H. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. **Microbiological Research**, v. 164, n. 1, p. 59-70, Jan. 2009.

REIS JÚNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 33 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 51). 2002.

RESEARCH COUNCIL (U.S.). Committee on metagenomics: challenges and functional applications, n. **The new science of metagenomics:** revealing the secrets of our microbial planet. [S. l.], 2007. 158 p.

RIESENFELD, C. S.; SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. **Annual Review Genetics**, v. 38, p. 525-52, Jan. 2004.

SCHMIDT, T.; DELONG, E.; PACE, N. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 14, p. 4371, 1991.

SNYDER, L.; LOMAN, N.; PALLEN, M.; PENN, C. Next-Generation Sequencing-the Promise and Perils of Charting the Great Microbial Unknown. **Microbial Ecology**, v. 57, n. 1, p. 1-3, 2009.

STALEY, J. T.; KONOPKA, A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. **Annual Reviews Microbiology**, v. 39, p. 321-46, Jan. 1985.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 782-7, Mar. 1990.

TRINGE, S.; RUBIN, E. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 11, p. 805-814, 2005.

TYSON, G.; CHAPMAN, J.; HUGENHOLTZ, P.; ALLEN, E.; RAM, R.; RICHARDSON, P.; SOLOVYEV, V.; RUBIN, E.; ROKHSAR, D.; BANFIELD, J. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. **Nature**, v. 428, n. 6978, p. 37-43, 2004.

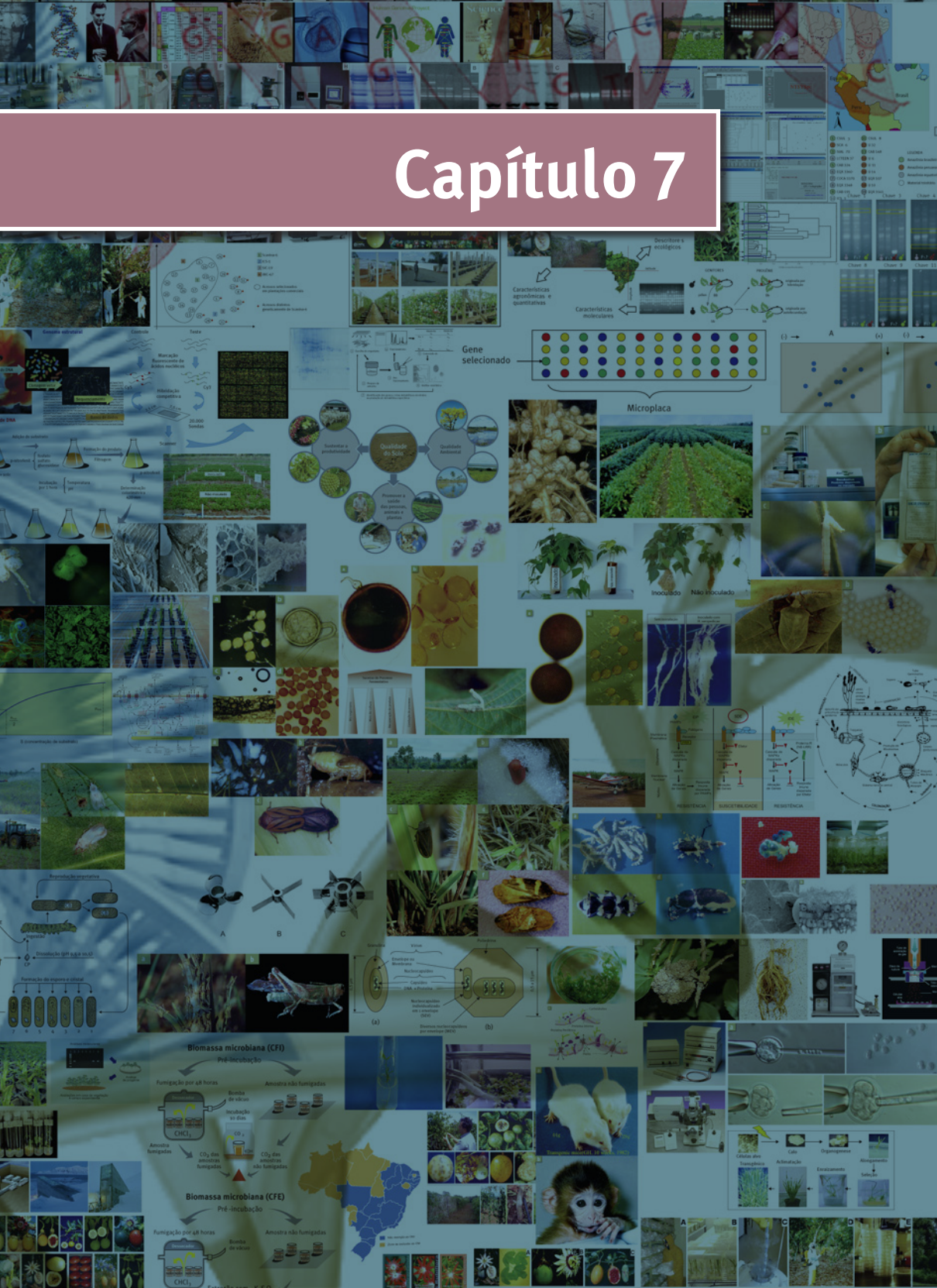
UCHIYAMA, T.; ABE, T.; IKEMURA, T.; WATANABE, K. Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 88-93, Jan. 2005.

VENTER, J. C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J. F.; HALPERN, A. L.; RUSCH, D.; EISEN, J. A.; WU, D.; PAULSEN, I.; NELSON, K. E.; NELSON, W.; FOUTS, D. E.; LEVY, S.; KNAP, A. H.; LOMAS, M. W.; NEALSON, K.; WHITE, O.; PETERSON, J.; HOFFMAN, J.; PARSONS, R.; BADEN-TILLSON, H.; PFANNKOCH, C.; ROGERS, Y.-H.; SMITH, H. O. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, v. 304, n. 5667, p. 66-74, Apr. 2004.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221-271, Jun. 1987.

YUN, J.; RYU, S. Screening for novel enzymes from metagenome and SIGEX, as a way to improve it. **Microbial Cell Factories**, v. 4, n. 1, p. 8, Mar. 2005.

Capítulo 7


Gene selecionado
Microplaca
Inoculado
Não inoculado
Biomassa microbiana (CFI)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas
Biomassa microbiana (CFE)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas

Biotecnologia e diagnósticos moleculares

Maria Cristina Rocha Cordeiro

Introdução

Em primeiro lugar, é necessário conceituar o que seja biotecnologia e diagnóstico molecular para, em seguida, explicar qual é a relação entre biotecnologia e diagnóstico molecular.

Biotecnologia é um termo relativamente novo, muito embora sua prática seja até antiga. A biotecnologia em si é a utilização de processos biológicos como geradores de tecnologias de forma que se agregue valor a um dado produto. A biotecnologia pode ser considerada um processo antigo quando nos referimos por exemplo à tecnologia de produção de vinhos, cerveja, queijo etc. O que são, em última instância, essas práticas? São processos biológicos que foram aproveitados para a geração de tecnologia tendo em vista a formação de um novo produto com valor agregado. No caso do vinho e da cerveja, o aproveitamento foi da fermentação anaeróbica do suco da uva ou da cevada e, no caso do queijo, do leite.

Diagnóstico molecular pode ser conceituado como sendo o uso de ferramentas moleculares que indique, ou demonstre, a solução de uma dada questão. Por exemplo, no campo da saúde, o termo diagnóstico é utilizado como um meio de esclarecer os sintomas de uma doença. Diagnóstico molecular é quando esse esclarecimento é realizado em nível molecular. No campo da biologia, o diagnóstico molecular pode ser utilizado, por exemplo, quando se quer identificar especificamente uma planta ou um animal. Na agropecuária, o diagnóstico molecular pode estar relacionado com a identificação de uma dada cultivar mais produtiva, mais resistente a uma dada doença, a identificação de um dado patógeno etc. O diagnóstico molecular pode ser considerado como um caminho que leva à biotecnologia e esta, como geradora de um processo, uma tecnologia nova com valor agregado. Como exemplo dessa relação estão os processos de identificação em

nível molecular de, por exemplo, plantas e animais transgênicos e (ou) kits de identificação de patógenos que podem resultar em processos patenteáveis (com valor agregado).

Para que um diagnóstico molecular seja efetivo, para qualquer situação, ele deve ser considerado dentro de quatro quesitos importantes como: a reprodutibilidade, a especificidade, a distinguibilidade e a sensibilidade. Reprodutibilidade significa que o diagnóstico deve ser sempre repetido exatamente da mesma maneira dentro da situação específica. Especificidade significa que deve ser específico para a questão estudada (ex.: planta, patógeno etc); distinguibilidade significa que o diagnóstico ou a identificação é distinta e não assume múltiplas formas (não há falsos positivos ou negativos), é única; e sensibilidade significa que o diagnóstico ou a identificação é capaz de ser realizado com quantidade muito reduzidas de matéria-prima (ex. sangue, tecido vegetal, animal, DNA, RNA, proteína etc). Esses quesitos estão diretamente relacionados com o "objeto" que conduz à identificação, que é chamado de biomarcador.

Biomarcador é a molécula que identifica, reconhece, diagnostica um determinado sistema como uma cultivar, um patógeno, uma enfermidade etc. Essa molécula deve ser selecionada e relacionada com o ser que se quer identificar, o agente causal da enfermidade ou um sistema biológico específico. Pode ser de origem proteica ou outra como o ácido desoxiribonucleico (DNA), ácido ribonucléico (RNA), compostos fenólicos etc.

Outra relação entre biotecnologia e diagnósticos moleculares diz respeito às ferramentas moleculares da biotecnologia moderna que são utilizadas para selecionar e relacionar uma molécula como biomarcadora de um determinado ser vivo, processo ou sistema. Essas ferramentas moleculares assim utilizadas podem ter origem na genômica, na transcriptômica, na proteômica ou no metaboloma.

Genômica é a parte da biotecnologia que estuda os genomas em sentido macro, sua estrutura básica. São, por exemplo, os grandes trabalhos de sequenciamento de genomas que têm, por principal objetivo, revelar o tamanho preciso dos diversos genomas animais ou vegetais; inferir no número provável de genes que se encontra nesse genoma; bem como conhecer a sequência desses diversos genes. As

principais ferramentas utilizadas pela genômica são o sequenciamento automatizado de DNA e as ferramentas de bioinformática de anotação e análise das sequências gênicas. Porém, o sequenciamento completo dos genomas não informa sobre a funcionalidade de muitas das sequências gênicas conhecidas nos estudos da genômica e esta somente pode ser revelada por meio das ferramentas da transcriptômica e da proteômica.

A transcriptômica representa todos os estudos que visam à identificação e análise de genes expressos especificamente em um determinado sistema como, por exemplo, os genes expressos em tecidos vegetais infectados por diversos patógenos, em tecidos de plantas tolerantes a condições desfavoráveis como a seca ou a presença de metais pesados no solo e outras. Diversas metodologias moleculares são utilizadas nos estudos da transcriptômica como a síntese de biblotecas de cDNA (DNA complementar), o PCR (Polymerase Chain Reaction), o RT-PCR (Reverse transcrition PCR), o PCR quantitativo (RTqPCR) etc. Esses estudos inferem, em última análise, situações fisiológicas específicas e contribuem para respostas e identificação dos principais genes (biomarcadores potenciais), que são ativados em diversas dessas situações fisiológicas diferentes.

A proteômica representa os estudos de todas as proteínas que são expressas em células específicas (tecidos específicos, situações fisiológicas específicas). As principais ferramentas metodológicas utilizadas, hoje, nesses estudos são a eletroforese em duas dimensões, o sequenciamento de proteínas, a espectroscopia de massa e as análises de bioinformática.

E, por fim, a metabolômica é o conjunto de ferramentas utilizadas para estudar moléculas relacionadas à identifcação de compostos não proteicos ou DNA/RNA como os alcaloides, flavonoides etc. e sua relação com seus ciclos de síntese. Algumas dessas metodologias são a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), a cromatografia em camada fina (TLC) e a ressonância nuclear magnética (NMR).

Outros estudos no campo da genômica são aqueles relacionados com a genética. Nesse tipo de abordagem, utilizam-se como ferramentas experimentais as tecnologias dos marcadores moleculares

que auxiliam no mapeamento de genomas. Esses estudos são melhor estudados em outros capítulos desse livro.

Metodologias e seleção de biomarcadores para o diagnóstico molecular

Uma vez introduzido o assunto, agora podemos discorrer mais sobre como que algumas metodologias utilizadas pela biotecnologia auxiliam a seleção e distinção de moléculas biomarcadoras capazes de serem o "objeto" de diagnósticos moleculares.

Construção de biblioteca de cDNA

Uma biblioteca de cDNA é um conjunto de cDNAs (DNA complementar) obtido de todos os RNAs mensageiros (RNAs-m) presentes e que se expressam em um determinado sistema biológico em um tempo específico. Os fundamentos teóricos para a sua construção estão relacionados com a associação de diversas ideias e ferramentas da engenharia genética, tais como, a construção de bibliotecas de DNA; polimerização de cadeia de DNA em sentido reverso pela enzima transcriptase reversa; clonagem molecular; transformação bacteriana e outros.

A construção de bibliotecas de cDNA objetiva facilitar a seleção de um gene específico que se expresse em uma situação fisiológica específica. Para que uma biblioteca de cDNA seja construída, é necessário obter como primeira etapa os RNAs-m presentes no sistema desejado (ex:. tecido de planta infectada com um patógeno, tecido de cultivar tolerante à seca, entre outros). A partir dos RNA-m, sintetiza-se o cDNA correspondente para cada RNA-m por meio da utilização de um *primer* oligodT e a enzima transcriptase reversa. Esse passo é possível para todos os sistemas eucarióticos, pois seus RNA-m tem uma extensão de poli-A na extremidade 3' terminal. Essa enzima (transcriptase reversa), além de poder sintetizar uma cadeia de DNA em sentido reverso (3' para 5') a partir do RNA-m também, ao final da extensão, constitui uma formação em gancho (Figura 1) que permite que, em uma segunda etapa, o DNA polimerase I possa sintetizar a segunda cadeia constituindo o cDNA de dupla cadeia. Ao final

da polimerização das duas cadeias, esse gancho é destruído e o pool de cDNAs gerado é ligado a um vetor de clonagem (plasmídeo, cosmídeo ou DNA de fago) e os cDNAs clonados são transformados em células bacterianas ou incorporados a partículas virais que vão infectar células bacterianas. A presença desses clones em células bacterianas é importante para a manutenção da biblioteca por um período de tempo longo, além de permitir sua amplificação para análises posteriores.

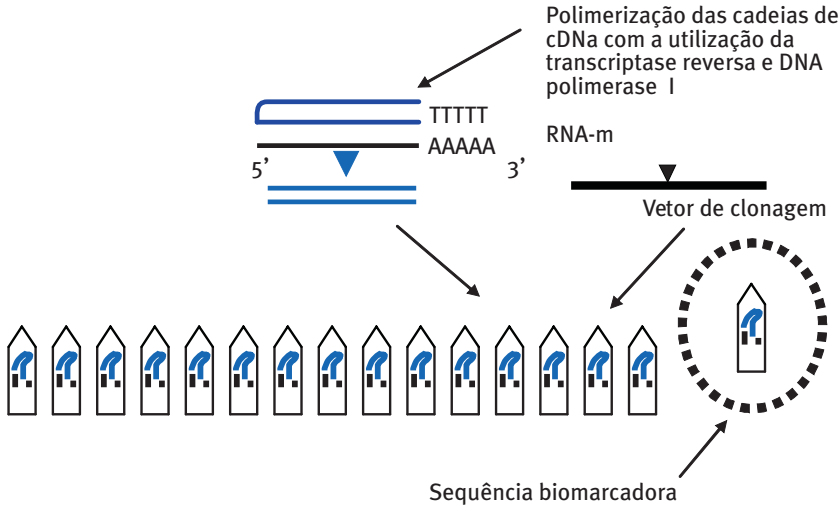


Figura 1. Esquema geral da construção de uma biblioteca de cDNA.

As diversas bibliotecas de cDNA possíveis assumem importância para o diagnóstico molecular no sentido em que elas permitem a seleção de uma sequência gênica específica que está relacionada como uma molécula biomarcadora de um sistema fisiológico.

Uma variação dessa metodologia é a construção de bibliotecas subtraídas de cDNA. Essas bibliotecas subtraídas são o produto da subtração de dois diferentes pools de cDNAs, por exemplo, biblioteca de cDNA dos genes expressos em um planta tolerante a estresse hídrico de onde foram subtraídos a maior parte dos genes constitutivos, ou seja, que existiam na planta independentemente a expressão de genes diretamente relacionados com o processo de tolerância antes da etapa de clonagem molecular. Bibliotecas de cDNA subtraídas minimizam

muito o trabalho para a seleção de um biomarcador para a situação estudada.

Outra variação, que na verdade é anterior e, a partir dela, foi idealizada a biblioteca de cDNA, é a construção de bibliotecas genômicas, que é nada mais do que o conjunto completo de fragmentos gênicos que, juntos, representam todo um genoma. Porém, nesse caso, é utilizado o DNA genômico. São utilizadas para selecionar sequências gênicas completas (regiões não transcritas para o RNA-m como regiões de introns, sequências gênicas regulatórias, sequências gênicas promotoras etc).

Microarranjos de DNA

Microarranjos de DNA é a metodologia mais avançada para a seleção de uma ou mais sequências biomarcadoras ao mesmo tempo para diversas situações. Ela é realizada por meio da construção prévia de uma biblioteca de DNA genômico (biblioteca genômica). A partir do pool de fragmentos genômicos, adiciona-se cada um desses clones em uma microplaca de forma automatizada. Cada microplaca, portanto, tem a representação de uma grande parte dos clones da biblioteca de DNA para um determinado genoma. Logo, cada *spot* na microplaca representa um clone de DNA que já é conhecido por uma sequência gênica específica, sequenciada previamente. Para a seleção das moléculas biomarcadoras (p.ex., os genes expressos em um dado sistema), faz-se a hibridização com diferentes pools de cDNA, cada um marcado com um fluoróforo diferente (Figura 2). A leitura das diferentes emissões de fluorescência na microplaca é analisada em um *software* específico e cálculos estatísticos de forma a dizer qual dos genes é ativado somente em um determinado sistema. Essa expressão diferencial, no entanto, deve ser confirmada por meio de experimentos de RTqPCR. Os fundamentos teóricos ou ideias fundamentais que estão por trás dos microarranjos de DNA são, por exemplo, as bibliotecas de DNA, a hibridização em *Southern* blot etc. É conveniente ressaltar que a base da análise em microarronjos de DNA é o *Southern* blot que rendeu o prêmio Lasker de 2005 a seu inventor.

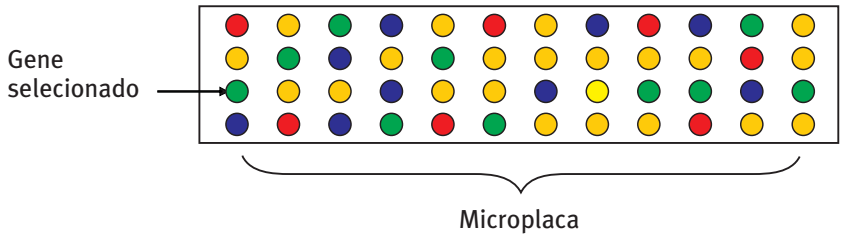


Figura 2. Esquema geral de um análise em microarrnjos de DNA (*microarray*).

Eletroforese em 2D

A eletroforese em 2D foi descrita pela primeira vez por O'Farrel em 1975. Ela consiste na separação de proteínas em duas dimensões em um gel de eletroforese de poliacrilamida. O fundamento teórico dessa metodologia consiste na química de proteínas que, por meio desses estudos, sabe-se quais proteínas têm cargas elétricas positivas e negativas em meio aquoso, por causa dos grupos amino e carboxila dos aminoácidos. Porque possuem cargas elétricas, podem migrar em um campo elétrico (princípio da eletroforese), seja para o pólo positivo (se a predominância de carga for negativa) ou negativo (se a predominância de carga for positiva). No entanto, se a proteína tem uma proporção de cargas positivas e negativas iguais, esta não migra no campo elétrico, então esse ponto é chamado de ponto isoelétrico. É por esse motivo que se consegue a separação de uma amostra heterogênea de proteínas na primeira dimensão da eletroforese em 2D. O outro princípio é que moléculas proteicas grandes migram em um campo elétrico com uma velocidade menor do que moléculas pequenas, podendo serem separadas por seu peso molecular. E essa é a separação obtida na segunda dimensão da eletroforese em 2D. A vantagem para um diagnóstico molecular é que essa metodologia, associada ao sequenciamento de proteínas, tem o potencial de identificar todas as proteínas componentes de um determinado tecido, como também as proteínas diferenciais expressas entre dois diferentes tecidos (biomarcadores protéicos em potencial). Atualmente, essa identificação é realizada por meio de softwares especializados que escaneiam os géis em análise e subtraem *in silico* as marcas de proteínas de um em relação ao outro (Figura 3).

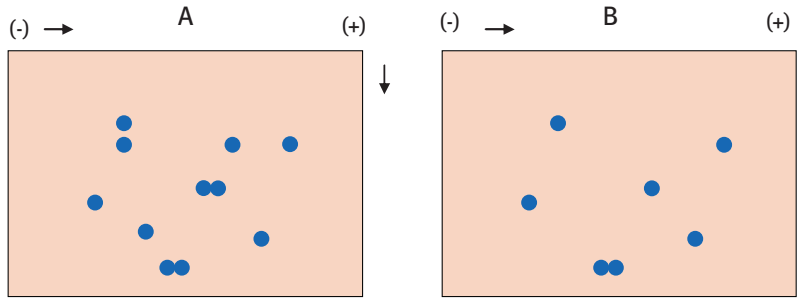


Figura 3. Esquema geral de uma análise de eletroforese em 2D demonstrando a expressão de proteínas diferentes nos tecidos A e B.

Recapitulando, as duas dimensões em que são separadas as proteínas em gel de eletroforese consistem na separação por pontos isoelétricos (pH em que a proteína tem carga nula e, portanto, estaciona no gel) em uma primeira etapa, e, em seguida, a separação em gel por peso molecular. Essa técnica parte da premissa de que as diversas proteínas que existem não têm, ao mesmo tempo, o mesmo ponto isoelétrico e o mesmo peso molecular.

Sequenciamento de DNA

A metodologia do sequenciamento de DNA foi descrita por Frederick Sanger na década de 1970. O procedimento original é realizado por meio da amplificação em PCR da sequência alvo com oligonucleotídeos (*primers*) específicos localizados no vetor (DNA plasmidial) onde está clonado a sequência de interesse alvo (gene) e a utilização de dideoxnucleotídeos (ddNTPs). ddNTPs são nucleotídeos que contêm duas oxidrilas ao invés de apenas uma, normalmente encontrada nos dNTPs. Esses dideoxinucleotídeos são adicionados um a um no processo de amplificação em PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Na verdade, fazem-se 4 reações diferentes em que 3 dos dNTPs são normais e apenas 1 é ddNTP. A reação de polimerização das novas cadeias de DNA onde está o ddNTP é parada com a adição do mesmo gerando como produto da PCR uma gama de fragmentos de DNA de tamanhos diferentes de acordo com a adição do ddNTP. Assim, cada uma das reações possuem fragmentos cujas pontas contêm ddATP, outra ddTTP, outra ddCTP e outra ddGTP. Além da adi-

ção diferencial dos ddNTPs nas reações do PCR, é adicionado a cada reação um dos dNTPs (geralmente dATP ou dCTP) marcados com radioatividade. Portanto, os fragmentos gerados em cada reação terão um diferencial na ponta (por causa do ddNTP) e são radioativos.

Essas quatro reações são adicionadas em um gel de poliacrilamida com uréia que permite a resolução dos diferentes fragmentos de DNA sintetizados em cada reação. Após a corrida eletroforética, o gel é seco e exposto a um filme radiográfico. Esse procedimento é chamado de autorradiografia, que representa uma imagem negativa dos fragmentos resolvidos no gel que imprimem sua imagem no filme radiográfico por estarem radioativos. A leitura dessa autorradiografia faz-se de baixo para cima, pois os fragmentos mais baixos são menores do que os fragmentos que estão acima. Como se aplica as quatro reações no mesmo gel, a leitura é feita da banda mais baixa, seja na linha do ddATP, ou ddCTP, ou ddTTP, ou ddGTP, e vai-se alternando conforme as diferentes posições (Figura 4).

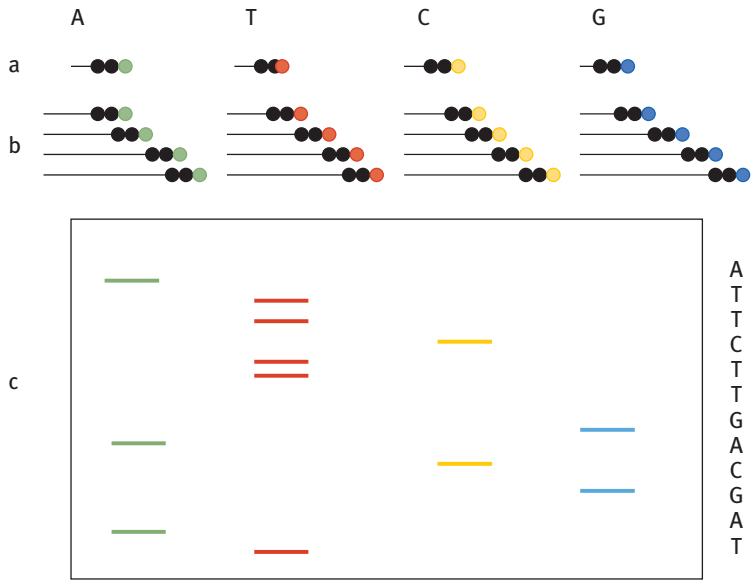


Figura 4. Esquema do procedimento de sequenciamento automático. (a) dideoxinucleotídeos marcados com fluorescência diferencial; (b) reação de polimerização de fragmentos; e (c) separação eletroforética dos fragmentos gerados na reação do PCR.

A sequência lida estará no sentido direto ou reverso conforme a orientação do *primer* utilizado no plasmídeo para a reação de síntese dos fragmentos homólogos gerados do gene alvo. Com a sequência lida, pode-se buscar uma sequência homóloga a ela em banco de dados gênicos ou proteicos utilizando ferramentas de bioinformática como o Blast em suas múltiplas formas como nBlast, tBlast, Blastx etc. Ou várias sequências podem ser analisadas em comparação utilizando o programa Clustal W ou ainda montadas de forma que se encontre a continuidade das sequências gerando uma sequência maior.

Em resumo, como fundamentos teóricos da metodologia do sequenciamento, podemos apresentá-los assim: (1) para a cadeia do DNA crescer em uma reação de polimerização em PCR, é necessária a adição de um nucleotídeo do tipo dNTP, caso contrário ela é parada (adição de ddNTP); (2) se um dos dNTPs na reação de polimerização for marcado de alguma maneira (com radioatividade ou fluorescência), toda a cadeia será marcada da mesma forma; (3) fragmentos de DNA de tamanhos diferentes migram em um gel submetido a um campo elétrico em geral para o pólo positivo e os menores com mais velocidade do que os maiores (princípio da eletroforese); (4) partículas radioativas, porque emitem radioatividade na forma de elétrons livres da camada mais externa dos átomos, podem imprimir filmes radiográficos permitindo uma autorradiografia.

A metodologia do sequeciamento atual mais utilizada é a do sequenciamento automático. Ela está baseada na metodologia original de Sanger, contudo é realizada em um mesmo tubo onde são adicionados os quatro ddNTPs marcados com quatro diferentes fluoróforos que emitem intensidade luminosa diferente quando submetidos à luz. Os picos de diferentes fluorescências são relacionados à presença de um diferente ddNTP. Essa metodologia é mais vantajosa porque tem o poder maior de leitura em relação ao tamanho da sequência, que pode ser lida em uma única reação, e também por não utilizar radioatividade.

O sequenciamento de DNA auxilia um diagnóstico molecular, uma vez que permite o conhecimento de sequências gênicas espécie-específicas que podem ser comparadas por programas de bioinformática e, a partir dessa comparação, *primers* específicos podem ser sintetizados de forma a permitirem a amplificação específica de fragmentos espécie-específicos que funcionem para identificar especificamente

patógenos, plantas, animais, plantas transgênicas (geram biomarcadores) (Figuras 5 e 6). Esses diagnósticos têm sido alvo de muitos trabalhos (FERRI, 2009).

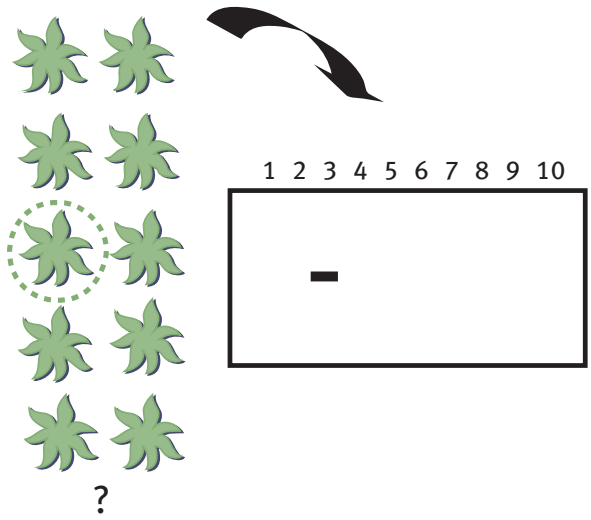


Figura 5. Esquema geral do diagnóstico molecular de uma planta.

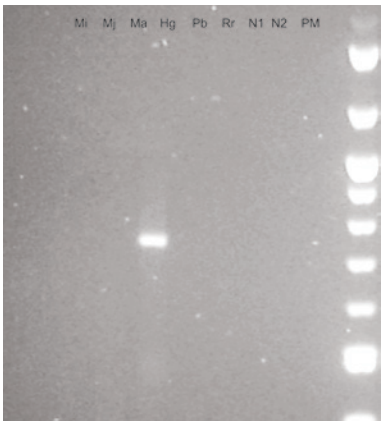


Figura 6. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio que demonstra o diagnóstico molecular específico para o nematoide *Heterodera glycines*. Mi-*Meloidogynes incognita*; Mj-*M. javanica*; Ma-*M. arenaria*; Hg-*Heterodera glycines*; Pb-*Pratylenchus brachyurus* e Rr-*Rotylenchulus reniformis*.

Tecnologias principais utilizadas em diagnóstico molecular

PCR e variações

A reação do Polymerase Chain Reaction (PCR) é uma metodologia que mimetiza a duplicação do DNA em um tubo de ensaio e esse é o seu fundamento teórico. Ela foi descrita pela primeira vez por Mullins em 1983 (SAIKI et al., 1988), provavelmente após a identificação de uma enzima DNA polimerase (enzima que polimeriza cadeias novas de DNA) chamada Taq polimerase, que tem esse nome por ter sido purificada pela primeira vez de uma bactéria chamada *Thermophilus aquaticus*. A Taq polimerase é capaz de resistir a ciclos de alta temperatura periódicos, por ser termoresistente. E essa alta temperatura (92 °C a 94 °C) é necessária na reação de PCR na etapa de desnaturação do DNA.

O PCR é constituído de três etapas fundamentais (Figura 7): desnaturação do DNA; o anelamento de oligonucleotídeos (*primers*); e a polimerização de novas cadeias. A etapa de desnaturação é necessária para que a dupla cadeia do DNA seja aberta, permitindo assim o anelamento dos *primers;* a etapa de polimerização é aquela que polimeriza novas cadeias de DNA a partir de uma cadeia que serve como molde (a duplicação do DNA é semiconservativa). Esse ciclo se repete sucessivas vezes de forma a aumentar a quantidade do fragmento amplificado de maneira que obedeça uma progressão geométrica. Assim, a partir de quantidades ínfimas de DNA, podem-se detectar fragmentos específicos e analisá-los. A grande vantagem do PCR é que é uma metodologia muito sensível, rápida e de relativo pouco custo, dessa forma um diagnóstico molecular que utiliza essa reação tem um grande impacto.

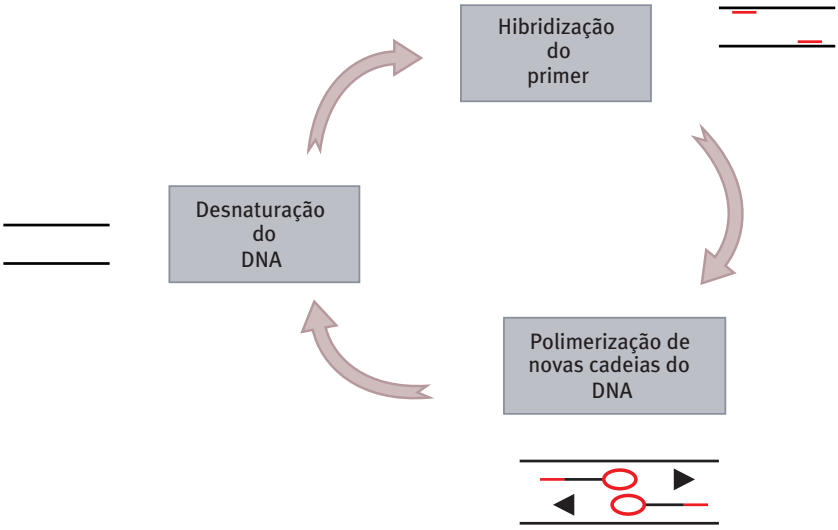


Figura 7. Esquema geral da reação de PCR.

Com o passar do tempo, foram aparecendo variações permitindo assim diversas aplicações, como as análises genéticas com marcadores moleculares do tipo Rapid Amplified Polymorphic DNA (RAPD); Inter Sequence Simple Repeats (ISSR); Sequence Simple Repeats (SSR); Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). Todas essas metodologias genéticas são muito úteis como ferramentas que auxiliam programas de melhoramento genético. Um dos atributos do uso de marcadores moleculares visando um diagnóstico molecular é seu implemento para a geração de *fingerprintings* (impressãos digitais) que servem para identificar cultivares, animais etc, além de permitir análise de divergência genética entre elas (Figura 8). Outra aplicação do RAPD que gera diferentes *fingerprintings* de cultivares é o estudo de variações somaclonais gerado na cultura de tecidos vegetais in vitro.

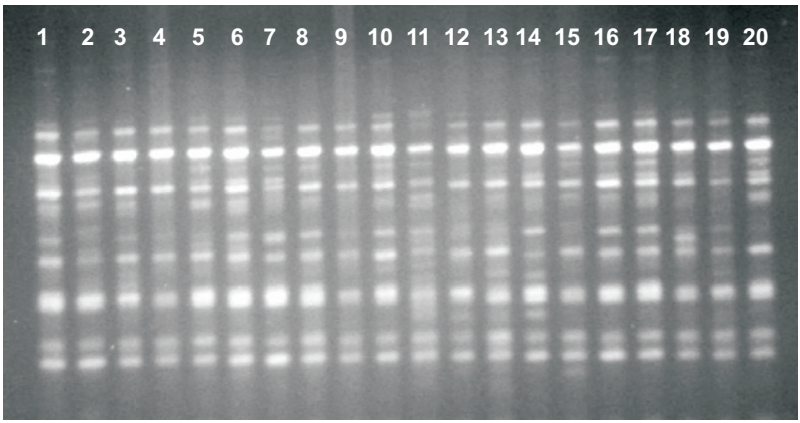


Figura 8. gel de agarose a 1,2% corados com brometo de etídio demosntrando o *fingerprinting* obtido por meio da metodologia do RAPD de diferentes plantas de mangueira.

Outras variações do PCR são o RT-PCR (Reverse transcription *PCR*), o RTqPCR (Real time quantitative *PCR*). O primeiro ocorre basicamente da mesma maneira que o PCR convencional, porém, após uma reação inicial de síntese da primeira fita de cDNA (DNA complementar), pois o RT-PCR amplifica transcritos gênicos (a partir do RNA mensageiro). Essa metodologia é importante quando se tem o objetivo de estudar a expressão de um determinado gene em um sistema biológico específico. A vantagem do RT-PCR para o diagnóstico molecular é que, além de selecionar um biomarcador com ela, também se pode inferir sobre a expressão de um dado transcrito gênico relacionando-o ao sistema como um biomarcador.

O RTqPCR é um processo semelhante, que pode ser realizado com DNA ou RNA inicial, porém a sua vantagem é que ele permite a quantificação do gene ou transcrito específico gerado em tempo real de forma bastante sensível e precisa, porque utiliza um corante que intercala nas cadeias dos fragmentos gerados no PCR (geralmente o Syber green) e que pode ser detectado por sensores do equipamento utilizado no PCR, permitindo a quantificação do aumento da concentração do fragmento gerado em tempo real. Essa metodologia pode relacionar genes como muito ou pouco expressos em um sistema ou quantidade do DNA presente na amostra analisada. É uma metodologia

muito sensível e os trabalhos com ela hoje têm um grande impacto. É a metodologia por excelência para validar os estudos realizados em bibliotecas de cDNA ou microarranjos de DNA.

Southern e Northern blot

A metodologia do Southern blot foi inventada pelo biólogo britânico Edwin Southern. Ela consiste na identificação da presença de um gene em um dado genoma. Também pode ser utilizada para estimar o número de cópias gênicas, para um gene específico, nesse genoma. O embasamento teórico dessa metodologia reside na associação de várias metodologias e descobertas como: o tipo de corte de restrição gerado em DNA genômico por diversas enzimas; a eletroforese; a transferência de fragmentos, utilizando-se o processo da capilaridade ou campo elétrico; a desnaturação da dupla cadeia de DNA com álcalis fortes; a complementariedade de sequências e preferência para hibridização específica; a marcação de nucleotídeos com átomos radioativos; a impressão de elétrons em filmes radiográficos (autorradiografia). O protocolo para a sua realização depende em primeiro lugar que se obtenha o DNA de interesse extraído e digerido com quatro diferentes tipos de enzimas de restrição.

Em geral, utilizam-se enzimas que cortam pouco e muito o DNA. Em seguida, os fragmentos gerados na digestão enzimática são separados em gel de eletroforese de agarose a 0,8%. Ao término da corrida, o gel é utilizado para fazer a transferência desses fragmentos separados para um filtro de nylon (Figura 9). Essa transferência pode ocorrer por algumas horas utilizando-se corrente elétrica ou pela noite por capilaridade. No outro dia, os fragmentos transferidos para o filtro de nylon são desnaturados com soluções alcalinas desnaturantes e fixados nele. Esse último fenômeno é chamado de *crosslinking* e pode ocorrer pela ação do ultravioleta por alguns segundos ou a 2 horas em forno +80 °C. O filtro com os fragmentos de DNA transferidos e fixados é então submetido a uma pré-hibridização e, em seguida, a uma hibridização em tampões específicos, em temperaturas específicas.

A temperatura pode variar conforme a homologia do gene em estudo, se bastante homólogo, geralmente 52 °C a 65 °C, se não, 37 °C a 45 °C. Se a temperatura é alta, dizemos que a hibridização é de alta

estringência; e, se a temperatura é baixa, dizemos que a estringência é baixa. A hibridização é realizada em sacos de plástico selados onde é adicionado um fragmento gene específico marcado com radioatividade (sonda) em banhos térmicos por um pernoite. Também pode ser utilizado hibridizadores comerciais. Atualmente também é realizado com sondas marcadas com fluorescência. No dia seguinte, o filtro hibridizado é lavado de forma a remover a radioatividade de excesso em tampões específicos, utilizando temperatura de acordo com a estringência apropriada. O filtro então é seco e exposto em cassetes a filmes radiográficos a –80 °C (autorradiografia).

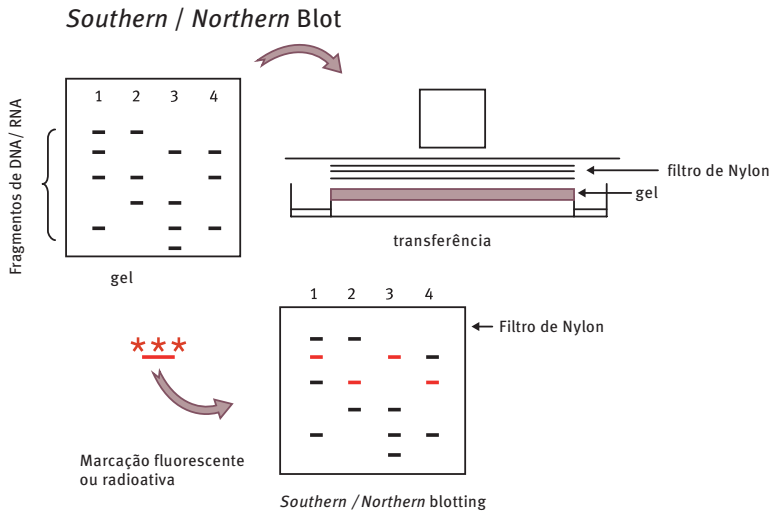


Figura 9. Esquema geral de um Southern / Northern blot.

De acordo com o sinal radioativo remanescente no filtro, o filme é revelado em um dia, dois, uma semana ou um mês, obtendo-se então o resultado. Se a marcação foi fluorescente, o resultado é obtido por meio do escaneamento do filtro em equipamentos leitores específicos que emitem feixe de luz capazes de fazer fluorescer a(s) banda(s) hibridizada(s) para sua identificação. O Southern blot para estimar o número de cópias gênicas vem, atualmente, sendo substituído pelo RTqPCR. Contudo, pode ser ainda utilizada como diagnóstico de plantas transgênicas.

A metodologia do Northern blot foi batizada por Southern, pois consiste em uma análise similar ao Southern blot, porém realizada com RNA. As diferenças representam o gel de eletroforese que, nesse caso, é de glioxal ou formaldeído, e a etapa de desnaturação é omitida pelo fato dos RNA-m serem cadeia simples. Essa metodologia também tende a ser substituída pelos microarranjos de DNA em que se utiliza como sondas pools de cDNA diferentes marcados com diferentes fluoróforos e pela RTqPCR, já que essas técnicas também são capazes de detectar a expressão de um dado gene em um dado sistema, porém de maneira muito mais sensível. A detecção da expressão de um dado gene em um dado sistema é o principal resultado que a metodologia do Northern blot pode trazer para um diagnóstico molecular.

Western blot

A metodologia do Western blot foi batizada por Southern, assim como o Southern e o Northern blot, é realizada para identificar especificamente genes. Nesse caso, o reconhecimento específico é de proteínas e, por isso, pode identificar apenas uma proteína que está presente em uma amostra heterogênea. Dessa maneira, a identificação específica proteica não é realizada no Western blot por meio de sondas e, sim, pelo reconhecimento específico com anticorpos monoclonais ou policlonais.

O fundamento teórico dessa metodologia está na imunologia e o reconhecimento específico antígeno-anticorpo. Em seu processo, também é realizada uma separação eletroforética de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS similar à segunda dimensão da eletroforese em 2D (separação por peso molecular). Em seguida, realiza-se a transferência das proteínas separadas no gel para um filtro de nylon por meio de corrente elétrica. Nessa técnica, não é necessário fixar as proteínas no filtro porque o processo é mais rápido, o que evita perdas por difusão das proteínas transferidas para o filtro. Em seguida, é realizada uma pré-lavagem do filtro em tampões específicos e, após, é adicionado o anticorpo primário específico para a proteína-alvo. A ligação antígeno (região antigênica na proteína alvo reconhecida pelo anticorpo) – anticorpo é realizada por algumas horas e, depois, realiza-se a ligação de um segundo anticorpo específico a outra a região

dos anticorpos IgG (anticorpo secundário) (uma região diferente da região de reconhecimento específico que é igual em todos os anticorpos) específico para a proteína alvo. Esse segundo anticorpo é marcado com algum tipo de (Figura 10) molécula indicadora (ex.: peroxidase, biotina, substância luminescente etc).

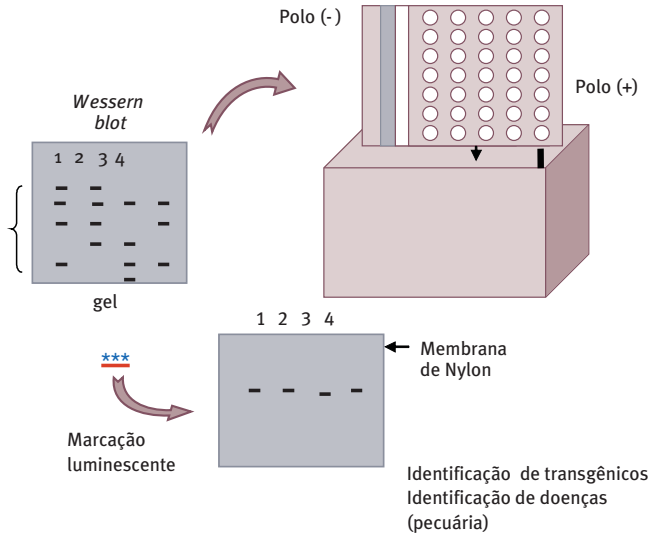


Figura 10. Esquema geral de um Western blot.

A revelação do complexo antígeno-anticorpo é realizada com um revelador específico à marcação no segundo anticorpo que produz reação no complexo antígeno-anticorpo (ex.: biotina/avidina). Essa revelação geralmente é uma reação enzimática, por conseguinte ocorre em um tampão específico e produz uma cor ou luz. A proteína específica alvo da amostra analisada no gel é assim revelada como presente ou ausente diretamente no filtro ou em um filme radiográfico.

O Western blot é utilizado como ferramenta do diagnóstico molecular todas as vezes que permite o reconhecimento específico de uma dada proteína. Essa proteína, por exemplo, pode ser expressa em uma planta transgênica e assim confirma a expressão de um dado gene utilizado para transformá-la. Também pode ser uma proteína relacionada com alguma enfermidade seja vegetal, animal ou humana expressa no tecido, sangue, entre outros.

Elisa

A metodologia do Enzyme linked Immuno Sorbent Assay (Elisa), assim como o Western blot e a eletroforese em 2D constitui mais uma técnica utilizada para gerar um diagnóstico molecular tendo como base biomoléculas de proteínas. O fundamento teórico dessa metodologia é o mesmo do Western blot. Nela também se identifica uma proteína específica com anticorpos específicos desenvolvidos a ela e a revelação também é realizada de forma indireta com indicadores luminescente, radioativos ou fluorescentes. Porém, utilizam-se placas apropriadas para fixar a proteína de escolha (proteína alvo) que (Figura 11) contém vários pocinhos. Em cada pocinho, é adicionado um material que se quer investigar se há anticorpos específicos para a proteína alvo (ex.: soro humano). Após essa primeira etapa, é adicionado o segundo anticorpo marcado com um indicador. E, finalmente, a revelação é realizada por meio de reações enzimáticas típicas para cada indicador. Se o indicador for fluorescente, a placa é lida em equipamentos adequados que indicará em qual pocinho é encontrado a marcação positiva. Essa é a metodologia mais utilizada no teste de Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida (AIDS).

A metodologia do Elisa também pode ser realizada utilizando-se reconhecimento gênico específico.

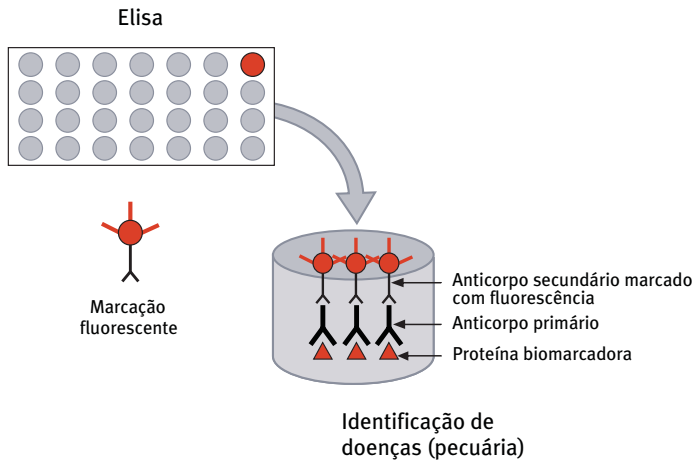


Figura 11. Esquema geral de um Elisa.

Considerações finais

Como uma recaptulação geral, podemos dizer que as metodologias de preparação de bibliotecas genômicas, de cDNA (subtrativas ou não), os micorarranjos de DNA e a eletroforese em duas dimensões fornecem informações valiosas sobre biomarcadores em potencial para diversos sistemas biológicos sejam de origem DNA ou proteína. O sequenciamento de DNA ou proteína complementa a primeira informação e permite o desenho de primers específicos ao biomarcador. E, finalmente, o PCR em suas várias modalidades bem como as metodologias do Southern blot, Northern blot, Western blot e Elisa oferecem a possibilidade de um diagnóstico molecular específico, seja para sequências gênicas ou proteicas.

Todas essas metodologias são muito sensíveis. Praticamente a eleição de uma ou outra depende do custo, da expertise e da velocidade para a obtenção de resultados.

O ideal para o diagnóstico molecular é ter 100% de sensibilidade (detecção do biomarcador em quantidades ínfimas de matéria prima), 100% de reprodutibilidade, 100% de especificidade (que evita falsos positivos e negativos), 100% de distinguibilidade em um custo baixo, um tempo rápido e necessitando de pouca expertise para o operador. Porém, essa situação é utópica. Portanto, deve ser avaliado o que seja melhor caso a caso. Alguns problemas como reprodutibilidade podem ser resolvidos com análises em duplicata, triplicata e análises estatísticas, e a especificidade, que pode gerar falsos positivos ou negativos, pode ser resolvida com o uso de controles positivos e negativos no diagnóstico. Com relação ao custo, em geral, avalia-se e relaciona-se ao custo/benefício do diagnóstico, e o tempo e a expertise são aspectos em que há sempre novos estudos na tentativa de superá-los o máximo possível de modo a ter um diagnóstico mais barato e de fácil manipulação.

Na Tabela 1, apresentam-se as vantagens e desvantagens de algumas metodologias utilizadas no diagnóstico molecular para servir de tomada de decisão para cada caso.

Tabela 1. Resumo das principais características, vantagens e desvantagens das metodologias utilizadas no diagnóstico molecular.

Metodologia	Sensibilidade	Distinguibilidade	Reprodutibilidade	Especificidade	Custo	Tempo para obtenção de resultados	Expertise
PCR RT-PCR	++++	++++	++++	++++	+	+	+
RAPD	++++	+++	+++	++	+	+	+
ISSR	++++	+++	+++	+++	++	+	+
SSR	++++	++++	++++	++++	++++	+	++
Southern blot Northern blot	++++	++++	++++	++++	+++	++	++
Elisa	++++	++++	++++	++++	+++	++	++
Wessern blot	++++	++++	++++	++++	+++	++	++
Microarranjos de DNA	+++++++	++++	++++	+++++	+++++	++	++++
RTqPCR	+++++++	++++	++++	++++	+++++	+	+++

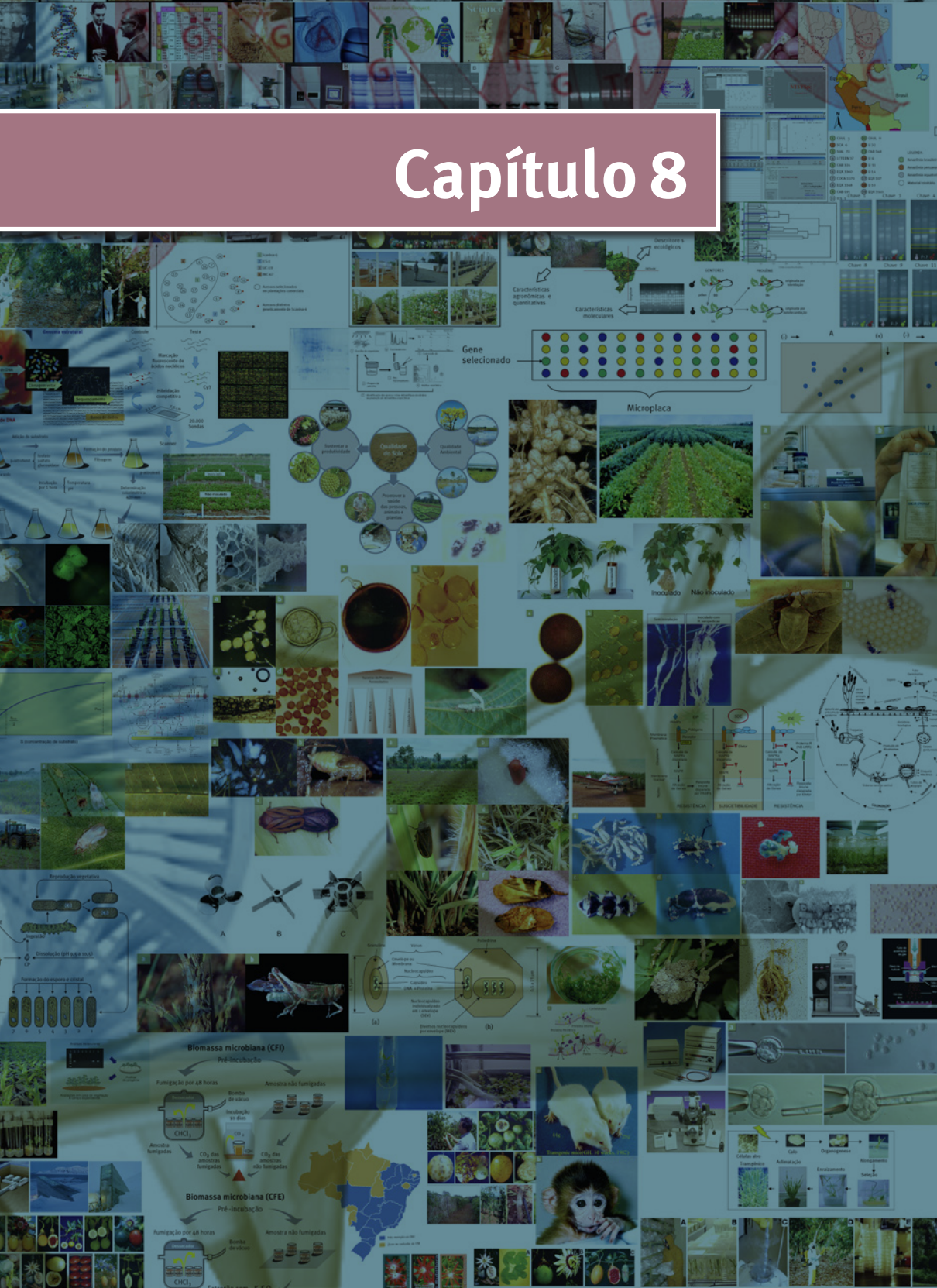
Referências

FERRI, E.; BARBUTO, M.; BAIN, O.; GALIMBERTI, A.; SHIGEHIKO, U.; GUERRERO, R. A.; FERTE, H.; BANDI, C.; MATIN, C.; CASIRAGHI, M. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). **Frontiers in Zoology,** v. 6, p. 1-26, 2009.

O'FARREL, P.H. High Resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

Capítulo 8


Gene selecionado
Microplaca
Inoculado
Não inoculado
Biomassa microbiana (CFI)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas
Biomassa microbiana (CFE)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas

Microbiologia do solo e sustentabilidade de sistemas agrícolas

Ieda de Carvalho Mendes; Fábio Bueno dos Reis-Junior; Mariangela Hungria; Marcelo Ferreira Fernandes; Guilherme Montandon Chaer; Fábio Martins Mercante; Jerri Édson Zilli

Introdução

Embora a afirmação de que os microrganismos controlam o mundo pareça um pouco exagerada, não é. Todos os processos responsáveis pela vida no planeta terra dependem da atividade microbiana. Trata-se, de fato, de um universo paralelo. Por exemplo, um único grama de solo possui mais de 10 mil espécies diferentes de microorganismos, cerca de 1 bilhão de bactérias, 1 milhão de actinomicetos e 100 mil fungos. Esses números também dão uma ideia da imensa diversidade metabólica dessas comunidades microbianas e da diversidade de processos em que elas atuam.

O maior desafio para a agricultura do século XXI está na resolução de uma equação que envolve o aumento da produção de alimentos baratos e saudáveis a um baixo custo ambiental. A solução dessa equação, por sua vez, não pode negligenciar o componente biológico do solo, pois ele apresenta uma estreita inter-relação com os componentes físicos e químicos, os quais irão em conjunto influenciar não só a produtividade das culturas, mas também a sustentabilidade dos sistemas agrícolas (Figura 1).

Neste capítulo, serão abordados aspectos relacionados ao uso de bioindicadores nas avaliações de qualidade do solo, os indicadores biológicos mais apropriados para esse fim, o estado da arte da pesquisa com bioindicadores e os índices de qualidade de solo no Brasil e no mundo e as suas perspectivas de uso pelos agricultores.

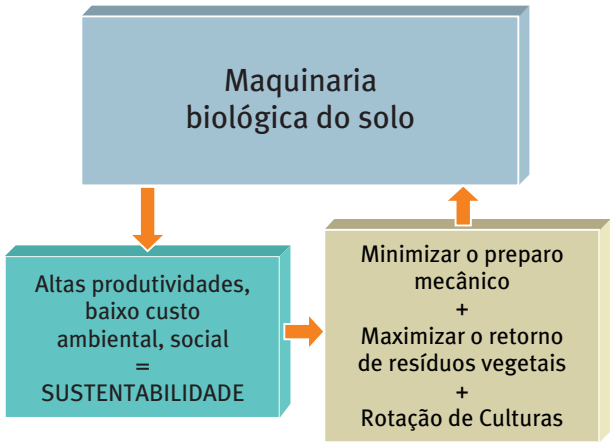


Figura 1. O aumento da produção de alimentos baratos e saudáveis a um baixo custo ambiental não pode negligenciar o componente biológico do solo.

Qualidade do solo e bioindicadores

Pesquisadores e a sociedade, de uma maneira geral, estão bastante familiarizados com os conceitos de qualidade da água e do ar, e de como o uso inadequado desses recursos pode afetar a saúde humana e o meio ambiente. Entretanto, a despeito da importância do solo para a humanidade, como base para todo o sistema de produção alimentar, de fibras e de agroenergia, o interesse pelo tema "Qualidade de solo" é relativamente recente, datando do fim da década de 1980 e início da década de 1990. De acordo com Doran e Parkin (1994), qualidade do solo seria a sua capacidade de funcionar dentro dos limites dos ecossistemas para: (a) sustentar a produtividade biológica; (b) manter a qualidade da água e do ar e (c) promover a saúde humana, de plantas e animais (Figura 2). Ou seja, além da importância do solo para a produção de alimentos, o conceito de qualidade do solo também destaca a importância desse recurso para o funcionamento global dos ecossistemas.

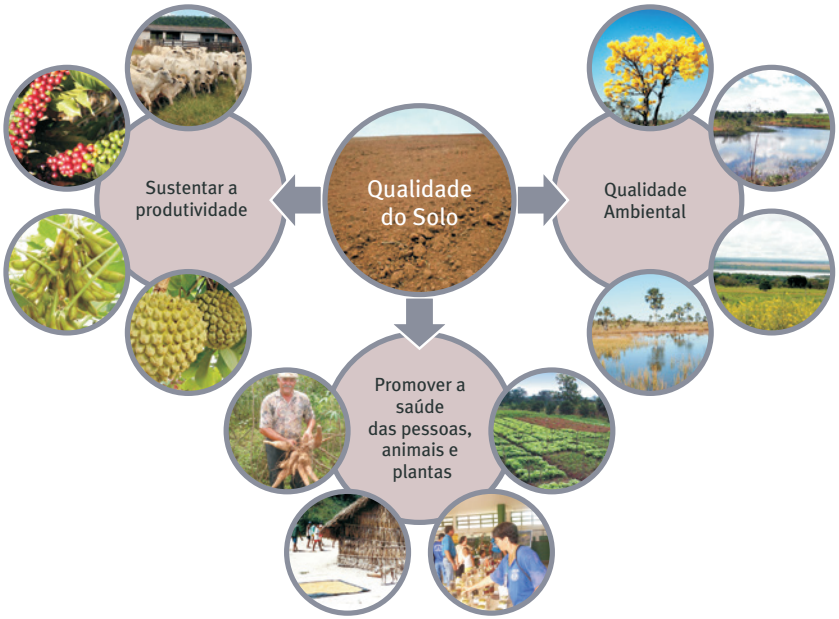


Figura 2. O conceito de qualidade do solo destaca a importância desse recurso para o funcionamento global dos ecossistemas .

Embora haja consenso entre pesquisadores e agricultores de que a manutenção/melhoria da qualidade do solo é um elemento-chave para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas, a avaliação dessa qualidade não é uma tarefa fácil. A multiplicidade de fatores químicos, físicos e biológicos que controlam os processos biogeoquímicos e suas variações em função do tempo e espaço, aliados à complexidade do solo, estão entre os fatores que dificultam a capacidade de acessar a sua qualidade e identificar parâmetros-chaves que possam servir como indicadores do seu funcionamento. Por essa razão, um conjunto mínimo de indicadores englobando atributos físicos, químicos e biológicos deve ser utilizado nas análises de qualidade do solo (DORAN; PARKIN, 1994), uma vez que nenhum indicador individualmente irá descrever e quantificar todos os aspectos da qualidade do solo.

O componente biológico do solo está intimamente relacionado ao seu funcionamento, apresentando uma estreita inter-relação com os componentes físicos e químicos. Os microrganismos do solo são res-

ponsáveis por serviços ambientais de importância fundamental, tais como os processos de formação do solo, decomposição de resíduos orgânicos (animais e vegetais), ciclagem de nutrientes e formação da matéria orgânica, biorremediação de poluentes e agrotóxicos, entre outros. A participação dos microrganismos em todos esses processos justifica a inclusão dos indicadores biológicos ou bioindicadores nos índices de qualidade do solo e a necessidade de estudos visando selecionar quais desses indicadores biológicos seriam os mais apropriados para esse fim. Como o estabelecimento de diferentes agroecossistemas influencia diretamente a biota do solo e os processos realizados por ela, o uso de bioindicadores emerge como um componente importante dos estudos envolvendo a avaliação da qualidade dos solos agrícolas, devido a sua sensibilidade para detectar, em etapa anterior em comparação a outros parâmetros físicos e químicos, alterações que ocorrem nesse ambiente em função do seu uso e manejo, seja ele mantenedor, melhorador ou degradador da qualidade (DORAN, 1980; DICK, 1994; MATSUOKA et al., 2003; SILVA et al., 2009).

Diferentemente do que ocorre com os indicadores químicos de fertilidade, cujos níveis (muito baixo, baixo, médio, adequado e alto) já estão relativamente bem definidos para cada nutriente e tipo de solo (sempre levando em consideração características como: textura, teor de matéria orgânica, etc.), a base de informações disponível sobre os dados biológicos ainda é muito pequena. Dessa forma, as dificuldades na interpretação dos bioindicadores de qualidade, ou seja, de saber quando é que os valores obtidos indicam ou não um bom solo, constituem um dos grandes obstáculos a serem transpostos para o uso dessas variáveis nas avaliações de qualidade do solo (TÓTOLA; CHAER, 2002).

Outro aspecto a ser destacado é que os valores "ideais" para os bioindicadores podem variar conforme o tipo de solo, sistemas de manejo e condições climáticas. Santana e Bahia-Filho (1999) utilizaram o termo limite de sustentabilidade para separar a condição sustentável da não-sustentável e sugeriram dois enfoques para o estabelecimento de critérios de referências: (1) condição de solo nativo e (2) condições que maximizem a produção e conservem o meio ambiente. Pode-se ainda adotar como referência critérios de variação temporal, quando

ocorre o acompanhamento de uma mesma área ao longo do tempo. Nesse caso, os valores determinados para os bioindicadores podem ser monitorados para se avaliar tendências ao longo do tempo. Na realidade, tanto as avaliações comparativas usando as áreas de referências ("comparative assessment"), como as avaliações temporais ("dynamic assessment"), são complementares, pois permitem diferentes escalas de avaliação. Desses critérios de referência, o uso de áreas nativas, com mínimos impactos antropogênicos, tem prevalecido (DICK, 1994; DORAN; PARKIN, 1994; TRASAR-CEPEDA et al., 1998; MENDES et al., 2003).

Entre os parâmetros utilizados pela comunidade científica para caracterizar o componente biológico dos solos, destacam-se as avaliações de biomassa, atividade e diversidade microbiana.

A biomassa microbiana do solo (geralmente expressa em μg de C. g^{-1} de solo ou mg de C. kg^{-1} de solo) é a parte viva e mais ativa da matéria orgânica do solo e é constituída principalmente por fungos, bactérias e actinomicetos. Apesar da sua importância em relação ao teor total de C orgânico no solo, o tamanho dos componentes vivos da matéria orgânica é relativamente pequeno, variando de 1% a 5% do C orgânico total dos solos (JENKINSON; LADD, 1981; SMITH; PAUL, 1990). Como de 99% a 95% da matéria orgânica é constituída por frações mortas, relativamente estáveis e resistentes a alterações, mudanças significativas nessas frações podem levar anos e (ou) décadas para serem detectadas (RICE et al., 1996). Entretanto, alterações significativas na biomassa microbiana podem ser detectadas com maior antecedência quando comparadas a mudanças na matéria orgânica (POWSON et al., 1987; TURCO et al., 1994), porque a biomassa é a fração mais dinâmica do C orgânico do solo. Por essa razão, a biomassa microbiana tem sido proposta como um indicador do estado e das alterações da matéria orgânica total do solo e sugerida como uma medida sensível do aumento ou decréscimo de sua quantidade.

Entre os métodos mais utilizados na determinação da biomassa microbiana no Brasil, destacam-se o de clorofórmio-fumigação-incubação – CFI (JENKINSON; POWLSON, 1976) e clorofórmio-fumigação-extração – CFE (VANCE et al., 1987), ambos baseados na esterilização parcial (fumigação) de amostras de solos com clorofórmio. No

método CFI, a determinação do tamanho da biomassa é feita com base no fluxo de CO_2 liberado das amostras de solo fumigadas e não fumigadas após um período de incubação de 7 a 10 dias (Figura 1). No CFE, essa determinação é feita a partir da extração do C-orgânico das amostras fumigadas e não fumigadas utilizando um extrator fraco como o sulfato de potássio (Figura 3). Maiores informações sobre esses métodos podem ser encontradas em Oliveira et al. (2001), Roscoe et al. (2006), Reis-Junior e Mendes (2007), Brandão-Junior et al. (2008).

Na Reunião de Fertilidade e Biologia do Solo (Fertbio) – organizada pela Sociedade Brasileira de Ciência do Solo em Lages, SC, em 2004 –, os pesquisadores que trabalham com o intuito de identificar bioindicadores de qualidade do solo se reuniram e definiram sobre a padronização de algumas condições mínimas entre os laboratórios, visando permitir a construção de uma base nacional de dados. Principalmente pela praticidade, menor tempo e trabalho envolvidos nas análises e boa repetibilidade na maioria dos ensaios, o método CFE foi escolhido, com amostragem de solo na camada de 0 cm a 10 cm. Essa decisão visou, também, incentivar a adoção dessa análise em um número maior de laboratórios. O maior desafio a essa metodologia, porém, consistirá em encontrar novos métodos para a análise do C, evitando produtos tóxicos como o dicromato de potássio, uma vez que há uma demanda mundial de análises utilizando uma "química limpa". Para fins de pesquisa, o método CFI continua a ser útil em diversas situações. Finalmente, é de grande importância mencionar que, em qualquer método utilizado, as medidas devem ser feitas sob condições totalmente padronizadas, a fim de permitir a reprodutibilidade e comparação dos resultados.

O quociente microbiano (*q*MIC) é um índice utilizado para fornecer indicações sobre a qualidade da matéria orgânica sendo expresso pela relação entre o C da biomassa microbiana e o C orgânico total. Em circunstâncias de fatores estressantes para os microrganismos (pH, deficiências nutricionais, presença de metais pesados), a capacidade de utilização do C é menor e, consequentemente, o *q*MIC também diminui (WARDLE, 1994). Já com a adição de matéria orgânica de boa qualidade ou com o término de uma situação de estresse, a bio-

massa aumenta, assim como o *q*MIC, mesmo se os teores de C orgânico permanecerem inalterados (POWLSON et al., 1987).

Determinações da biomassa microbiana não fornecem indicações sobre os níveis de atividade das populações microbianas do solo, ou seja, podem ocorrer situações em que os solos apresentem elevadas quantidades de biomassa inativa e vice-versa. Daí a importância das análises que medem a atividade microbiana ou o estado metabólico atual e potencial das comunidades de microrganismos do solo. Entre esses, destacam-se as determinações do C e N prontamente mineralizáveis e as de atividade enzimática dos solos.

A quantidade de CO_2 liberada pela respiração dos microrganismos (também denominada, C prontamente mineralizável) é um dos métodos mais tradicionais e mais utilizados para avaliar a atividade metabólica da população microbiana do solo (ZIBILSKE, 1994). Da mesma forma que outras atividades metabólicas, a respiração depende do estado fisiológico das células e é influenciada por diferentes fatores, como a umidade, a temperatura e a disponibilidade de nutrientes. Enquanto os ensaios para determinação da respiração do solo como um todo podem ser realizados no campo, os ensaios para respiração microbiana são comumente realizados em vasos hermeticamente fechados, incubados sob condições controladas de temperatura e umidade em laboratório, utilizando-se uma base (KOH ou NaOH) para capturar o CO_2 que é evoluído do solo. Atualmente, nos EUA, o kit Solvita® produzido pelo Woods End® Research Laboratory, baseado na tecnologia de gel colorimetria, tem sido comercializado para que os próprios agricultores possam avaliar a respiração do solo de uma maneira eficiente, rápida e barata (www.solvita.co.uk/products/soil-life-test-kit.htm).

O quociente metabólico (qCO_2) é um índice que expressa a relação entre a respiração basal do solo e o tamanho da biomassa microbiana. Esse quociente foi proposto originalmente por Andersom e Domsch (1978) baseado na teoria do desenvolvimento bionergético dos ecossistemas de Odum (1969). Essa teoria prediz que comunidades microbianas sob estresse (metais pesados, limitações de nutrientes, baixo pH, etc.) ou expostas a qualquer tipo de perturbação (cultivo, queimada, etc.) serão menos eficientes em converter o C assimilado em

nova biomassa, pois uma maior parte desse C deverá ser utilizado para fornecer energia (e portanto, respirado como CO_2) para processos metabólicos necessários à manutenção da homeostase celular. Por conseguinte, sob tais condições de estresse ou distúrbio, o qCO_2 será mais elevado quando comparado a ambientes (solos) mais estáveis, ou mais próximos do seu estado de equilíbrio.

As enzimas do solo participam das reações metabólicas intercelulares, responsáveis pelo funcionamento e pela manutenção dos seres vivos e também desempenham papel fundamental atuando como catalizadoras de várias reações que resultam na decomposição de resíduos orgânicos (ligninases, celulases, proteases, glucosidases, galactosidases), ciclagem de nutrientes (fosfatases, amidases, urease, sulfatase), formação da matéria orgânica e da estrutura do solo (MENDES; VIVALDI, 2001). A atividade enzimática de um solo é o resultado do somatório da atividade enzimática dos organismos vivos (plantas, microrganismos e animais) e das enzimas abiônticas (enzimas associadas à fração não viva, que se acumulam no solo protegidas da ação de proteases através da adsorção em partículas de argila e na matéria orgânica). Os ensaios para determinação da atividade enzimática são simples e rápidos e baseiam-se na adição de substratos específicos para cada tipo de enzima, a uma amostra de solo suspensa em um tampão (DICK et al., 1996). Após um curto período de incubação, as amostras são filtradas e é realizada a determinação do produto, por colorimetria (Figura 3). Quanto maior a intensidade da coloração, maior a quantidade de produto formado e, consequentemente, maior a atividade enzimática do solo (Figura 4) . Como esses ensaios são realizados sob condições ideais de pH, temperatura e disponibilidade de substrato, representam a atividade potencial máxima e não a atividade enzimática real do solo (ALEF; NANNIPIERI, 1995). Vários trabalhos têm demonstrado o grande potencial das análises enzimáticas como indicadores sensíveis para detectar diferenças entre solos e mudanças que variam em função da influência antrópica nos mesmos (DICK,1994; DICK et al., 1996; TRASAR-CÉPEDA et al., 1998; MENDES et al., 2003).

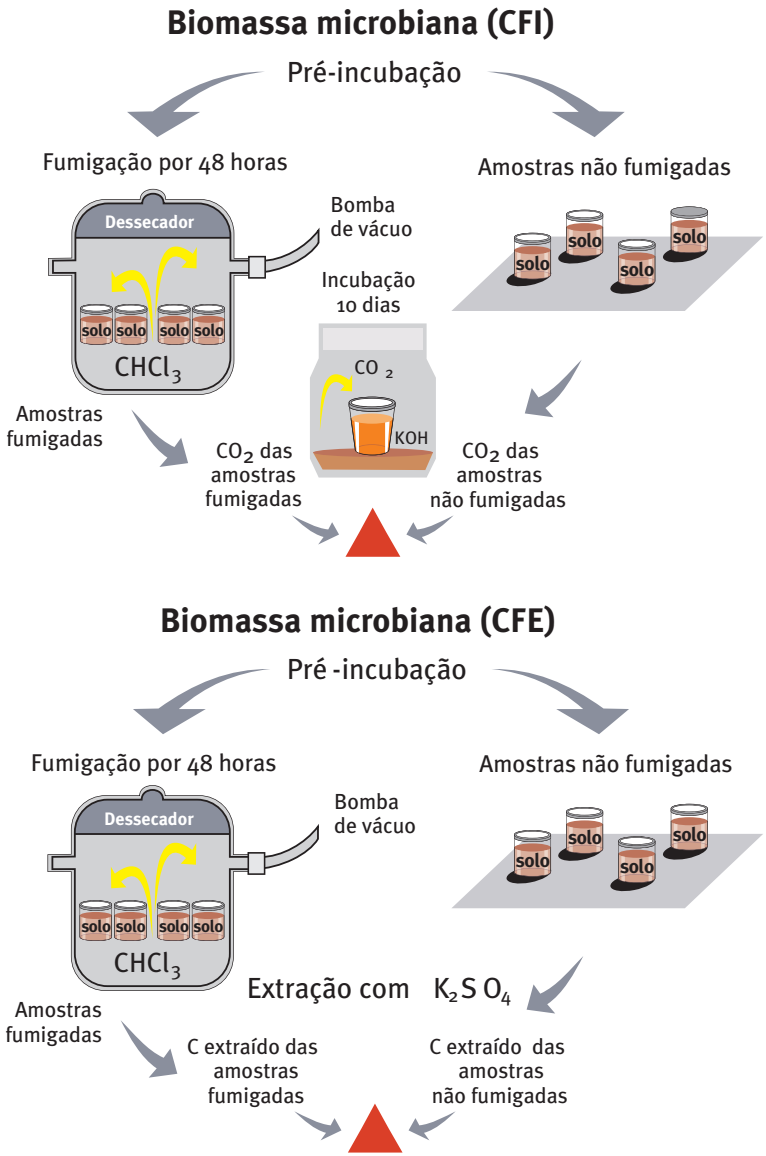


Figura 3. Metodolodogias de determinação do carbono da biomassa microbiana.

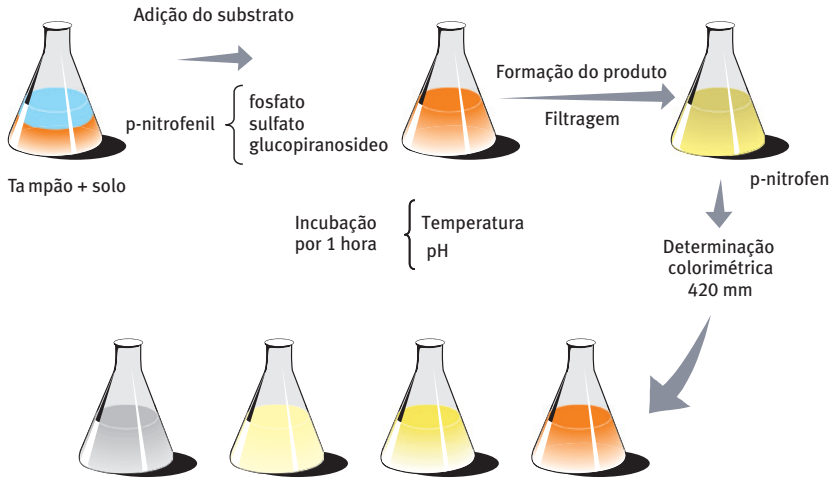


Figura 4. Método colorimétrico de determinação da atividade enzimática do solo.

As avaliações de diversidade microbiana fornecem indicativos sobre a variedade e a variabilidade, em termos de número (riqueza) e abundância (equitatividade), de espécies presentes em um determinado solo. O advento de técnicas moleculares tem permitido identificar que o número de espécies microbianas presentes no solo é bastante superior ao estimado com base em técnicas tradicionais de cultivo em placa (WARD et al., 1990). Torsvik et al. (1990), com base em dados de reassociação de DNA extraído de solo, estimaram que o número de genomas em uma grama de solo estaria em torno de 10.000, dos quais uma pequena minoria (de 0,1% a 10%) teria capacidade de crescer em meios de cultivo no laboratório. Embora menos evidente, a diversidade microbiana é tão importante quanto à diversidade de plantas e animais. Quanto maior a diversidade, maior será a estabilidade do ecossistema e a eficiência do uso dos recursos disponíveis, pois menor será o gasto de energia para sustentar a biomassa ali presente (TÓTOLA; CHAER, 2002). Uma alta diversidade microbiana garante a estabilidade do ecossistema, pois ela produz um efeito "tampão" no solo contra estresses ambientais naturais ou causados pelo homem. Por exemplo, o estabelecimento de uma condição ambiental desfa-

vorável no solo pode resultar na inibição de algumas populações que desempenham funções essenciais na comunidade. Em comunidades com alta diversidade, entretanto, há uma alta probabilidade de ocorrência de microorganismos quiescentes que poderiam desempenhar a mesma função, mas que possuem exigências diferentes relacionadas a fatores físicos, químicos e biológicos. Consequentemente, essas populações podem atuar como substitutos funcionais, assegurando que algumas funções vitais sejam sustentadas independentemente das mudanças ambientais (VAN BRUGGEN; SEMENOV, 2000). Para um determinado solo, as avaliações de diversidade envolvem aspectos genéticos (riqueza/abundância de genomas) e funcionais (variedade de funções de decomposição, transformação de nutrientes, promoção/supressão do crescimento de plantas etc.).

Em geral, os estudos de diversidade genética microbiana são baseados na extração e purificação do DNA das comunidades microbianas do solo, seguidas da amplificação dos genes que codificam para o RNA ribossômico (rDNA), pela reação da polimerase em cadeia (PCR), utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores universais, para espécies ou domínios específicos. Posteriormente, os produtos da amplificação são separados por técnicas como o eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE); eletroforese gel com gradiente térmico (TGGE); polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP); análise de restrição do rDNA amplificado (ARDRA); polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP); e polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição terminal (t-RFLP).

O padrão de bandas obtidos nessas análises reflete os genótipos dominantes e a diversidade genética. As análises de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) e ácidos graxos ligados a ésteres de fosfolipidios (PLFAs), baseadas nos perfis de lipídios extraídos do solo, também são utilizadas para a caracterização da estrutura da comunidade microbiana. Alguns ácidos graxos com estruturas químicas distintas estão associados com maior frequência e abundância a determinados grupos taxonômicos de microrganismos. Essa associação possibilita o uso dessas moléculas como biomarcadores para investigação de alterações na estrutura da comunidade microbiana. Inferências sobre mudanças nas estruturas dessas comunidades são baseadas em dife-

renças na composição do perfil cromatográfico de ácidos graxos derivados de fosfolipídios entre amostras. Maiores detalhes sobre todas essas técnicas podem ser obtidos em Kirk et al. (2004).

Também merecem destaque as metodologias moleculares que independem do cultivo, baseadas na extração direta de ácidos nucléicos de amostras ambientais (metagenômica), associada às técnicas de hibridização com sondas grupo-específicas e (ou) PCR, clonagem e sequenciamento, que vêm permitindo uma avaliação mais precisa da diversidade microbiana no ambiente e a descoberta de novos grupos de organismos, nunca antes cultivados (CANHOS; MANFIO, 2004).

O uso do sistema Biolog™ (GARLAND; MILLS, 1991), baseado na incubação de suspensões de solo em microplacas contendo sais de tetrazólio e 95 fontes diferentes de C, permite a determinação dos perfis fisiológicos da comunidade microbiana (*community-level physiological profiles*; CLPP). Originalmente essas placas destinavam-se à caracterização de isolados bacterianos provenientes de amostras clínicas (havia placas específicas para bactérias gram-positivas e gram-negativas) e não para análises de estrutura das comunidades microbianas do solo. Posteriormente, foi desenvolvida a microplaca EcoPlate™ Biolog, que utiliza o mesmo princípio, porém, com 3 repetições de 31 fontes de carbono consideradas ambientalmente mais relevantes. O corante tetrazólio, presente em cada poço das microplacas, é incolor, mas, ao ser reduzido pela atividade microbiana, torna-se roxo. A intensidade dessa coloração é medida por espectrofotometria, e a absorbância utilizada como medida da capacidade da comunidade em degradar os substratos. Muitas espécies de fungos presentes no solo não conseguem promover a redução dos sais de tetrazólio, por isso placas específicas para análises das comunidades de fungo também foram desenvolvidas (CLASSEN et al., 2003). De acordo com a utilização dessas fontes, a similaridade entre as comunidades é comparada por meio de uma análise de agrupamento dos dados. A importância das análises de diversidade funcional reside no fato de que, somente com base nas alterações na diversidade genética, não é possível inferir se algumas funções do solo foram perdidas ou não (TÓTOLA; CHAER, 2002). Além disso, as análises de diversidade funcional permitem uma melhor compreensão do funcionamento da comunidade microbiana,

pois possibilitam averiguar a presença de redundância funcional no solo, isto é, a existência de populações que desempenham um mesmo papel funcional. Quanto maior a redundância funcional e a diversidade, mais rápido o ecossistema pode retornar às condições originais iniciais, ou seja, maior a sua resiliência.

Os estudos sobre o efeito de diferentes manejos de solo na microbiota dos solos tropicais utilizando avaliações qualitativas e quantitativas da biomassa, atividade e diversidade microbianas são fundamentais para identificar quais os parâmetros que poderiam ser recomendados como bioindicadores (Figura 5). Todos os procedimentos mencionados anteriormente para a avaliação da biomassa, atividade e diversidade microbiana permitem avaliar alguns aspectos do componente microbiológico dos solos e auxiliam nos estudos sobre os efeitos do manejo do solo na microbiota (BALOTA et al., 2003; BALOTA et al., 2004a,b; MENDES et al., 2003; FRANCHINI et al., 2007; HUNGRIA et al., 2009; SILVA et al., 2009). Entretanto, considerando que, além de (a) refletir algum aspecto do funcionamento do ecossistema; (b) mostrar uma resposta precisa e rápida a qualquer perturbação; (c) possuir distribuição universal mas com especificidades regionais, um bom indicador ecológico de qualidade do solo também deve (d) ser de simples determinação e barato (Holloway & Stork, 1991), é possível que alguns desses procedimentos, devido à sua complexidade de análise e custo elevado (por exemplo, análises de diversidade genotípica), sejam limitados para utilização como biondicadores. Outro aspecto importante e que também deve ser considerado é que, como um único parâmetro não é capaz descrever e quantificar todos os aspectos da qualidade do solo, torna-se imprescindível a combinação de várias determinações.

Fotos: Ieda de C. Mendes e José Humberto Valadares Xavier

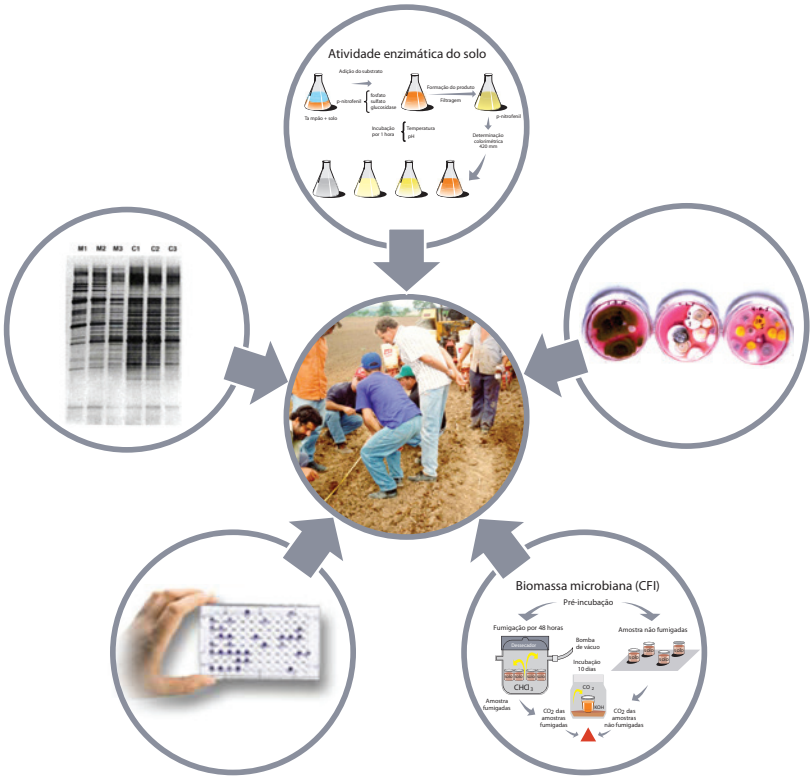


Figura 5. Para que possa vir a ser utilizado rotineiramente em análises de solo, o bioindicador de qualidade deverá ser de simples determinação e barato .

Em um futuro próximo, o que se vislumbra é a possibilidade de que, além das propriedades químicas e físicas, determinações das propriedades biológicas possam fazer parte das rotinas de análises de solo. A inclusão dos bioindicadores em análises de solo será importante tanto no sentido de atestar a sustentabilidade dos sistemas de produção com adoção de manejos conservacionistas, como para alertar agricultores que estejam adotando sistemas de manejo que possam levar à degradação do solo. Outras utilizações dos bioindicadores podem envolver a ecocertificação de produtos agrícolas, o monitoramento de programas de recuperação de áreas degradadas, o monitoramento de transgênicos, entre outros.

Índices de qualidade do solo

Tendo em vista que a quantificação da qualidade de um solo é um processo complexo, a elaboração de Índices de Qualidade de Solo (IQS) (Figura 6) , englobando aspectos físicos químicos e biológicos, constitui-se numa forma de agregar e simplificar informações de natureza diversa (SMITH et al., 1994; KARLEN; STOTT, 1994; TRASAR-CEPEDA et al., 1998; HUSSAIN et al., 1999).

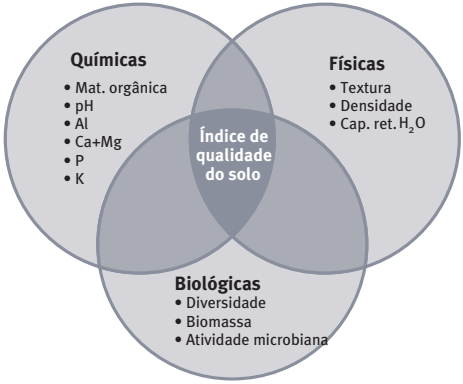


Figura 6. Nenhum indicador individualmente descreve e quantifica todos os aspectos da qualidade do solo. O Índice de Qualidade de Solo (IQS) agrega e simplifica informações sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo.

Karlen e Stott (1994) propuseram uma estratégia para calcular um IQS baseado na determinação de parâmetros químicos, físicos e biológicos que avaliassem funções específicas do solo. Posteriormente, essa estratégia foi replicada/adaptada por diversos autores (HUSSAIN et al., 1999; CHAER, 2001; SILVA, 2008). A título de exemplo, no modelo proposto por Chaer (2001) para quantificar o efeito de diferentes manejos na cultura do eucalipto sobre a qualidade do solo, as propriedades físicas, químicas e biológicas foram relacionadas às seguintes funções do solo: (1) receber, armazenar e suprir água; (2) armazenar, suprir e ciclar nutrientes; (3) promover o crescimento das raízes; (4) promover a atividade biológica; e (5) manter a homeostase. A cada função foi associado um peso numérico, expresso em porcentagem, que determina o seu peso dentro do modelo. Similarmente, foram definidos

pesos para cada indicador associado a cada função do solo. Cada indicador do modelo foi pontuado em uma escala de 0 a 1 por meio de funções de pontuação padronizada (FPPs) (WYMORE, 1993).

As FPPs possuem forma sigmoide e descendente ou do tipo "menos é melhor", quando o aumento do valor do indicador representa piora da função do solo (ex.: densidade aparente); ascendente ou do tipo "mais é melhor", quando o aumento do valor do indicador representa melhora da função (ex.: matéria orgânica ou biomassa microbiana do solo); e do tipo "ótimo", usada para indicadores que possuem nível ótimo para a função (ex.: pH ou níveis de determinados nutrientes). Os valores dos limites inferiores, superiores e ótimo que determinam a forma das curvas das funções de pontuação foram definidos com base na literatura (para os indicadores químicos) e nos valores encontrados em uma área com mata nativa adjacente ao povoamento de eucalipto (para os indicadores físicos e biológicos). Finalmente, o IQS foi calculado pela soma das pontuações obtidas por cada indicador, ponderada pelos pesos definidos de acordo com o grau de importância atribuído tanto ao indicador, em relação à função do solo ao qual ele foi associado, quanto à própria função, em relação à qualidade global do solo. Na profundidade de 0 cm a 5 cm, o maior IQS foi obtido no solo sob vegetação natural, seguido dos solos sob eucalipto submetidos a manejos que priorizaram a conservação dos resíduos orgânicos por ocasião da reforma do povoamento. Os valores mais baixos dos IQS foram observados nos tratamentos em que houve a remoção ou queima do material orgânico da superfície do solo.

Wienhold et al. (2004) também usaram uma estratégia semelhante e compararam vários sistemas de manejo por meio do cálculo de um IQS a partir de valores normalizados de vários indicadores. A pastagem fertilizada e bem manejada foi o sistema que apresentou o maior IQS seguida em ordem decrescente pelos seguintes sistemas de manejo: pastagem com moderada carga animal; pastagem sem animais; pastagem com alta carga de animais; cultura anual sob plantio direto; e cultura anual sob plantio convencional, que apresentou o menor IQS.

As planilhas utilizadas no trabalho de Chaer (2001) constituíram a base para o desenvolvimento do software SIMOQS "Sistema de

Monitoramento da Qualidade do Solo", uma ferramenta computacional desenvolvida na Universidade Federal de Viçosa. O Simoqs permite a construção e condução de testes de modelos para cálculos de índices de qualidade de solos de forma rápida, com uma interface amigável e que podem ser aplicados a diferentes regiões e culturas (CHAER, 2001). Mendes et al. (2008) verificaram que o uso do Simoqs foi eficaz como ferramenta para auxiliar na avaliação da qualidade do solo em diferentes agroecossistemas na região do Cerrado. Por meio dos cálculos do IQS, foi possível confirmar os benefícios das pastagens bem manejadas (principalmente quando em consórcio com leguminosas), da rotação lavoura/pastagem e do plantio direto como sistemas de manejo capazes de favorecerem a qualidade desses solos.

Outra estratégia para elaboração de índices de qualidade de solo é baseada na construção de modelos orientados por análises de componentes principais (ACP) (ANDREWS et al., 2002) ou de regressão múltipla (TRASAR-CEPEDA et al., 1998; CHAER et al., 2009). Por exemplo, Trasar-Cepeda et al. (1998) sugeriram que a matéria orgânica de solos não perturbados (sob vegetação nativa) está em equilíbrio com várias propriedades biológicas e bioquímicas do solo. Esse equilíbrio pôde ser expresso por uma equação de regressão linear múltipla que estimou o conteúdo total de N do solo em função do C da biomassa microbiana, da capacidade de mineralização de N e das atividades de fosfatase, β-glucosidase e urease (R^2=0,97). Desse modo, esses autores propuseram um índice bioquímico de qualidade de solo calculado a partir dos teores reais e estimados de N do solo (relação N medido/N estimado). Estudos posteriores demonstraram a validade desse índice para indicar a degradação ou o distúrbio de solos afetados pelo manejo, mineração ou contaminação com efluentes orgânicos e metais pesados (LEIROS et al., 1999; TRASAR-CEPEDA et al., 2000). Chaer et al. (2009), utilizando a mesma estratégia proposta por Trasar-Cepeda et al. (1998), observaram que o teor de C total de diferentes solos de florestais de coníferas não-perturbadas do noroeste dos EUA pôde ser explicado apenas pelo C da biomassa microbiana e pela atividade de fosfatase, independentemente do horizonte do solo ou da época de coleta das amostras. A relação entre o C medido (C_{med}) e o C estimado (C_{est}) por meio de um modelo de análise de regressão

linear múltipla (R^2=0,97) provou ser um indicador simples para acessar os efeitos de diferentes estresses (pH e metais pesados) e distúrbios (ciclos de umedecimento e secagem e de congelamento e descongelamento) aplicados aos solos daquela região.

Em um mundo globalizado, em que a preocupação com a valoração dos serviços ambientais e as barreiras ao comércio internacional se tornam cada vez mais evidentes, é possível que, uma vez bem definidos e normatizados, o uso de índices de qualidade de solo permita a agregação de valor aos produtos agrícolas oriundos de propriedades rurais/países que sejam capazes de comprovar que as práticas de manejo adotadas em suas lavouras permitem a manutenção/melhoria da qualidade do solo, garantindo a preservação desse recurso para as gerações futuras. Seguindo esse raciocínio, o uso desses índices poderia também servir como referencial para a valoração das terras (TÓTOLA; CHAER, 2002). Várias agências reguladoras internacionais têm discutido os padrões a serem utilizados nas avaliações de qualidade do solo. A título de exemplo, o comitê técnico internacional ISO 190, "Qualidade do Solo", propôs uma lista de 35 parâmetros (químicos, físicos e biológicos) como indicadores de qualidade de solo; o US Environmental Protection Agency (EPA) propôs uma lista de 1.800 parâmetros como indicadores de qualidade química do solo, enquanto, na Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), estão sendo definidos diversos indicadores agroambientais (aproximadamente 250, dos quais 58 relacionados à qualidade do solo) (BURNS et al., 2006).

Atualmente, a Nova Zelândia já possui um sistema governamental on-line (http://sindi.landcare.cri.nz –) para avaliação da qualidade do solo, denominado The New Zealand Soil Indicators (SINDI), que utiliza apenas sete parâmetros. Os dados obtidos em cada propriedade rural podem ser comparados, simultaneamente, a um banco de dados nacional oriundo de 500 solos ou ao melhor conhecimento disponível para cada indicador (interpretação do especialista). A Holanda também possui um programa de monitoramento da qualidade do solo em larga escala, onde 200 locais são monitorados (BLOEM et al., 2006). A rede holandesa para monitoramento da qualidade do solo dividiu os solos do país, com seus respectivos usos da terra, em 10 classes. Para

cada classe de solo/uso, 20 locais diferentes (repetições) são amostrados. Desde 1997, um grupo de bioindicadores (biomassa, C e N mineralizável, incorporação de timidina) foi incluído no monitoramento holandês. As amostras de solo são coletadas na profundidade de 0 cm a 10 cm, armazenadas em geladeira (12 °C) e pré-incubadas a 12 °C e 50% da capacidade de campo por quatro semanas antes do início das determinações analíticas.

Longe da pretensão de representar um consenso, as várias abordagens utilizadas para o monitoramento da qualidade do solo e para os cálculos de IQS constituem, antes de tudo, subsídios para discussões técnicas e filosóficas sobre:

a) Quais os atributos (químicos, físicos e biológicos) devem fazer parte de um conjunto mínimo de dados para avaliar a qualidade do solo.
b) Como padronizar as metodologias utilizadas na sua determinação e os procedimentos para coleta e armazenamento das amostras de solo.
c) Como ajustar modelos de referência para cada sistema de manejo/cultura avaliado, definindo os pesos e valores de cada função/indicador nesses modelos e levando em consideração os aspectos locais, principalmente aqueles relacionados às condições edafoclimáticas.

Conforme destacado por Chaer (2001), o estudo da qualidade do solo implica na avaliação de um grande número de características que, além de gerarem um grande volume de dados, geram também muitas dificuldades na interpretação dos mesmos, pois é comum a ocorrência de tendências divergentes entre os indicadores. A título de exemplo, esse autor cita que, em solos sob vegetação nativa que foram convertidos para agricultura com base em adubações químicas e calagem do solo, a rápida melhoria nos atributos químicos para o desenvolvimento das plantas cultivadas é acompanhada simultaneamente por uma drástica alteração nos aspectos relacionados à biologia do solo, tais como a redução do carbono da biomassa microbiana, que não são passíveis de reconstituição no curto/médio prazo. A compatibilização dessas questões, a inclusão do componente econômico relacionado à produtividade das culturas nos cálculos de IQS e a própria forma de

utilização desses índices são aspectos importantes que também deverão ser objeto de discussão em estudos futuros. Uma certeza, porém, permanece, conforme destacado por Mendes e Reis Junior (2004): a de que a busca por práticas agrícolas que proporcionem altas produtividades, mas que também levem em consideração os diversos aspectos relativos à qualidade ambiental é uma equação complexa cuja resolução não pode, definitivamente, negligenciar o componente biológico do solo, pois este apresenta uma estreita inter-relação com os componentes físicos e químicos, os quais irão em conjunto influenciar não só a produtividade das culturas, mas também a sustentabilidade dos sistemas agrícolas.

Considerações finais

O futuro da utilização dos bioindicadores nos estudos de qualidade dos solos brasileiros depende das ações que estão sendo conduzidas hoje. Existe a necessidade de um esforço a nível nacional para a realização de avaliações sistemáticas para se medir e interpretar os parâmetros que sirvam adequadamente como bioindicadores, padronizando os métodos desde a amostragem, a estocagem e o pré-tratamento das amostras até os procedimentos analíticos e a apresentação dos resultados. Embora já existam atualmente algumas iniciativas nesse sentido no País, tais como o Projeto "Uso de parâmetros microbiológicos como bioindicadores para avaliar a qualidade do solo e a sustentabilidade dos agroecossistemas" (www.cpac.cnptia.embrapa.br), a articulação/estruturação de uma rede "Rede Brasileira para Monitoramento da Qualidade de Solos Agrícolas", com arranjo multi-institucional e caráter transdiciplinar, seria uma forma de agregar todos os especialistas envolvidos no assunto. Esse esforço favoreceria a otimização dos recursos investidos na pesquisa e auxiliaria na comparação dos resultados obtidos em diferentes pontos do território nacional.

Outra questão refere-se à necessidade da construção de uma base de dados consistente sobre os atributos biológicos de diferentes solos brasileiros, semelhantemente ao banco de dados de 500 solos utilizados pelos pesquisadores neozelandeses para a elaboração do Sindi. A formação, manutenção e alimentação constante de uma base de dados

dessa natureza auxiliariam fortemente na superação de dificuldades na interpretação dos valores dos bioindicadores, permitindo saber, por exemplo, quão distantes os valores obtidos estão ou não de um bom solo, localizado sob condições similares. Outro aspecto que também deve ser considerado é o fato de que, num país de dimensões continentais, como o Brasil, é possível a ocorrência de variações regionais, com relação aos bioindicadores.

Enfim, existe no cenário atual uma forte demanda de pesquisa sobre "Bioindicadores de qualidade solo", tema complexo, de abrangência nacional, cujas respostas não podem ser atendidas por projetos de pesquisa isolados. O Brasil possui especialistas com capacidade para responder esses desafios cabendo a nós cientistas do solo, nossas instituições, órgãos governamentais e sociedades científicas envidar todos os esforços para tornar esse sonho realidade no mais breve período de tempo.

Referências

ALEF, K; NANNIPIERI, P. Enzyme activities. In: ALEF, K; NANNIPIERI, P. (Ed.). **Methods in applied microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995. p. 311-374.

ANDERSON, J. P.; DOMSCH, K. H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 10, p. 215-221, 1978.

ANDREWS, S. S.; KARLEN, D. L.; MITCHELL, J. P. A comparison of soil quality indexing methods for vegetable production systems in Northern California. **Agriculture Ecosystems & Environment**, v. 90, p. 25-45, 2002.

BALOTA, E. L.; KANASHIRO, M.; COLOZZI FILHO, A.; ANDRADE, D. S.; DICK, R. P. Soil enzyme activities under long-term tillage and crop rotation systems. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 300-306, 2004a.

BALOTA, E. L.; COLOZZI FILHO, A.; ANDRADE, D. S.; DICK, R. P. Long-term tillage and crop rotation effects on microbial biomass and C and N mineralization in a Brazilian Oxisol. **Soil & Tillage Research**, v. 77, p. 137-145, 2004b.

BALOTA, E. L.; ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A.; DICK, R. P. Microbial biomass in soils under different tillage and crop rotation systems. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38, p. 15-20, 2003.

BLOEM, J.; SCHOUTEN, A. J.; SOREN, J. S; RUTGERS, M.; WERF, A.; BREURE,M. Monitoring and evaluating soil quality. In: BLOEM, J.; HOPKINS, D. W.; BENEDETTI, A. (Ed.). **Microbiological methods for evaluating soil quality**. Cambridge: CABI, 2006. p. 23-49.

BRANDÃO-JUNIOR, O.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; ESPÍNDOLA, C. R. Comparação entre os métodos de fumigação-extração e fumigação-incubação para a determinação do carbono da biomassa microbiana em um Latossolo Vermelho distroférrico eutrófico do norte do Paraná. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1911-1919, 2008.

BURNS, R. G.; NANNIPIERI, P.; BENEDETTI, A.; HOPKINS, D. W. Defining soil quality. In: BLOEM, J.; HOPKINS, D. W.; BENEDETTI, A. (Ed.). **Microbiological methods for evaluating soil quality**. Cambridge: CABI, 2006. p. 23-49.

CHAER, G. M. **Modelo para determinação de índice de qualidade do solo baseado em indicadores físicos, químicos e microbiológicos.** 2001. 89 f. Dissertação (Mestrado) **-** Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

CHAER, G. M.; MYROLD, D. D.; BOTTOMLEY, P. J. A soil quality index based on the equilibrium between soil organic matter and biochemical properties of undisturbed coniferous forest soils of the Pacific Northwest. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 822-830, 2009.

CLASSEN, A. T.; BOYLE, S. I; HASKINS, K. E.; OVERBY, S. T.; HART, S. C. Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 44, p. 319-328, 2003.

DICK, R. P. Soil enzymes activities as indicators of soil quality. In: DORAN, J. W.; COLEMAN, D. C.; BEZDICEK, D. F.; STEWART, B. A. (Ed.). **Defining soil quality for a sustainable environment.** Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 107-124. (Special Publication number, 35).

DICK, R. P.; BREAKWELL, D. P; TURCO, R. Soil enzyme activities and biodiversity measurements. In: DORAN, J. W.; JONES, A. J. (Ed.). **Methods for assessing soil quality**. Madison: Soil Science Society of America, 1996. p. 247-272. (Special publication number, 49).

DORAN, J. W. Soil microbial and biochemical changes associated with reduced tillage. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 44, p. 765-771, 1980.

DORAN, J. W.; PARKIN, T. B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J. W.; COLEMAN, D. C.; BEZDICEK, D. F.; STEWART, B. A. (Ed.). **Defining soil quality for a sustainable environment.** Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 107-124. (Special Publication number, 35).

FRANCHINI, J. C.; CRISPINO, C. C.; SOUZA, R. A.; TORRES, E.; HUNGRIA, M. Microbiological parameters as indicators of soil quality under various soil management and crop rotation systems in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, Dordrecht, v. 92, p. 18-29, 2007.

GARLAND, J. L.; MILLS, A. L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. **Applied and environmental Microbiology**, v. 57, p. 2351-2359, 1991.

HOLLOWAY, J. D.; STORK, N. E. The dimension of biodiversity: the use of invertebrates as indicators of human impact. In: HAWKSWORTH, D. L. (Ed.). **The biodiversity of microorganisms and invertebrates**: Its role in sustainable agriculture. Wallington: CAB International, 1991. p. 37-63.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; BRANDÃO-JUNIOR, O.; KASCHUK, G.; SOUZA, R. A. Soil microbial activity and crop sustainability in a long-term experiment with three soil-tillage and two crop-rotation systems. **Applied Soil Ecology**, 2009.

HUSSAIN, I; OLSON, K. R.; WANDER, M. M.; KARLEN, D. L. Adaptation of soil quality indices and application to three tillage systems in southern Illinois. **Soil and tillage Research**, v. 50, p. 237-249, 1999.

JENKINSON, D. S.; LADD, J. N. Microbial biomass in soils: measurement and turnover. In: PAUL, E. A.; LADD, J. N. (Ed.). 5th ed. **Soil Biochemistry**. New York: Marcel Decker, 1981. p. 415-471.

JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S. The effects of biocide treatment on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 8, p. 209-213, 1976.

KARLEN, D. L.; STOTT, D. E. A framework for evaluating physical and chemical indicators of soil quality. In: DORAN, J. W.; COLEMAN, D. C.; BEZDICEK, D. R.; STEWART, B. A. (Ed). **Defining soil quality for a sustainable environment.** Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 53-72. (Special Publication, 35).

KIRK, J. L; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 169-188, 2004.

LEIROS, M. C.; TRASAR-CEPEDA, C.; GARCIA-FERNANDEZ, F.; GIL-SOTRES, F. Defining the validity of a biochemical index of soil quality. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, p. 140-146, 1999.

MANFIO, G. P.; CANHOS, V. P. Recursos microbiológicos para Biotecnologia. In: SILVEIRA, J. M.; DAL POZ, M. E.; ASSAD, A. L. D. (Org.). **Biotecnologia e recursos genéticos**: desafios e oportunidades para o Brasil. Campinas: Instituto de Economia Unicamp: FINEP, 2004. p. 233-252.

MATSUOKA, M.; MENDES, I. C.; LOUREIRO, M. F. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste- MT. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 425-433, 2003.

MENDES, I. C.; REIS JUNIOR, F. B. **Uso de parâmetros microbiológicos como indicadores para avaliar a Qualidade do Solo e a sustentabilidade dos agroecossistemas.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2004. 34 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 112).

MENDES, I. C.; SOUZA, L. V.; RESCK, D. V. S.; GOMES, A. C. Propriedades biológicas em agregados de um LE sob plantio convencional e direto no Cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 435-443, 2003.

MENDES, I. C.; SILVA, L. G.; REIS JÚNIOR, F. B.; TÓTOLA, M. R. Cálculo de um índice de qualidade de solo para diferentes agroecossistemas do Cerrado. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE O CERRADO, 9.; SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE SAVANAS TROPICAIS, 2., 2008, Brasília, DF. **Anais...** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. 1 CD-ROM.

MENDES, I. C; VIVALDI, L. Dinâmica da biomassa e atividade microbiana em uma área sob mata de galeria na região do DF. In: RIBEIRO, J. F.; FONSECA, C. E. L. da; SOUSA-SILVA, J. C. (Ed.). **Cerrado:** caracterização e recuperação de Matas de Galeria. Planaltina, DF: EMBRAPA-CPAC, 2001. p. 664-687.

ODUM, E. P. The strategy of ecosystem development. **Science**, v. 164, p. 262-270, 1969.

OLIVEIRA, J. R. A.; MENDES, I. C.; VIVALDI, L. Carbono da biomassa microbiana em solos de cerrado sob vegetação nativa e sob cultivo: avaliação dos métodos fumigação- incubação e fumigação-extração. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** v. 25, p. 863-871, 2001.

POWLSON, D. S; BROOKES, P. C; CHRISTENSEN, B. T. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total organic matter due to straw incorporation. **Soil Biology and Biochemistry,** v.19, p.159-164, 1987.

REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C. **Biomassa microbiana do solo**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 40 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 205).

RICE, C. W.; MOORMAN, T. B.; BEARE, M. Role of microbial biomass carbon and nitrogen in soil quality. In: DORAN, J. W.; JONES, A. J. (Ed.). **Methods for assessing soil quality.** Madison: Soil Science Society of America, 1996. p. 203-216. (Special Publication, 49).

ROSCOE, R.; MERCANTE, F. M.; MENDES, I. C.; REIS-JUNIOR, F. B.; FRANCHINI, J. C.; HUNGRIA, M. Biomassa microbiana do solo: fração mais ativa da matéria orgânica. In: ROSCOE, R.; MERCANTE, F. M.; SALTON, J. C. (Ed.). **Dinâmica da matéria orgânica do solo sistemas conservacionistas:** modelagem matemática e métodos auxiliares. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. p. 163-198.

SANTANA, D. P.; BAHIA-FILHO, A. F. C. Indicadores de qualidade do solo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 27., 1999, Brasília, DF. **Ciência do solo e qualidade de vida:** resumos. Brasília, DF: Embrapa Cerrados: UnB, 1999. 1 CD-ROM.

SILVA, L. G. **Uso e monitoramento de indicadores microbiológicos para avaliação da qualidade dos solos de cerrado sob diferentes agroecossistemas**. 2008. 121 f. Dissertação (Mestrado)- Universidade de Brasília, Brasília, DF.

SILVA, L. G.; MENDES, I. C.; REIS JUNIOR, F. B.; FERNANDES, M. F.; MELO, J. T; KATO, E. Atributos físicos, químicos e biológicos de um Latossolo de cerrado sob plantio de espécies florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 6, p. 613-620, jun. 2009.

SMITH, J. L; HALVORSON, J.; PAPENDICK, R. I. Variable indicator Kriging: a procedure for integrating soil quality indicators. In: DORAN, J. W.; COLEMAN, D. C.; BEZDICEK, D. F.; STEWART, B. A. (Ed.). **Defining soil quality for a sustainable environment.** Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 107-124. (Special Publication number, 35).

SMITH, J. L.; PAUL, E. A. The significance of soil microbial biomass estimations. In: BOLLAG, J.; STOTZKY, D. G. (Ed.). **Soil biochemistry**. New York: M. Dekker, 1990. v. 6. p. 357-396.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAEE, F. L. High diversity in DNA soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 782-787, 1990.

TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: ALVAREZ, V. H; SCHAEFER, C. E. G. R; BARROS, N. F.; MELLO, J. W. V.; COSTA, L. M. (Ed.). **Tópicos em Ciência do Solo.** Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002. p. 195-276. v. 2.

TRASAR-CEPEDA, C.; LEIRÓS, M. C.; GIL-SOTRES, F.; SEOANE, S. Towards a biochemical quality index for soils: an expression relating several biological and biochemical properties. **Biology and Fertility of Soils**, v. 26, p. 100-106, 1998.

TRASAR-CEPEDA, C.; LEIRÓS, M. C.; SEOANE, S.; GIL-SOTRES, F. Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p. 1867-1875, 2000.

TURCO, R. F.; KENNEDY, A. K.; JAWSON, M. D. Microbial indicators of soil quality. In: DORAN, J. W.; COLEMAN, D. C.; BEZDICEK, D. F.; STEWART, B. A. (Ed.). **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 107-124. (Special Publication number, 35).

VAN BRUGGEN, A. H. C.; SEMENOV, A. M. In: Search of biological indicators for soil health and disease suppression. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 13-24, 2000.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, p. 703-707, 1987.

WARD, D. M.; WELLER, R.; BATESON, M. M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microrganisms in a natural community. **Nature,** v. 345, p. 63-65, 1990.

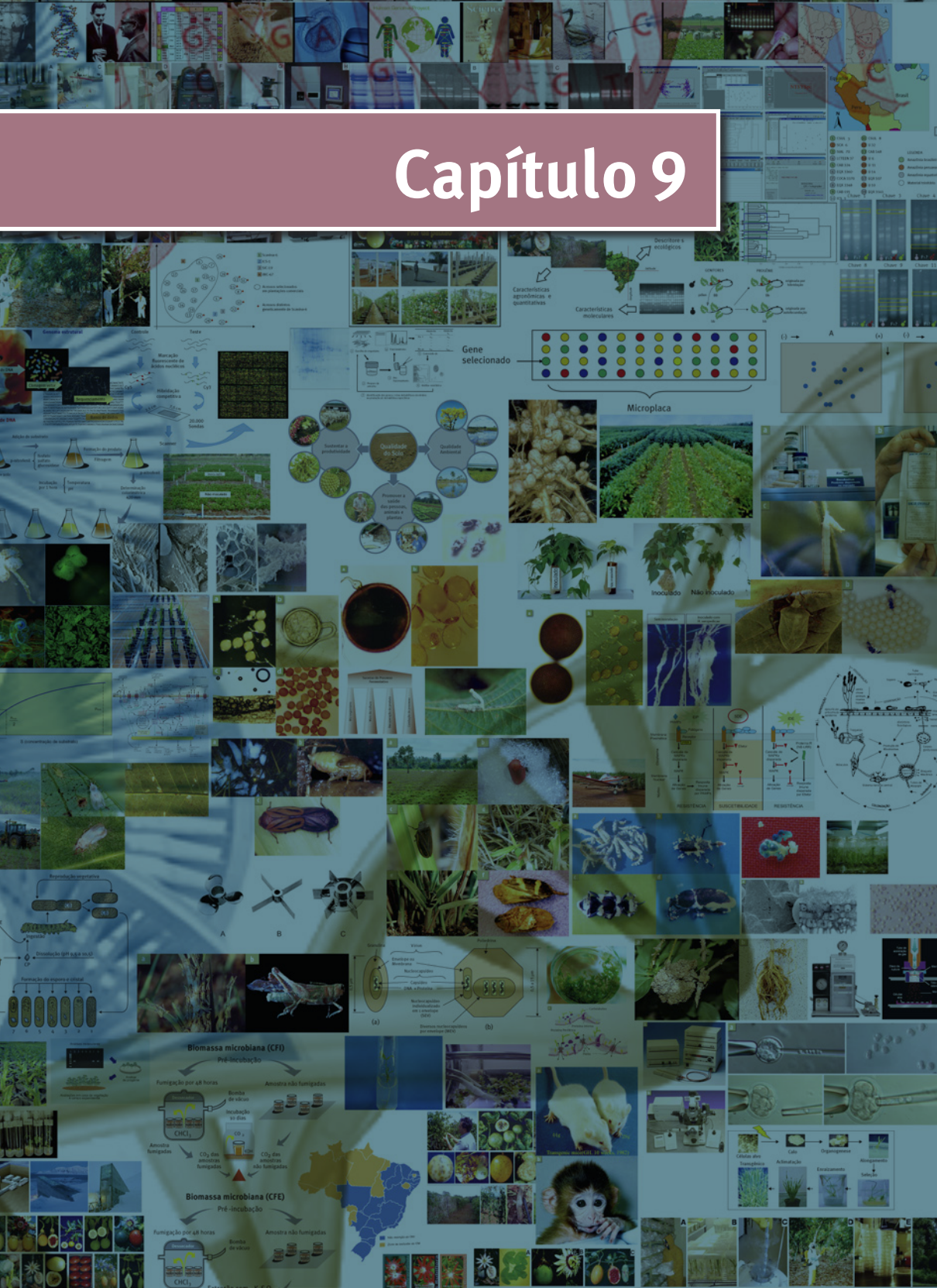
WARDLE, D. Metodologia para quantificação da biomassa microbiana do solo. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília, DF: EMBRAPA-CNPAF, 1994. p. 419-436. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 46).

WIENHOLD, B. J.; ANDREWS, S. S.; KARLEN, D. L. Soil quality: a review of the science and experiences in the USA. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 26, p. 89-95, 2004.

WYMORE, A. W. **Model-Based systems engineering: An Introduction to the mathematical theory of discrete systems and to the tricotyledon theory of system design**. Boca Raton: CRC, 1993.

ZIBILSKE, L. M. Carbon mineralization. In: WEAVER, R. W.; SCOTT, A.; BOTTOMLEY, P. J. (Ed.). **Methods of soil analysis**: microbiological and biochemical properties. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 836-864. (Special Publication, 5).

Capítulo 9


Gene selecionado
Microplaca
Inoculado
Não inoculado
Biomassa microbiana (CFI)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas
Biomassa microbiana (CFE)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas

Fixação biológica de nitrogênio: uma revolução na agricultura

Fábio Bueno dos Reis Junior
Iêda de Carvalho Mendes
Veronica Massena Reis
Mariangela Hungria

Introdução

Entre os nutrientes minerais essenciais às plantas, o nitrogênio (N) é o mais caro, o que consome mais energia para sua produção e, potencialmente, o mais poluente, sendo geralmente o mais limitante à produção vegetal (HUNGRIA et al., 2007). No entanto, no Brasil, o uso do nitrogênio é bem menor quando comparado a outros países, o que se deve, em parte, à utilização e busca por sistemas produtivos que se beneficiem da fixação biológica do nitrogênio (FBN).

A FBN é considerada, após a fotossíntese, o mais importante processo biológico do planeta, sendo fundamental para vida na terra. É baseada no fato de que alguns microrganismos especiais, conhecidos como microrganismos fixadores de N_2, também chamados de diazotróficos, são capazes de quebrar a tripla ligação que une os dois átomos de nitrogênio atmosférico (N_2), transformando-o em amônia, que é assimilável pelas plantas. Se a associação entre esses microrganismos e as plantas for eficiente, o N fixado pode suprir quase todas as necessidades do vegetal, dispensando o uso de fertilizantes nitrogenados e oferecendo, assim, vantagens econômicas e ecológicas.

O exemplo mais conhecido consiste na simbiose de bactérias da ordem Rhizobiales, denominadas corriqueiramente como rizóbios, com plantas da família Leguminosae. Nesse caso, as bactérias diazotróficas se associam simbioticamente às plantas, formando estruturas especializadas nas raízes chamadas nódulos, nos quais ocorre o processo de FBN. Ainda nos nódulos, à amônia sintetizada são rapidamente incorporados íons hidrogênio (H^+), abundantes nas células das bactérias, ocorrendo a transformação em íons amônio (NH_4^+) que

serão, então, distribuídos para a planta hospedeira e incorporados em diversas formas de N orgânico, como os ureídos, aminoácidos e amidas (HUNGRIA et al., 2007).

Não são apenas as plantas da família das leguminosas que se beneficiam da FBN. Estudos iniciados na década de 1970 têm mostrado que valores de 10% a 60% do N acumulado na planta também podem ser provenientes do nitrogênio atmosférico em milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), algumas gramíneas forrageiras e outras não leguminosas. O N proveniente da FBN nessas plantas seria derivado, principalmente, de associações com bactérias diazotróficas localizadas na região rizosférica, ou até mesmo dentro dos tecidos das raízes, colmos e folhas das plantas (bactérias endofíticas). São conhecidas várias espécies de bactérias associadas a não leguminosas, como exemplo, podemos citar aquelas pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter*.

Fixação biológica de nitrogênio na soja

Das leguminosas produtoras de grãos, a soja é a de maior importância econômica e a que recebe maior contribuição da FBN (Figura 1). Para a produção de uma tonelada de grãos de soja, com 6,5% de N, são necessários, pelo menos, 80 kg de N (grãos + parte vegetativa). Considerando-se a produtividade média de 2.661 kg/ha (CONAB, 2009), são necessários cerca de 200 kg de N por hectare. Resultados experimentais indicam que a FBN contribui com cerca de 85% do N total acumulado, somado ao N existente no solo, que é absorvido pela planta. Consequentemente, a FBN contribuiu com 170 kg de N/ha, correspondentes a 378 kg de uréia/ha, pois esse fertilizante contém 45% de N. Com o preço da uréia a U$ 600,00/ton (cotação em junho de 2009), seriam gastos, portanto, U$ 4,9 bilhões para a utilização de uréia nos 21,6 milhões de hectares cultivados com soja no Brasil (CONAB, 2009). Contudo, como a eficiência de utilização do fertilizante nitrogenado é, em média, de apenas 50%, devido à imobilização microbiana e a possíveis perdas por volatilização de amônia, lixiviação e desnitrificação, por exemplo, essa economia pode atingir até U$ 9,8 bilhões/ano. Isso mostra que, além dos trabalhos de melhoramento, que resultaram no lançamento de cultivares de alta produti-

vidade adaptadas aos trópicos, a viabilidade econômica da cultura da soja, no Brasil, deve-se também à ação desses microrganismos que trabalham de graça para o agricultor.

Foto: Mariangela Hungria

Figura 1. Nódulos nas raízes de soja (*Glycine max* (L.) Merr.). Dentro dos nódulos, ocorre o processo de fixação biológica de N_2, pela ação do complexo enzimático da nitrogenase, responsável pela redução do N_2 atmosférico em amônia.

Fonte: Hungria et al., (2007) .

No início da expansão da cultura da soja no Brasil, nossos solos não possuíam população estabelecida de rizóbios capazes de formar uma simbiose eficaz com essas plantas e a qualidade dos inoculantes era sofrível. Nos anos 1970, no antigo Instituto de Pesquisas Agropecuárias do Centro Sul (IPEACS), hoje Embrapa Agrobiologia, a estirpe de *Bradyrhizobium elkanii* 29W (=Semia 5019) foi isolada e inicialmente testada em diversos trabalhos de seleção e adaptação de estirpes de rizóbio (DE-POLLI et al., 2008). Esses trabalhos foram muito importantes para que o grupo de pesquisadores da Embrapa

Cerrados, em trabalho conjunto com a UFRGS, selecionasse essa estirpe para utilização em inoculantes comerciais para soja (PERES; VIDOR, 1980). Em 1980, além da SEMIA 5019, outra estirpe de *B. elkanii*, a Semia 587, também foi selecionada (VARGAS; SUHET, 1980). Com a inclusão dessas duas estirpes nos inoculantes comerciais, foi possível viabilizar o cultivo da soja no Cerrado brasileiro sem o uso de fertilizantes nitrogenados e com produtividade semelhante a obtida na região Sul à época. Treze anos depois do lançamento das estirpes Semia 5019 e Semia 587, grande parte das áreas plantadas com soja já tinha sido inoculada e apresentavam população estabelecida de *Bradyrhizobium*, mas a continuidade dos trabalhos culminou com o lançamento, em 1993, de duas estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, a CPAC-7 (=Semia 5080) e a CPAC-15 (=Semia 5079), que se mostraram mais eficientes que as estirpes lançadas anteriormente (PERES et al., 1993). Ainda, hoje, são essas as quatro estirpes recomendadas para o inoculante comercial de soja no Brasil (Figura 2).

Foto: Milton Alexandre Teixeira Vargas

Figura 2. Ensaio conduzido em área de primeiro cultivo de soja, comparando plantas não inoculadas (primeiro plano) com plantas inoculadas com estirpes eficientes (segundo plano).

Fonte: Hungria et al., (2007).

Quando a soja começou a ser cultivada havia o temor, por parte dos agricultores, de que somente a inoculação não seria suficiente

para suprir todo o nitrogênio necessário para alcançar boas produtividades. No entanto, várias pesquisas realizadas na década de 1980 demonstraram que, utilizando-se um inoculante de boa qualidade, a prática da adubação nitrogenada na semeadura da soja era totalmente desnecessária (VARGAS; SUHET,1980; VARGAS et al., 1982). Mais recentemente, outros estudos confirmaram que não há a necessidade da utilização de doses de "arranque" de adubo nitrogenado na semeadura, visando superar possíveis problemas relacionados à imobilização do N mineral do solo e (ou) à competição inicial com ervas daninhas, tanto em áreas de plantio direto quanto de plantio convencional (HUNGRIA et al. 1997; MENDES et al., 2003). No entanto, o lançamento de cultivares com tetos mais elevados de produtividade e resultados de pesquisa obtidos nos Estados Unidos evidenciando resposta da soja inoculada à aplicação tardia de nitrogênio no pré-florescimento e no início do enchimento de grãos voltaram a gerar dúvidas sobre a necessidade de adubar a soja brasileira com nitrogênio. Diante disso, uma série de experimentos foi conduzida nos últimos anos pela Embrapa Cerrados e pela Embrapa Soja, reforçando, mais uma vez, os benefícios econômicos que resultam da substituição dos fertilizantes nitrogenados pela inoculação com rizóbio e indicando que não existe razão para a utilização desses insumos em nenhum estágio do cultivo da soja no Brasil (HUNGRIA et al., 2006a; HUNGRIA et al., 2006b; MENDES et al., 2008).

Outra questão importante e que geralmente é motivo de debates trata da necessidade de reinoculação, ou seja, a inoculação de áreas que já foram inoculadas anteriormente. Quanto a essa questão, os resultados de pesquisa têm mostrado que é vantajoso inocular as áreas de produção de soja a cada safra e que os incrementos médios na produção de grãos giram em torno de 8% (HUNGRIA et al. 2006a).

Considerando-se todos os benefícios advindos dos estudos brasileiros em FBN, e que o potencial genético de rendimento da soja é de 8 mil quilos por hectare (SPECHT et al., 1999), as abordagens de pesquisa devem priorizar a realização de projetos que permitam o aprimoramento contínuo desse processo. Assim, deve-se garantir que as novas cultivares de soja estabeleçam simbioses altamente eficazes no processo de FBN (NICOLÁS et al., 2006), inclusive no caso de mate-

riais transgênicos. Em relação às estirpes, o bem sucedido programa de seleção deve continuar, mas acelerado pelo uso de marcadores moleculares (BARCELLOS et al., 2007). Estudos de ecologia dos rizóbios também devem ser complementados, uma vez que taxas elevadas de recombinação gênica e de transferência horizontal de genes, entre estirpes inoculantes e rizóbios nativos, foram observadas em nossos solos (BARCELLOS et al., 2007; BATISTA et al., 2007), e podem afetar, no futuro, as respostas à inoculação. Finalmente, é necessário dar continuidade ao desenvolvimento e à validação de novos inoculantes e tecnologias de inoculação, dos quais se pode citar como exemplo a inoculação no sulco, para a compatibilização com o tratamento de sementes com fungicidas e o enriquecimento das sementes em molibdênio (CAMPO et al., 2002). É fundamental o contínuo aprimoramento das pesquisas em fixação biológica do nitrogênio para que se evite a necessidade futura de adubação suplementar com nitrogênio na cultura da soja.

Fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro

Principal fonte de proteínas para a população brasileira, o feijoeiro é uma planta que também se beneficia do processo da FBN (Figura 3). Em relação à filogenia das bactérias capazes de nodular o feijoeiro, até 1984 estava definida uma única espécie, *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli (JORDAN, 1984). Contudo, com o avanço nas técnicas de biologia molecular, foi possível definir mais quatro novas espécies e biovares: *R. tropici* tipo IIA e IIB (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991), *R. etli* bv. phaseoli (SEGOVIA et al., 1993), *R. gallicum* (bv. phaseoli e bv. gallicum) e *R. giardinii* (bv phaseoli e bv. giardinii) (AMARGER et al., 1997). Estirpes pertencentes a outros gêneros, como *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*, bem como estirpes sem posição taxonômica conhecida, podendo representar novas espécies, também têm capacidade de formar nódulos em associação com o feijoeiro (GRANGE; HUNGRIA, 2004).

Ao contrário da soja, existem estirpes de rizóbio nativas nos solos brasileiros capazes de nodular o feijoeiro (MERCANTE et al., 1998; STRALIOTTO et al., 1999; ANDRADE et al., 2002; GRANGE et al., 2007) e que, geralmente, são de baixa eficiência fixadora (GRANGE

et al., 2007). Essa presença nos solos brasileiros de estirpes nativas capazes de nodular o feijoeiro é um dos principais motivos que podem prejudicar o sucesso da inoculação. Vargas et al. (2000) observaram que o cultivo sucessivo do feijoeiro em uma mesma área favoreceu o aumento de populações nativas dessa bactéria, capazes de competir com as estirpes selecionadas, introduzidas através da inoculação. Dessa forma, observa-se a importância da seleção de estirpes que, além de elevada eficiência fixadora, também possuam uma maior capacidade competitiva e de estabelecimento nos solos cultivados. Entre outros fatores limitantes para um bom desempenho das plantas inoculadas, podem ser citados a susceptibilidade do feijoeiro ao estresse hídrico (PERES et al., 1994), a variabilidade de resposta das diferentes cultivares à inoculação (DÖBEREINER; RUSCHEL, 1961; PERES et al., 1994) e a instabilidade genética de algumas estirpes devido a ocorrência de rearranjamentos genômicos e a perda de plasmídeos (HUNGRIA; ARAUJO, 1995).

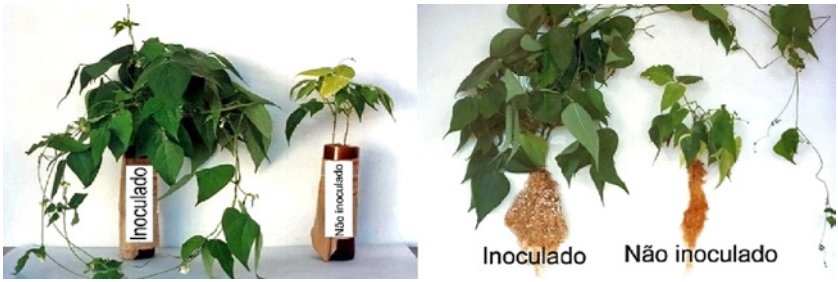


Foto: José Roberto Rodrigues Peres

Figura 3. Resultados da inoculação do feijoeiro com rizóbio sob condições controladas em casa de vegetação.

Fonte: Mendes et al., (2007) .

Por todas essas razões, a resposta do feijoeiro à inoculação, em condições de campo, tem apresentado resultados que variam em função do solo, da cultivar e do histórico de cultivo da área (Figura 4). Ausências de respostas à inoculação foram observadas na década de 1980, por Pereira et al. (1984) e Ramos e Boddey (1987). Entretanto, sob condições irrigadas, em um solo Gley Humico de várzea sem populações nativas de rizóbio, Mendes et al. (1994) reportaram ganhos

de até 1,5 mil quilos por hectare em relação à testemunha não inoculada em cultivares responsivas à inoculação (esses ganhos foram semelhantes aos obtidos com 100 kg N/ha). Peres et al. (1994) observaram, sob condições de sequeiro, em latossolos de Cerrado de primeiro cultivo de feijoeiro, ou seja, apresentando baixas populações nativas de rizóbios, que as respostas em termos de ganhos médios de produtividade foram menores que as obtidas sob condições irrigadas e variaram de 63 a 290 kg/ha, em relação aos tratamentos sem inoculação (médias de três anos de experimentação). Hungria et al. (2003) obtiveram, no Paraná, respostas expressivas a inoculação, com ganhos médios, em seis experimentos, de 450 kg grãos/ha, utilizando as estirpes de *R. tropici* CPAC H12 e CPAC H20. As produtividades obtidas com a inoculação foram comparadas a das plantas que receberam 60 kg de N/ha.

Foto: Iêda de Carvalho Mendes

Figura 4. Diferenças entre plantas inoculadas e plantas não inoculadas, em condições de campo.

Fonte: Mendes et al. (2007)

Os trabalhos com *R. tropici* dentro dos programas de seleção de estirpes conduzidos no Brasil são baseados no fato de que essa espécie apresenta maior tolerância à acidez e a temperaturas elevadas,

assim como maior estabilidade genética em comparação com outras espécies que nodulam o feijoeiro (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991; HUNGRIA et al. 1993, 2000, 2003; MICHIELS et al., 1994). Atualmente, três estirpes são autorizadas para a fabricação de inoculante comercial no Brasil, a Ciat 899 (=Semia 4077), isolada pelo Ciat, na Colômbia; a PRF 81(=Semia 4080), isolada no Paraná pelo Iapar e pela Embrapa Soja, e que permitiu ganhos de até 906 kg/ha em relação ao controle não-inoculado (Hungria et al, 2000); e a CPAC H-12 (=Semia 4088), isolada no Distrito Federal (MOSTASSO et al., 2002; HUNGRIA et al., 2003).

Embora várias pesquisas realizadas no Brasil tenham mostrado respostas expressivas à inoculação do feijoeiro em condições de campo, o nível de adoção dessa tecnologia, especialmente entre os agricultores familiares, é ainda muito baixo. Na safra 2006/2007 (feijão das águas), a inoculação do feijoeiro foi testada em 11 lotes de assentados da reforma agrária, em Unaí, MG (MENDES et al., 2007). Foi observado que, na média, em relação ao tratamento controle não inoculado, a produtividade do feijão com inoculação aumentou em 209 kg/ha para a cultivar Requinte (grupo do feijão carioca) e em 128 kg/ha para a cultivar Diamante Negro (grupo do feijão preto). Na cultivar Requinte, o rendimento obtido com 120 kg de ureia (858 kg/ha) foi semelhante ao obtido com a inoculação (875 kg/ha). Já na cultivar Diamante Negro, o rendimento obtido com a uréia (934 kg/ha) foi maior. Entretanto, é importante destacar que o custo do adubo nitrogenado na safra 2006/2007 foi de R$ 90,00, enquanto o custo do inoculante foi de R$ 6,00. Para o pequeno agricultor, essa diferença de preços é muito significativa, principalmente em se tratando do cultivo do feijão das águas onde fatores climáticos podem afetar o desempenho da cultura. Ou seja, em alguns casos, o ganho com a inoculação pode ser menor que o ganho obtido com o adubo nitrogenado, mas, como o inoculante custa menos, o risco associado ao seu uso também é menor, principalmente nos casos em que as chances de ocorrer quebras de produção por fatores adversos são elevadas.

Pode-se afirmar que FBN nessa cultura é realmente importante, pois se estima que mesmo as estirpes nativas possam contribuir com até 40% do N presente na planta. A adoção da técnica de inoculação

com estirpes selecionadas pela pesquisa, aliada ao uso de cultivares melhoradas, técnicas de manejo integrado de pragas e doenças e de correção e adubação do solo poderão, no mínimo, duplicar a média de produtividade nacional a um baixo custo para o agricultor.

Fixação biológica de nitrogênio em outras leguminosas

Ainda na família das leguminosas, as espécies forrageiras, arbustivas e arbóreas, fixadoras de nitrogênio, assumem papéis importantes, seja na produção de alimentos, ou na produção de forragem, madeira, lenha, carvão e na recuperação de áreas degradadas, entre outros.

Diversas leguminosas produtoras de grãos utilizados na alimentação humana, que se beneficiam da FBN, ainda podem ser citadas. O feijão-caupi ou feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) é um desses exemplos. Sendo um componente importante dos sistemas de produção da região semiárida brasileira, essa cultura, geralmente, apresenta baixos níveis de FBN quando noduladas por estirpes nativas. Recentemente, porém, a seleção de estirpes eficientes e adaptadas às condições regionais culminou com o lançamento da estirpe BR 3267, que possibilitou incrementos de produtividade de até 40% em condições experimentais e de até 52% nas áreas de agricultores experimentadores (RUMJANEK et al., 2006).

Trabalhos conduzidos na década de 1980, por exemplo, demonstraram que a ervilha poderia ser cultivada sem a utilização de adubos nitrogenados, quando inoculada com estirpes selecionadas de *Rhizobium leguminosarum* biovar viceae. Nesses trabalhos, os ganhos com a inoculação variaram de 63% a 240% em relação à testemunha. O rendimento de grãos das plantas inoculadas atingiu valores de até 3.500 kg/ha e foram iguais ou superiores aos obtidos com a utilização de 80 kg de N fertilizante/ha (VARGAS et al., 1994).

A resposta da lentilha à inoculação, principalmente em solos onde não existe população estabelecida de *R. leguminosarum* biovar viceae, foi demonstrada nos trabalhos de Khumar et al. (1988) e Bhattacharyya e Sengupta (1981). No Brasil, isolados de *Rhizobium* obtidos em solos de Cerrados anteriormente cultivados com lentilha, foram seleciona-

dos e apresentaram alto potencial de fixação de N_2 (VARGAS et al., 1994). Além de propiciar menor custo de produção, a inoculação promoveu ganhos adicionais de até 873 kg/ha de grãos em relação ao tratamento com 60 kg N-fertilizante/ha (VARGAS et al., 1994).

Outros estudos mostraram o potencial das plantas de grão-de-bico para obtenção de quantidades significativas de N via FBN. Em avaliações de quantificação da FBN, utilizando os métodos de diluição isotópica de ^{15}N ou abundância natural de ^{15}N, Doughton et al. (1995) afirmaram que essas plantas podem obter mais de 100 kg de N/ha. A seleção de estirpes de *Rhizobium* que se associam com essas plantas pode ser uma estratégia interessante visando uma maior eficiência da FBN. No trabalho de Cleyet-Marel et al. (1990), foram demonstradas diferenças entre estirpes de bactéria quanto à habilidade de fornecer N para as plantas.

Em relação ao uso de leguminosas forrageiras, por exemplo, dados experimentais indicam que pastagens com uma composição botânica contendo, aproximadamente, 30% de leguminosas consorciadas com gramíneas seriam suficientes para manter a produtividade vegetal e animal, assim como a fertilidade do solo no longo prazo (THOMAS, 1992; CADISH et al., 1994). Além de incorporarem N, fixado simbioticamente, as leguminosas ainda contribuem efetivamente para a produção e sustentabilidade dos sistemas de pastejo, especialmente em regiões com limitações ambientais. Diversos trabalhos com pastagens consorciadas mostram sua superioridade quando comparadas às pastagens puras de gramíneas. Em um estudo realizado em área de Cerrado, no consórcio de *Brachiaria ruziziensis* com a leguminosa forrageira *Stylosantis guianenensis*, a produção vegetal e animal da pastagem consorciada foi bem superior à da pastagem em monocultura (AYARZA et al., 1997). Zimmer e Correa (1993) também mostraram o efeito positivo da consorciação de leguminosas em pastagens, concluindo que, com a presença da leguminosa em consórcio, dependendo do manejo aplicado, os resultados se equiparam a pastos de gramínea pura adubados com até 100 kg N/ha.

Em condições de solos ácidos e de baixa fertilidade dos Cerrados, as leguminosas que mais têm persistido em consórcio com *Brachiaria* são o *Calopogonium muconoides*, *Stylosanthes guianensis*

cvs. Bandeirante e Mineirão, *S. macrocephala* cv. Pioneiro e *Arachis pintoi* (VALLE et al., 2000). Infelizmente, apesar de todos os resultados positivos, na prática o uso da consorciação continua sendo pouco significativo. Em geral, o fracasso na utilização de pastagens consorciadas é atribuído à falta de persistência das leguminosas nas pastagens, exigência de melhor manejo que pastagens de gramíneas puras, necessidade de solos mais férteis, susceptibilidade a doenças provocadas por fungos e nematoides ou, ainda, pelas leguminosas não se adaptarem às regiões de implantação.

A utilização de leguminosas arbóreas nos programas de recuperação de áreas degradadas é outro exemplo de sucesso onde a FBN tem papel de destaque. O uso de leguminosas nativas ou introduzidas, como *Acacia* spp., *Albizia* spp. e *Mimosa* spp., entre outras, em associação com bactérias diazotróficas selecionadas pela pesquisa e fungos micorrízicos, tem sido preconizado para a revegetação de solos depauperados, com o objetivo de restabelecer sua fertilidade (FRANCO; FARIA, 1997). A interação entre as plantas e os microrganismos permite um rápido crescimento das espécies tornando-as mais tolerantes aos estresses ambientais (FRANCO; BALIEIRO, 2000), o que propícia um incremento do conteúdo de matéria orgânica e da atividade biológica do solo por meio do aporte de material orgânico via serrapilheira.

Os Beta-Rizóbios

Entre as pesquisas atuais envolvendo a simbiose entre bactérias diazotróficas e leguminosas, devem ser citados os estudos que ajudaram a dissolver a velha idéia de que apenas *Rhizobium* e seus relativos poderiam formar nódulos e fixar nitrogênio em associação com essas plantas. Há alguns anos, acreditava-se que as leguminosas eram noduladas, exclusivamente, por membros das α-proteobactérias. Essas bactérias seriam pertencentes a alguns gêneros relacionados à ordem Rhizobiales, o que inclui *Allorhizobium*, *Azorhibium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (YOUNG, 1996). Em estudos recentes, entretanto, um número de outras α-proteobactérias foram mostradas como noduladoras de leguminosas (MOULIN et al., 2002) incluindo estirpes de *Methylobacterium* (SY et al., 2001), *Blastobacter* (VAN BERKUN; EARDLY, 2002) e *Devosia* (RIVAS

et al., 2002). Além disso, também foram descobertos membros das β-proteobactérias em nódulos de leguminosas tropicais e passaram imediatamente a serem conhecidos como os "β-rizóbios" (MOULIN et al., 2002).

Entre os "β-rizóbios", bactérias da espécie *Cupriavidus taiwanensis* foram isoladas de nódulos de *Mimosa pudica* e *M. diplotricha*, nos trabalhos desenvolvidos por Chen et al. (2001) e Verma et al. (2004). Em um trabalho com espécies vegetais coletadas na África do Sul e Guiana Francesa, Moulin et al. (2001) também isolaram, a partir dos nódulos das leguminosas *Aspalathus carnosa* e *Machaerium lunatum*, estirpes de bactérias que pertencem ao gênero *Burkholderia*, incluído na subdivisão β das proteobactérias. Outras estirpes de *Burkholderia* também foram isoladas de nódulos de *Mimosa casta*, *M. pellita*, *M. pudica* e *Abarema macradenia*, no Panamá (BARRET; PARKER, 2005). Chen et al. (2005) apresentaram um estudo em que 20 estirpes isoladas de nódulos de várias espécies de Mimosa na América do Sul foram classificadas como pertencentes ao gênero *Burkholderia* e são intimamente relacionadas com outras espécies nodulantes deste gênero, como *B. caribensis*, *B. phymatum* e *B. tuberum*. Algumas dessas estirpes foram descritas como novas espécies dentro do gênero *Burkholderia*, como *B. mimosarum* e *B. nodosa* (CHEN et al., 2006, 2007). Na Figura 5, são apresentados alguns exemplos que comprovam a existência de simbiose entre as leguminosas do gênero *Mimosa* com os "β-rizóbios".

Foto: Euan Kevin James (Universidade de Dundee)

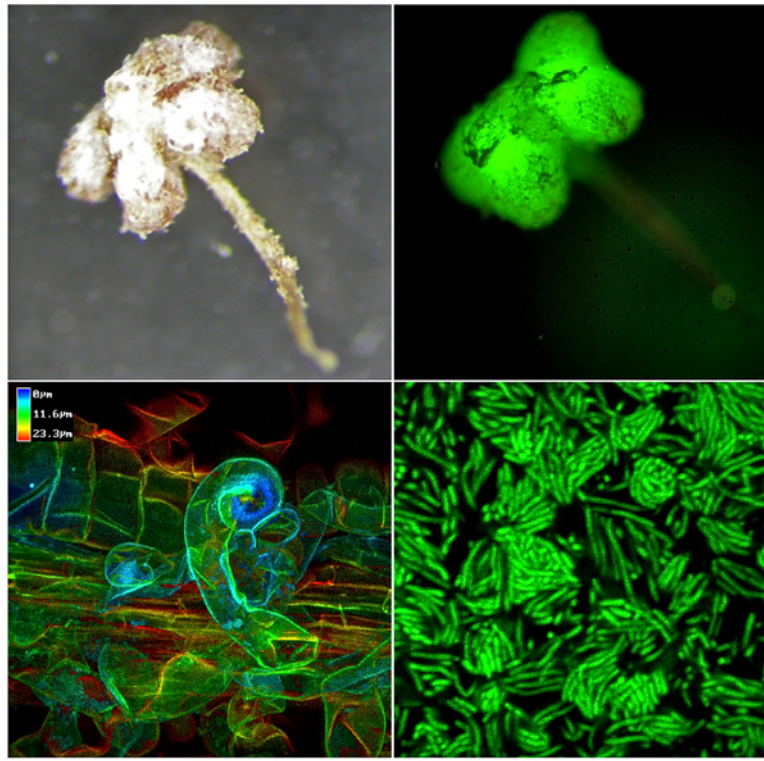


Figura 5. (A) Nódulos de *Mimosa pigra* inoculados com uma estirpe de *Burkholderia* sp. marcada com o gene *gfp* (green fluorescent protein); (B) Nódulos de *Mimosa pigra* inoculados com uma estirpe de *Burkholderia* marcada com o gene *gfp* sob fluorescência; (C) Microscopia Confocal Laser mostrando o início do processo de nodulação (encurvamento do pêlo radicular) *em Mimosa pudica* inoculada com *Cupriavidus taiwanensis*; (D) Microscopia Confocal Laser de bacteróides (*Burkholderia* sp.) expressando o gene *gfp* em nódulo de *Mimosa pellita* .

Fonte: Reis Junior et al.(2006).

Em uma parceria com pesquisadores de diferentes unidades da Embrapa e universidades brasileiras e do Reino Unido, foi desenvolvido um projeto para o estudo da ocorrência e capacidade simbiótica de β-rizóbios associados com plantas nativas pertencentes ao gênero *Mimosa*, do qual o Cerrado é o maior centro de diversidade. Os resul-

tados obtidos até o presente momento indicam que a nodulação nessas plantas é decorrente, em sua grande maioria, da simbiose com bactérias do gênero *Burkholderia* e que a fixação biológica promovida por essa interação, provavelmente, é valiosa para a ciclagem do N no Bioma Cerrado (REIS JUNIOR et al., 2006, 2009).

Na maior parte dos casos, os β-rizóbios foram encontrados em associação com leguminosas da sub-família Mimosoideae. No entanto, novas descobertas sugerem que a nodulação de leguminosas por essas bactérias parece ser muito mais ampla do que era imaginado inicialmente. Como exemplo, nos trabalhos de Garau et al. (2009) e Beukes et al. (2009), foram encontradas bactérias do gênero *Burkholderia* em simbiose com plantas de gêneros diversos, como *Rhynchosia*, *Podalyria*, *Virgilia*, *Cyclopia* e *Hypocalyptus*.

Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas e outras não leguminosas

Diferentemente dos rizóbios em simbiose com leguminosas, as bactérias diazotróficas associadas a gramíneas, entre outras plantas, não formam nódulos e localizam-se preferencialmente na região rizosférica, na superfície das raízes ou até mesmo dentro dos tecidos de raízes, colmos e folhas, quando são conhecidas como bactérias endófitas ou endofíticas (Figura 6). O termo endófito era utilizado, originalmente, referindo-se à colonização interna das raízes por microrganismos (bactérias e fungos) que normalmente não causam danos a planta hospedeira e vivem a maior parte de suas vidas no interior dos tecidos dos vegetais sem promover sintomas de patogenicidade (PEREIRA, 1995). Kloepper e Beauchamp (1992) classificaram como endófitos os microrganismos que colonizavam o interior das raízes e promoviam benefícios as plantas. Döbereiner (1992) estendeu o termo endófito para as bactérias diazotróficas, tendo em vista a habilidade de algumas bactérias de gêneros como *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter* de colonizarem o interior dos vegetais, e apresentarem uma baixa capacidade de sobrevivência no solo.

Fotos: Fábio Bueno dos Reis Junior

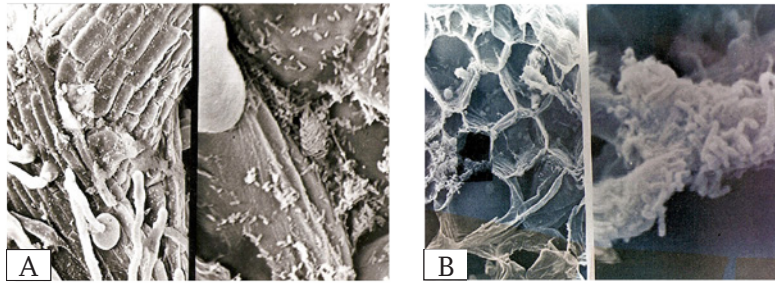


Figura 6. Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura mostrando a colonização de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em uma junção de raiz lateral (A) e nos espaços intercelulares do parênquima cortical (B) de plântulas de cana-de-açúcar .

Fonte: Reis Junior (1998).

A ocorrência de bactérias no interior das plantas assume um caráter ecológico muito importante, já que essas bactérias recebem os nutrientes diretamente no interior do vegetal, sem sofrer estresses ou competição com outros organismos do solo. Além disso, provavelmente, podem colonizar sítios onde o acesso de O_2 é restrito, não tendo assim problemas de inibição da atividade da nitrogenase (complexo enzimático responsável pela FBN, que é sensível ao O_2). Em contrapartida, a bactéria pode prontamente disponibilizar o nitrogênio fixado e outras moléculas promotoras de crescimento para as plantas (DÖBEREINER et al., 1995a; BALDANI et al., 1997). No entanto, a contribuição das bactérias de vida livre no solo ou rizosfera não deve ser subestimada, devido a seu alto número e diversidade encontrados (BALDANI; BALDANI, 2005).

Bactérias diazotróficas associativas, dos mais diferentes gêneros e espécies, têm sido relatadas em associação com um grande número de plantas não leguminosas, tanto em clima tropical como em clima temperado. Diversos estudos têm mostrado que essas bactérias, de ocorrência natural nos solos, podem ser responsáveis por boa parte do N necessário para a nutrição das plantas (BODDEY; DÖBEREINER, 1995).

Além da FBN, a maioria das bactérias diazotróficas em associação com plantas não leguminosas também é conhecida pela sua capacidade de produzir hormônios de crescimento, tais como auxinas, giberelinas e citoquininas (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993;

HARTMANN; ZIMMER, 1994; BASHAN; HOLGUIN, 1997; BASTIÁN et al., 1998; RADWAN et al., 2002). A produção dessas substâncias promotoras de crescimento pode estimular o aumento na densidade de pelos radiculares, da taxa de aparecimento de raízes secundárias e da superfície radicular quando as plantas são colonizadas por essas bactérias (Figura 7). Esse incremento resulta numa melhora da absorção de água e nutrientes aumentando, assim, a capacidade da planta de produzir e suportar estresses ambientais (BALDANI et al., 1983; LIN et al., 1983; KAPULNIK et al., 1985; KAPULNIK et al., 1987).

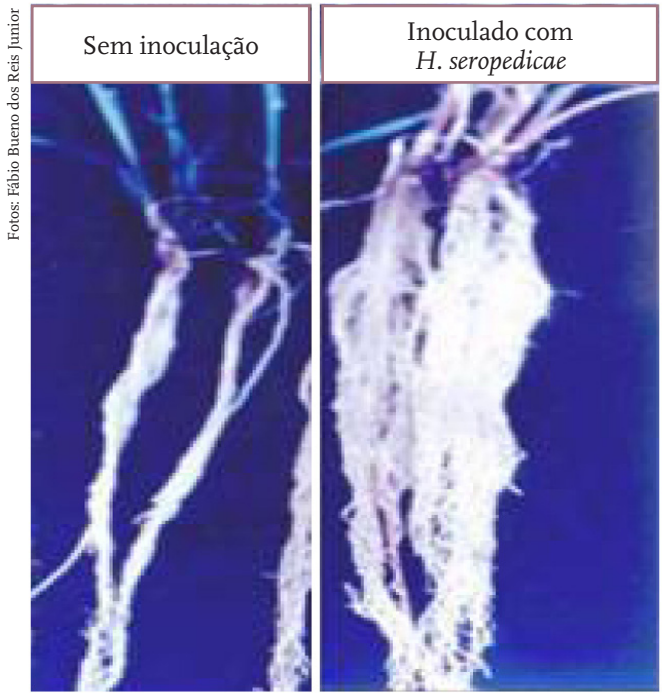


Figura 7. Efeito da inoculação com *H. seropedicae* sobre o desenvolvimento de raízes de plântulas de cana-de-açúcar .

Fonte: Reis Junior (1998).

Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas forrageiras

A primeira associação entre uma gramínea forrageira tropical e bactérias fixadoras de nitrogênio, estudada detalhadamente, foi a descrita entre *Paspalum notatum* e *Azotobacter paspali* (DÖBEREINER; CAMPELO, 1971). Boddey et al. (1983), utilizando a técnica de diluição isotópica de ^{15}N, demonstraram que *P. notatum* cv. Batatais conseguiu obter aproximadamente 10% do seu N (20 kg N/ha/ano) via fixação biológica. Evidências da FBN em outras gramíneas forrageiras continuaram sendo apresentadas, como nos casos de *Cynodon dactylon* (DÖBEREINER; DAY, 1975), *Digitaria decumbens* (DE-POLLI et al., 1977), *Panicum maximum* (MIRANDA et al., 1990) e *Pennisetum purpureum* (QUESADA, 2001), entre outras.

Em *Brachiaria*, mesmo com as observações de perdas de N do solo, existem relatos na literatura indicando que alguns genótipos não apresentam reduções significativas em sua produtividade. Essas perdas de N poderiam estar sendo compensadas pela FBN que, pelos poucos estudos disponíveis, poderia ser responsável pela introdução de 30 a 45 kg de N/ha/ano no sistema solo-planta (BODDEY; VICTORIA, 1986; LOUREIRO; BODDEY, 1988). Os estudos para a quantificação da FBN efetuados por Boddey e Victoria (1986) demonstraram que as espécies *B. decumbens* e *B. humidicola* receberam uma quantidade de N via FBN bem mais significante que aquelas apresentadas por *B. radicans* e *B. ruziziensis*. Os resultados de Loureiro e Boddey (1988) também sugerem uma maior contribuição da FBN para a espécie *B. humidicola*.

Embora esses estudos tenham mostrado que as contribuições da FBN não ultrapassaram 30% a 40% do N acumulado pelas plantas, é possível que, para sistemas de manejo mais extensivos onde as vias de perdas são menos expressivas, a quantidade de N fixado seja suficiente para proporcionar um balanço nulo ou até positivo de N para o sistema solo-planta e com isso permitir uma maior longevidade da pastagem com uma produtividade em nível aceitável.

Fixação biológica de nitrogênio na cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar com, aproximadamente, nove milhões de hectares cultivados e produção anual girando em torno de 690 milhões de toneladas (IBGE, 2009). Essa cultura é altamente exigente em N e, para alcançar uma produtividade de 100 Mg de colmos por ha, acumula em sua parte aérea 120 a 250 kg de nitrogênio (XAVIER, 2002). Resultados de pesquisa mostram que até 60% do N exigido pela cultura pode ser oriundo da FBN (BODDEY et al., 2001; POLIDORO et al., 2001), valor esse que é dependente do genótipo da planta, de sua interação com bactérias diazotróficas e características edafoclimáticas das áreas de plantio. Já na década de 1950, a pesquisadora da Embrapa, Dra. Johanna Döbereiner, havia isolado algumas espécies de bactérias diazotróficas associadas à cana (DÖBEREINER, 1961). O avanço desses estudos permitiu que, hoje, sejam conhecidas diversas espécies de bactérias, pertencentes a gêneros distintos, com destaque para *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Burkholderia*.

Boddey (1995) sugere que a característica de obtenção de significativas contribuições da FBN, presente em variedades brasileiras de cana-de-açúcar, pode ser devida aos processos de melhoramento e seleção feitos sob condições de baixa disponibilidade de N. Como exemplo, no estudo de Coelho et al. (2003), as variedades do grupo das RBs (RB 739735, RB 758540 e RB 835089) foram as que mais se destacaram, obtendo maior contribuição da FBN. Provavelmente isso se deve ao fato de que essas variedades foram melhoradas em solo com pouco N e, naturalmente, terem sido selecionadas para alta eficiência fixadora.

Algumas medidas também poderiam ajudar a maximizar as contribuições da fixação biológica de nitrogênio para a cultura da cana. Entre essas medidas está a aplicação do micronutriente molibdênio, especialmente em solos ácidos, onde sua disponibilidade é prejudicada (BODDEY et al., 2003). Alguns estudos mostraram resultados onde, mesmo em solos pobres, a FBN pode ajudar a cultura a alcançar produções próximas ao dobro da média atual de produtividade, se os outros nutrientes forem supridos de acordo com as necessidades mostradas pela análise do solo e se a tecnologia for adequada, usando, entre outras, a aplicação de molibdênio e irrigação (URQUIAGA et al., 1998).

Inoculantes de bactérias diazotróficas para não leguminosas

Diante da comprovação de que bactérias diazotróficas associadas a plantas não leguminosas possuíam a capacidade de fixar o N_2 atmosférico e produzir outras substâncias promotoras de crescimento, logo surgiram os primeiros estudos buscando avaliar os benefícios da inoculação dessas plantas com estirpes de bactérias selecionadas pela pesquisa. Avaliações de experimentos com inoculação, feitos principalmente com *Azospirillum*, mostraram que esses organismos são capazes de promover incrementos na produtividade de importantes culturas em diferentes situações de solo e clima. Entre 60% e 70% dos experimentos levantados por Okon e Labandera-Gonzalez (1994) apresentaram resposta positiva à inoculação com *Azospirillum* com aumentos no rendimento estatisticamente significativos na ordem de 5% a 30%. Utilizando a estratégia de combinar a inoculação com a aplicação de fertilizantes nitrogenados, constatou-se a possibilidade de substituição de até 40% da dose recomendada de nitrogênio para a cultura do milho e, no caso do trigo e aveia, até 30% (OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994). Sumner (1990), em outro estudo sobre inoculação de cereais, observou que 32 ensaios apresentaram respostas positivas à inoculação, enquanto outros sete (a maioria com trigo) mostraram resultados negativos na produção de grãos.

Embora ainda não se constitua em prática agrícola consolidada, principalmente no Brasil, inoculantes comerciais contendo *A. brasilense* foram lançados no mercado mundial (OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994). Nos Estados Unidos, um produto com o nome de Azo-Green™ foi produzido pela companhia Genesis Turfs Forages e recomendado para aumentar o vigor da semente, estabelecimento do sistema radicular, resistência a geada e uma melhoria geral da saúde da planta (REIS, 2007). Na Itália, Alemanha e Bélgica foi desenvolvido um produto contendo uma mistura de *A. brasilense* (estirpe Cd) e *A. lipoferum* (estirpe Br17) comercializado na forma de mistura com vermiculita ou em forma líquida. O nome comercial desse produto é Zea-Nit™, produzido pela companhia Heligenetics. Segundo os fabricantes, esse produto reduziria a aplicação do nitrogênio necessário à cultura em 30% a 40% (REIS, 2007). Na França, foi lançado outro produto à base de *Azospirillum*, estirpe CRT1. O

uso desse inoculante, em um experimento com milho na Estação de Agbasar, a nordeste de Togo na África, promoveu aumentos de 100% na produção de grãos (FAGES; MULARD, 1988). No México, foi desenvolvido, pela Universidade de Puebla, um inoculante a base de *Azospirillum* que tem sido usado com sucesso nas culturas de milho trigo e cevada. Ainda no México, a empresa Asia (Assessoria Integral Agropecuária S.A.) comercializa um produto para milho e sorgo e outro para trigo e cevada, contendo uma mistura de estirpes de *A. brasilense* (REIS, 2007). Na Argentina, foi lançado um produto denominado Graminante™, à base de pó de carbonato de cálcio, contendo uma mistura de estirpes de *Azospirillum*. Os fabricantes informam que o produto pode aumentar a produção de grãos em cerca de 20% (REIS, 2007). Na Índia, várias indústrias produzem biofertilizantes contendo *Azospirillum* para diversas culturas e até mesmo *Gluconacetobacter* para cana-de-açúcar (REIS, 2007).

No Brasil, diversos estudos têm mostrado resultados tanto interessantes quanto promissores. No trabalho de Pereira e Baldani (1995), a inoculação de sementes de arroz com *Herbaspirillum seropedicae* promoveu incrementos na produtividade das plantas equivalentes aos obtidos com a dose de 40 kg de N/ha. Guimarães et al. (2000) também mostraram incrementos significativos na produtividade de arroz quando inoculado com *Herbaspirillum*, no entanto as respostas eram dependentes das cultivares avaliadas. Guimarães et al. (2003) mostraram que a inoculação de arroz com a estirpe ZAE 94, de *H. seropedicae,* proporcionou aumento da produção de grãos da variedade Guarani em mais de 50% sob condições de sequeiro, mostrando potencial dessa estirpe como inoculante. A inoculação dessa mesma bactéria em sementes de milho também contribuiu significativamente para o aumento do rendimento de grãos no híbrido BRS 1010, ao passo que na variedade BRS 4157 este efeito não foi observado (ZILLI et al., 2007).

A Embrapa Soja e a UFPR realizaram um trabalho de validação de estirpes de *Azospirillum brasilense* para as culturas do milho e do trigo. Obedecendo a todos os critérios da legislação brasileira para inoculantes, foram testadas e selecionadas as estirpes que apresentaram melhor crescimento e sobrevivência no solo, maior promoção de crescimento das plantas e maior adaptação às tecnologias utilizadas

nessas culturas. Os resultados de ensaios a campo, totalizando cinco safras, foram consistentes e resultaram em incrementos médios de 25% a 30% no rendimento do milho e de 8% a 11% no rendimento do trigo. Seis estirpes de *A. brasilense* comprovaram a eficiência agronômica e passaram a serem autorizadas para a produção de inoculantes comerciais (HUNGRIA et al., 2006c). Como resultado dessa pesquisa, uma grande novidade foi o lançamento e a comercialização do primeiro inoculante para milho do mercado brasileiro. Os fabricantes do Masterfix Gramíneas™, que chegou as lojas na segunda quinzena de julho de 2009, apontam um potencial para economia de até 50% na utilização de fertilizantes nitrogenados industriais (AGROLINK, 2009).

A cana-de-açúcar é naturalmente colonizada por bactérias diazotróficas, no entanto trabalhos recentes têm mostrado o potencial da inoculação dessas plantas com bactérias selecionadas pela pesquisa. Sevilla et al. (2001) mostraram que plantas, quatro meses após terem sido inoculadas com a estirpe padrão de *G. diazotrophicus* (PAL-5), apresentaram produtividade 40% maior que as plantas não inoculadas. Em experimentos de campo onde foram utilizadas misturas com as bactérias *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*, foram observados incrementos de até 24,7% na produtividade e 31,4% na produção de matéria seca das plantas inoculadas, que também obtiveram até 42,7% do N acumulado proveniente da fixação biológica, dependendo do tipo de solo, do genótipo da planta e da combinação de bactérias utilizada como inoculante (OLIVEIRA et al., 2006).

Diante da persistência dos efeitos benéficos da inoculação observada por Oliveira et al. (2006), os autores desse trabalho foram estimulados a levar em consideração a recomendação dessa tecnologia para uso futuro pelos produtores de cana brasileiros. Como desdobramento dos resultados alcançados nesse estudo, a Embrapa Agrobiologia lançou, em maio de 2008, o inoculante desenvolvido para a cultura da cana-de-açúcar. Por enquanto, o produto vem sendo utilizado em áreas experimentais e avaliado em usinas produtoras de álcool e açúcar espalhadas pelo País. A princípio, a utilização da inoculação tem como principal impacto a substituição de parte do N utilizado na cana de

primeiro ano. Os resultados têm mostrado que, com o uso do inoculante, cerca de 30 kg de N/ha/ano podem deixar de ser aplicados. As estirpes de bactérias que fazem parte do inoculante já foram repassadas para quatro empresas que se mostraram interessadas e participaram de edital para o desenvolvimento do produto comercial (REIS JUNIOR; REIS, 2009).

Apesar dos resultados animadores, a utilização de inoculantes contendo essas bactérias como uma prática usual na agricultura requer análise crítica cuidadosa devido à alta variabilidade observada, geralmente, na resposta de plantas de diferentes genótipos sob condições edafoclimáticas distintas (OLIVEIRA et al., 2006). Sabe-se que as associações ocorrem em diferentes graus de interação e, em muitos casos, estão relacionadas à especificidade das características genéticas dos microrganismos e da planta hospedeira (BASHAN; HOLGUIM, 1997). De fato, as razões para a variabilidade de resposta da FBN em gramíneas ainda não foram completamente elucidadas. Tem sido sugerido que a interação genótipo da planta e ambiente exerça um papel decisivo sobre a eficiência do diazotrófico (GYANESHWAR et al., 2002). Essas diferenças entre genótipos em relação à FBN mostram um grande potencial para a sua melhor exploração através de melhoramento vegetal.

Considerações finais

Além da inegável importância econômica, é muito importante a busca por uma melhor eficiência de uso dos fertilizantes nitrogenados industriais para evitar ao máximo suas perdas por lixiviação e (ou) transformações para formas gasosas, que contribuem para a poluição de cursos e mananciais de água, a degradação da camada de ozônio e o aquecimento global. Nesse contexto, a exploração e a utilização da FBN em sistemas agrícolas visando à substituição ou, ao menos, a complementação do N fornecido por meio de fertilizantes industriais é uma estratégia fundamental.

Programas de melhoramento de plantas contando com equipes formadas por especialistas de diversas áreas, com ênfase na busca por genótipos capazes de suprir suas necessidades em N, principalmente por meio da associação com bactérias diazotróficas, poderiam trazer

grande contribuição. Com os resultados recentes de mapeamento dos genomas de plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio, espera-se que o conhecimento gerado possa incrementar o entendimento dessas associações, consequentemente, abrindo caminho para uma melhor exploração de seu potencial.

O investimento na pesquisa e difusão da FBN, por meio de estudos multidisciplinares e integrados, em áreas como microbiologia, ciência do solo, melhoramento de plantas, manejo de culturas, etc., pode trazer um grande benefício para o planeta, aumentando a produção de alimentos, reduzindo o uso de combustíveis fósseis e a contaminação dos recursos hídricos, proporcionada pela diminuição do uso de fontes externas de fertilizantes nitrogenados.

Referências

AGROLINK. **Primeiro inoculante para arroz e milho é lançado no mercado**. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/sementes/NoticiaDetalhe.aspx?codNoticia=94052>. Acesso em: 29 jul. 2009.

AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov.and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 996-1006, 1997.

ANDRADE, D. S.; HUNGRIA, M. Maximizing the contribution of biological nitrogen fixation in tropical legume crops. In: FINAN, T. M.; O´BRIAN, M. R.; LAYZELL, D. B.; VESSEY, J. K.; NEWTON, W. (Ed.). **Nitrogen fixation**: global perspectives. London: CAB International, 2002. p. 341-345.

AYARZA, M.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. **Introdução de** S. guianenesis **cv. Mineirão em pastagens de** Brachiaria ruziziensis: influência na produção da pastagem e na reciclagem da liteira. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1997. 16 p. (EMBRAPA-CNPAB. Boletim Técnico, 1).

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 549-579, 2005.

BALDANI, V. L .D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 924-929, 1983.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 911-922, 1997.

BARCELLOS, F. G.; MENNA, P.; BATISTA, J. S. S.; HUNGRIA, M. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium* (*Ensifer*) *fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian savannah soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 2635-2643, 2007.

BARRETT, C. F.; PARKER, M. A. Prevalence of *Burkholderia* sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 57-65, 2005.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 103-121, 1997.

BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of 3-idol-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v. 24, p. 7-11, 1998.

BATISTA, J. S. S.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; FERREIRA, M. C.; MENDES, I. C. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a Cerrados soil. **Microbial Ecology**, v. 53, p. 270-284, 2007.

BHATTACHARYYA, P; SENGUPTA, K. Effect of seed inoculation with Rhizobium on grain yield in lentil. **Indian Biology**, v. 14, p. 31-35, 1981.

BEUKES, C. W.; LAW, I. J.; VENTER, S. N.; MALULEKE, M. D.; STEENKAMP, E. T. Indigenous *Hypocalyptus*, *Podalyria*, *Cyclopia* and *Virgilia* species are nodulated by diverse beta-rhizobia. **South African Journal of Botany**, v. 75, n. 2, 2009.

BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in sugar cane: A key to energetically viable biofuel production. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 14, p. 263-279, 1995.

BODDEY, R. M.; CHALK, P. M.; VICTORIA, R. L.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J. The use of the 15N isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum* cv. Batatais. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 1036-1045, 1983.

BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. **Fertility Research**, v. 42, p. 241-250, 1995.

BODDEY, R. M.; POLIDORO, J. C.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Use of 15N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N2 fixation to sugar cane and others grasses. **Australian Journal of Agricultural Research** v. 28, p. 889-895, 2001.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. M. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, p.139-149, 2003.

BODDEY, R. M.; VICTORIA, R. L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with Brachiaria and Paspalum grasses using 15N labelled organic matter and fertilizer. **Plant & Soil**, v. 90, p. 256-292, 1986.

CADISH, G.; SHUNKE, R. M.; GILLER, K. E. Nitrogen cycling in a pure grass pasture and a grass legume misture on a red latossol in Brazil. **Tropical Grassland**, v. 28, p. 43-52, 1994.

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M.; MIURA, L. M.; MORAES, J. Z.; SIBALDELLI, R. N. R.; MESQUITA, C. M. Avaliação de estirpes de *Bradyrhizobium*, inoculantes microbianos e métodos de inoculação em diferentes regiões do Brasil. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; SARAIVA, O. F. (Ed.). **Resultados de pesquisa da Embrapa Soja 2001: microbiologia dos solos**. Londrina: Embrapa Soja, 2002. p. 30-35. (Embrapa Soja. Documentos, 197).

CHEN, W. M.; LAEVENS, S.; LEE, T. M.; COENYE, T.; DE VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1729-1735, 2001.

CHEN, W. M.; FARIA, S. M.; STRALIOTO, R.; PITARD, R. M.; ARAÚJO, J. L. S.; CHOU, J. H.; CHOU, Y. J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A. R.; ELLIOT, G. N.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; JAMES, E. K. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel mimosa-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 7461-7471, 2005.

CHEN, W. M.; JAMES, E. K.; COENYE, T.; CHOU, J. H.; BARRIOS, E.; DE FARIA, S. M.; ELLIOTT, G. N.; SHEU , S. Y.; SPRENT, J. I.; VANDAMME, P. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1847-1851, 2006.

CHEN, W. M.; DE FARIA, S. M.; JAMES, E. K.; ELLIOTT, G. N.; LIN, K. Y.; CHOU, J. H. *Burkholderia nodosa* sp. nov. isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 1055-1059, 2007.

CLEYET-MAREL, J. C.; DI BONITO, R.; BECK, D. P. Chickpea and its root-nodule bacteria: implications of their relationships for legume inoculation and biological nitrogen fixation. **Options Méditerranéennes - Série Séminaires**, n. 9, p. 101-106, 1990.

COELHO, C. H. M.; MEDEIROS, A. F. A; POLIDORO, J. C.; XAVIER, R. P.; RESENDE, A.; QUESADA, D. M.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R.; URQUIAGA, S. Identificação de genótipos de cana-de-açúcar quanto ao potencial de contribuição da fixação biológica de nitrogênio. **Agronomia**, v. 37, p. 37-40, 2003.

CONAB. **Indicadores da Agropecuária**, v. 28, n. 5, maio, 2009,67 p.

DE-POLLI, H.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J.; SALATI, E. Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses by 15N2 incorporation. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 9, p. 119-123, 1977.

DE-POLLI, H.; FRANCO, A. A.; BALDANI, J. I. Agricultura com base em fixação biológica de nitrogênio. In: ALBUQUERQUE, A. C. S.; SILVA, A. G. (Ed.). **Agricultura tropical**: quatro décadas de inovações tecnológicas institucionais e políticas. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informacão Tecnológica, 2008. v. 2. p. 1273-1290.

DÖBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, v. 13, p. 1-13, 1992.

DÖBEREINER, J. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. **Plant and Soil**, v. 15, p. 211-216, 1961.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: FENDRICK, I.; GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; ZAMAROCZY, M. (Ed.). Azospirillum **VI and Related Microorganisms**. Berlin: Springer-Verlag, 1995a. p. 3-14.

DOBEREINEJR, J.; CAMPELO, A. B. Non-symbiotic nitrogen fixing bacteria in tropical soils. In: LIE, T. A.; MULDER, E. G. (Ed.). **Biological nitrogen fixation in natural and agricultural habitats**. [S. l. : S. n.], 1971. p. 457-470. Plant & Soil, special volume.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Nitrogen fixation in the rhizosphere of tropical grasses. In: STEWART, W. P. D. (Ed.). **Nitrogen fixation by free-living micro-organisms**. Cambridge: Cambridge University, 1975. p. 39-56.

DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A. P. **Fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico em feijão (**Phaseolus vulgaris **L.). I- Influência do solo e da variedade**. Rio de Janeiro: Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícola, 1961. 16 p. (IEEA. Comunicado Técnico, 10).

DOUGHTON, J. A.; SAFFIGNA, P. G.; VALLIS, I.; MAYER, R. J. Nitrogen Fixation in Chickpea II. Comparison of 15N enrichment and 15N natural abundance methods for estimating nitrogen fixation. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 46, p. 225-236, 1995b.

FAGES, J.; MULARD, D. Isolement de bactéries rhizosphériques et effect de leur inoculation and pots chez *Zea mays*. **Agronomie**, v. 8, p. 309-315, 1988.

FRANCO, A. A.; BALIEIRO, F. C. The role of biological nitrogen fixation in land reclamation agroecology and sustainability of tropical agriculture. In: ROCHA-MIRANDA, C. E. (Ed). **Transition to global sustainability:** the contribution of Brazilian science. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 2000. p. 209-234.

FRANCO, A. A.; FARIA, S. M. The contribution of N2-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 897-903, 1997.

FUENTES-RAMIRÉZ, L. E.; JIMENEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I. R.; CABALLERO-MELLADO, J. Acetobacter diazotrophicus, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. **Plant and Soil**, v. 154, p. 145-150. 1993.

GARAU, G.; YATES, R. J.; DEIANA, P.; HOWIESON, J. G. Novel strains of nodulating *Burkholderia* have a role in nitrogen fixation with papilionoid herbaceous legumes adapted to acid, infertile soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 41, p. 125-134, 2009.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (Phaseolus vulgaris) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 1389-1398, 2004.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M.; GRAHAM, P. H.; MARTINEZ-ROMERO, E. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate commom bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, p. 867-876, 2007.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas em arroz de sequeiro. **Revista Agronomia**, v. 37, p. 25-30, 2003.

GUIMARÃES, S. L.; SILVA, R. A.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Effects of the inoculation of endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of two rice varieties (guarani and CNA 8305) grown under field conditions. In: PEDROSA, F. O; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W. E (Ed.). **Nitrogen fixation**: from molecules to crop productivity. Dordrecht: Kluwer, 2000. 431 p. (Current Plant Sciences and Biotechnology in Agriculture, 38).

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K. REDDY, P. M.; LADHA, J. Herbaspirillum colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytologist**, v. 154, p. 131-145, 2002.

HARTMANN, A.; ZIMMER, W. Physiology of Azospirillum. In: OKON, Y. (Ed.). **Azospirillum/Plant Associations**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 15-39.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80 p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MANERO, J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia strains. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, p. 1515-1528, 2000.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. Relato da VI reunião de laboratórios para recomendação de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E. L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D. S. (Ed.). **Microbiologia do solo**: desafios para o século XXI. Londrina: Embrapa Soja, 1995. p. 476-489.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, p. 88-93, 2003.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C.; GRAHAM, P. H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in South America. In: SINGH, R. P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P. K. (Ed.). **Nitrogen nutrition in plant productivity**. Houston: Studium Press, 2006a. p. 43-93.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; CRISPINO, C.C.; MORAES, J. Z.; SIBALDELLI, R. N. R.; MENDES, I. C.; ARIHARA, J. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N2 fixation and of N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, n. 4, p. 927-939, 2006b.

HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A.; SPRENT, J. I. New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, v. 149, p. 95-102, 1993.

HUNGRIA, M.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; CAMPO, R. J. Teste de eficiência agronômica de inoculante contendo *Azospirillum* spp. In: RELARE, 13., 2006, Londrina. **Resumos**... Londrina: Embrapa Soja, 2006c.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; CAMPO, R. J.; GALERANI, P. R. **Adubação nitrogenada na soja?** Londrina: Embrapa Soja, 1997. 4 p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 57).

IBGE. **Lavouras**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200905comentarios.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2009.

JORDAN, D. C. Rhizobiaceae Conn 1938. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. p. 235-244.

KAPULNIK, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 881-887, 1985.

KAPULNIK, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y. Yield response of spring wheat cultivars (*Triticum aestivum* and T. turgidum) to inoculation with *Azospirillum brasilense* under field conditions. **Biology and Fertility of Soils**, v. 4, p. 27-35, 1987.

KHUMAR, A.; MALIK, M. K.; AHMAD, N. Effect of mixed culture inoculation of *Rhizobium* and *Azotobacter* on yield, nutrient uptake and quality of lentil in calcareous soil. **Lens Newsletter**, v. 15, p. 21-27, 1988.

KLOEPPER, J. W.; BEAUCHAMP, C. J. A Rewiew of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 1219-1232, 1992.

LIN, W.; OKON, Y.; HARDY, R. W. F. Enhanced mineral uptake by Zea mays and Sorghum bicolor roots inoculated with Azospirillum brasilense. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, p. 1775-1779, 1983.

LOUREIRO, M. F.; BODDEY, R. M. Balanço de nitrogênio em quatro gramíneas do gênero Brachiaria. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 23, p. 1343-1353, 1988.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, E.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P. H.; PARDO, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and Leucaena sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, p. 417-426, 1991.

MENDES, I. C.; REIS JUNIOR, F. B.; HUNGRIA, M.; SOUSA, D. M. G.; CAMPO, R. J. Adubação nitrogenada suplementar tardia em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1053-1060, 2008.

MENDES, I. C.; HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Soybean response to starter nitrogen and *Bradyrhizobium* inoculation on a Cerrado Oxisol under no-tillage and conventional tillage systems. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 81-87, 2003.

MENDES, I. C.; REIS JUNIOR, F. B.; MORAES, C. B.; HUNGRIA, M. **Inoculação do feijoeiro em Unaí, MG:** cartilha para o produtor rural. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 16 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 175).

MENDES, I. C.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R.; VARGAS, M. A. T. Eficiência fixadora de estirpes de rizóbio em duas cultivares de feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 18, n. 3, p. 421-426, 1994.

MERCANTE, F. M.; CUNHA, C. O.; STRALIOTTO, R.; RIBEIRO JÚNIOR, W.; VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A. A. *Leucaena leucocephala* as a trap-host for *Rhizobium tropici* strains from the Brazilian "Cerrado" region. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 49-58, 1998.

MICHIELS, J.; VERRETH, C.; VANDERLEYDEN, J. Effects of temperature stress on bean-nodulating *Rhizobium* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 206-1212, 1994.

MIRANDA, C. H. B.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Selection of Panicum maximum for associated biological nitrogen fixation using the 15N isotope dilution technique. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 22, p. 657-663, 1990.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the ß-subclass of Proteobacteria. **Nature**, v. 411, p. 948-950, 2001.

MOULIN, L.; CHEN; W. M.; BÉNA, G.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSSON, C. Rhizobia: the family is expanding. In: FINAN, T.; O'BRIAN, M.; LAYZELL, D.; VESSEY, K.; NEWTON, W. (Ed). **Nitrogen Fixation:** global perspectives. Wallingford: CAB International, p. 61-65, 2002.

MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F. L.; VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v. 73, p. 121-132, 2002.

NICOLÁS, M. F.; HUNGRIA, M.; ARIAS, C. A. A. Identification of quantitative trait loci controlling nodulation and shoot mass in progenies from two Brazilian soybean cultivars. **Field Crops Research**, v. 95, p. 355-366, 2006.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of Azospirillum: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 26, p. 1591-1601, 1994.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria, **Plant and Soil**, v. 284, p. 23-32, 2006.

PEREIRA, J. A. R.; BALDANI, J. I. Selection of Azospirillum spp. and Herbaspirillum seropedicae strains to inoculate rice and maize plants. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS: THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis. **Programme and abstracts**... Seropédica: EMBRAPA-CNPAB: UFRRJ, 1995. p. 220-221.

PEREIRA, J. O. Microrganismos endofíticos em espécies tropicais. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 20., 1995. **Anais...** Sociedade Brasileira de Genética, Piracicaba - São Paulo. Anais, v. 20, p. 3, 1995.

PEREIRA, P. A. A.; ARAÚJO, R. S.; ROCHA, R. E. M.; STEINMETZ, S. Capacidade dos genótipos de feijoeiro de fixar N2 atmosférico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 19, p. 811-815, 1984.

PERES, J. R. R.; MENDES, I. C.; SUHET, A. R.; VARGAS, M. A. T. Eficiência e competitividade de estirpes de rizóbio para a soja em solos de Cerrados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 17, p. 357-363, 1993.

PERES, J. R. R.; SUHET, A. R.; MENDES, I. C.; VARGAS, M. A. T. Efeito da inoculação com rizóbio e da adubação nitrogenada em sete cultivares de feijão em um solo de cerrados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 18, n. 3, p. 415-420, 1994.

PERES, J. R. R.; VIDOR, C. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em cultivares de soja. **Agronomia Sulriograndense**, v. 16, p. 205-219, 1980.

POLIDORO J. C.; RESENDE A. S.; QUESADA, D. M.; XAVIER R. P.; COELHO C. H. M.; ALVES B. J. R.; BODDEY R. M.; URQUIAGA, S. **Levantamento da contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN) para a cultura cana-de-açúcar no Brasil**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2001. p. 26. (Embrapa Agrobilogia. Documentos, 144).

QUESADA, D. M. **Seleção de genótipos de capim elefante (**Pennisetum purpureum **Schum.) para a alta produção de biomassa e eficiência da fixação biológica de nitrogênio (FBN)**. 2001. 119 f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2001.

RADWAN, T. El-S. El-D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Symbiosis**, v. 32, p. 39-54, 2002.

RAMOS, M. L. G.; BODDEY, R. M. Yield and nodulation of *Phaseolus vulgaris* and the competitivity of an introduced *Rhizobium* strain: effects of lime, mulch and repeated cropping. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, p. 171-177, 1987.

REIS, V. M. **Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 22 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 232).

REIS JUNIOR, F. B. **Influência do genótipo da planta, micropropagação e fertilização nitrogenada sobre a população de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar (**Saccharum**.)**. 2008. 160 f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1998.

REIS JUNIOR, F. B.; FARIA, S. M.; MENDES, I. C.; SIMON, M. F.; LOUREIRO, M. F.; ELLIOT, G. N.; YOUNG, P.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. "**Beta-Rizóbios**": os novos simbiontes encontrados em espécies de *Mimosa*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. 20 p. (Embrapa Cerrados. Série Documentos, 153).

REIS JUNIOR, F. B.; SIMON, M. F.; GROSS, E.; BODDEY, R. M.; ELLIOTT, G. N.; NETO, N. E.; LOUREIRO, M. F.; QUEIROZ, L. P. de; CHEN, W. -M.; NORÉN, A.; FARIA, S. M.; BONTEMPS, C.; GOI, S. R.; YOUNG, P. W.; SPRENT, J. I.; JAMES, W. K. Nodulation and nitrogen fixation by Mimosa spp. in the cerrado and caatinga biomes of Brazil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISIOLOGIA VEGETAL, 12., 2009, Fortaleza. **Desafios para produção de alimentos e bioenergia:** livro de resumos. Fortaleza: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal: UFC: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009. p. 283.

REIS JUNIOR, F. B.; REIS, V. M. Inoculante em cana é novidade. **Campo & Negócios**, v. 76, p. 31-32, 2009.

RIVAS, R.; VELAZQUEZ, E.; WILLEMS, A.; VIZCAINO, N.; SUBBA-RAO, N. S.; MATEOS, P. F.; GILLIS, M.; DAZZO, F. B.; MARTINEZ-MOLINA, E. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5217-5222, 2002.

RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; MORGADO, L. B.; NEVES, M. C. P. **Feijão-Caupi tem uma nova estirpe de rizóbio, BR3267, recomendada como inoculante**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. 16 p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 15).

SEGOVIA, L.; YOUNG, J. P. W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, p. 374-377, 1993.

SEVILLA, M.; BURRIS, R. H.; GUNAPALA, N; KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and 15N2 incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and mutant strains. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 14, p. 358-366, 2001.

SPECHT, J. E.; HUME, D. J.; KUMUDINI, S. V. Soybean yield potential: a genetic and physiological perspective. **Crop Science**, v. 39, p. 1560-1570, 1999.

STRALIOTTO, R.; CUNHA, C. O.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; RUMJANEK, N.G. Diversity of rhizobia nodulating common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) isolated from Brazilian tropical soils. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, p. 3-11, 1999.

SUMNER, M. E. Crop responses to Azospirillum inoculation. **Advances in Soil Sciences**, v. 12, p. 54-123, 1990.

SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; DE LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. Methylotrophic Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 214-220, 2001.

THOMAS, R. J. The role of the legume in the nitrogen cycle in pastures. **Grass & Forrage Science**, v. 47, p. 133-142, 1992.

URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C. de; RESENDE, A. S. de; WEBER, H. **Efeito da queima, aplicação de N, irrigação e molibdênio na produção e acumulação de nitrogênio na cana de açúcar a longo prazo**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1998. 13 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 72).

VALLE, C. B.; EUCLIDES, V. P. B.; MACEDO, M. C. M. Características das plantas forrageiras do gênero *Brachiaria*. In: SIMPOSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 17., 2000, Piracicaba. **Anais:** a planta forrageira no sistema de produção. Piracicaba: FEALQ, 2000. p. 65-108.

VAN BERKUM, P.; EARDLY, B. D. The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1132-1136, 2002.

VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; MENDES, I. C.; PERES, J. R. R. **Fixação Biológica de nitrogênio em solos de Cerrados**. Planaltina, DF: EMBRAPA-CPAC: SPI, 1994. 83 p.

VARGAS, M. A. T.; MENDES, I. C.; HUNGRIA, M. Response of field grown bean [*Phaseolus vulgaris* (L)] to *Rhizobium* inoculation and N fertilization in two Cerrados soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 32, p. 228-233, 2000.

VARGAS, M. A. T.; PERES, J. R. R.; SUHET, A. R. Adubação nitrogenada, inoculação e épocas de calagem para a soja em um solo sob Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 17, p. 1227-1132, 1982.

VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R. Efeitos de tipos e níveis de inoculantes na soja cultivada em um solo de Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 15, p. 343-347, 1980.

VERMA, S. C.; CHOWDHURY, S. P.; TRIPATHI, A. K. Phylogeny based on 16S rDNA and *nif*H sequences of *Ralstonia taiwanensis* strains isolated from nitrogen-fixing nodules of *Mimosa pudica*, in India. **Canadian Journal fo Microbiology**, v. 50, p. 313-322, 2004.

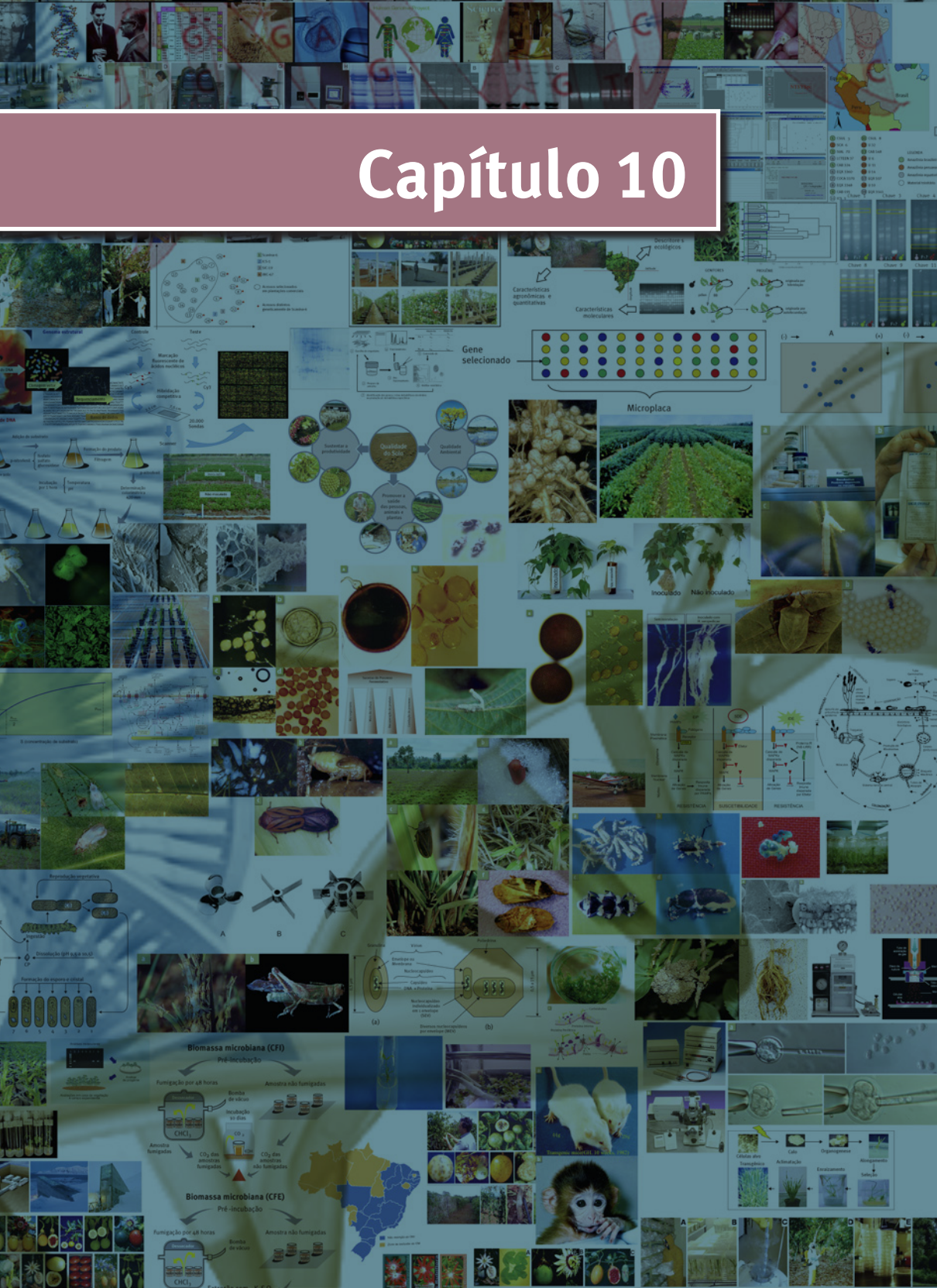
XAVIER, R. P. **Adubação verde em cana-de-açúcar**: influência na nutrição nitrogenada e na decomposição dos resíduos da colheita. 2002. 108 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2002.

YOUNG, J. P. W. Phylogeny and taxonomy of rhizobia. **Plant & Soil**, v. 186, p. 45-52, 1996.

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; REIS, V. M.; ALVES, G. C.; BALDANI, V. L. D.; CORDEIRO, A. C. C. **Contribuição da bactéria diazotrófica Herbaspirillum seropedicae para o rendimento de grãos de arroz e milho em Roraima.** Boa Vista: Embrapa Roraima, 2007. 20 p. (Embrapa Roraima. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 6).

ZIMMER, A. H.; CORREA, E. S. A pecuária nacional, uma pecuária de pasto? In: ENCONTRO SOBRE RECUPERAÇÃO DE PASTAGENS, 1., 1993. Nova Odessa. **Anais...** Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 1993. p. 1-25.

Capítulo 10


Gene selecionado
Microplaca
Inoculado
Não inoculado
Biomassa microbiana (CFI)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas
Biomassa microbiana (CFE)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas

Fungos micorrízicos arbusculares: pesquisa e desenvolvimento para a agricultura

Cynthia Torres de Toledo Machado
Cícero Donizete Pereira
Valter Lopes

Introdução

A micorriza arbuscular é, provavelmente, a simbiose planta-microrganismo mais comum. Cerca de 70% a 90% das plantas terrestres são hospedeiros desse grupo de fungos biotróficos obrigatórios altamente especializados (HAYMAN, 1982; SMITH; READ, 1997; RENKER et al., 2003).

As micorrizas arbusculares representam, entre os sete tipos distintos de associações micorrízicas descritas (arbuscular, ectomicorriza, ectendomicorriza, arbutóide, monotropóide, ericóide e orquidóide), a associação simbiótica mais abundante em todos os ecossistemas nas mais diversas regiões do planeta. As especificidades desses tipos são descritas e ilustradas em Moreira e Siqueira (2002) e Miranda (2008). As diferenças básicas residem no fato de que, nas ectomicorrizas que predominam em espécies arbóreas de clima temperado, o fungo se localiza externamente às células dos hospedeiros, enquanto, nas endomicorrizas (arbusculares), parte das estruturas fúngicas são intracelulares (PARNISKE, 2008).

Os primeiros estudos científicos sobre a anatomia e a ocorrência dessas associações entre fungos e raízes, já especulando sobre os possíveis benefícios para as plantas, comprovando experimentalmente a natureza mutualista da relação e descrevendo as bases funcionais da mesma, foram conduzidos por Frank, cientista alemão considerado o pai da micorrizologia, a partir de 1885. Foi ele também quem empregou o termo micorriza (mico, do grego *mykes* = fungo e riza, do grego

rhiza = raízes) pela primeira vez (SIEVERDING, 1991; MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; PARNISKE, 2008).

A infecção micorrízica se caracteriza pela formação de hifas não septadas externas às raízes e hifas intra e intercelulares nas camadas das células córtex, além de arbúsculos intracelulares e vesículas intra e intercelulares (SIEVERDING, 1991).

O desenvolvimento dessa simbiose resulta na formação de estruturas ramificadas dentro das células vegetais – os arbúsculos – que parecem ser o principal ponto de troca de nutrientes entre os fungos e as plantas. Essa associação é responsável não só pelo incremento na absorção de nutrientes, principalmente fosfato, mas também pela aquisição de água e pela promoção da resistência das plantas a diversos estresses bióticos e abióticos, sendo considerada por Smith e Read (1997), como ecologicamente obrigatória.

A contribuição das plantas na simbiose é o fornecimento de carboidratos aos fungos (SOLAIMAN; SATO, 1997), e estima-se que mais de 20% dos produtos da fotossíntese das plantas terrestres (aproximadamente 5 bilhões de toneladas de carbono/ano) sejam consumidos pelos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) (BAGO et al., 2000). Essa associação contribui de forma importante para o ciclo global do carbono (C).

Os efeitos benéficos da micorriza arbuscular são mais aparentes sob condições de disponibilidade limitada de nutrientes. Verifica-se que a colonização radicular é reduzida significativamente sob condições de abundância de nutrientes. Entretanto, esses mecanismos regulatórios ainda não foram completamente elucidados, bem como os que induzem à inibição de patógenos em raízes colonizadas (PARNISKE, 2008).

Ocorrência e importância ecológica dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs)

Há indícios, a partir de estudos realizados em raízes fossilizadas, que essa simbiose tenha surgido há aproximadamente 400 milhões de anos e, a partir dessas evidências, supõe-se que as plantas terrestres e os fungos micorrízicos tenham coevoluído juntos (HECKMAN et al., 2001; PARNISKE, 2008).

O processo evolucionário não é bem conhecido, mas muito provavelmente os fungos micorrízicos originaram-se de fungos saprofíticos que adquiriram, ao longo da evolução, alto grau de compatibilidade genética e funcional com os parceiros autotróficos. No início desse processo, a colonização se dava na rizosfera e na superfície das raízes. Posteriormente, esses fungos desenvolveram mecanismos que permitiram a penetração inter e intracelular das raízes. Em seguida, os fungos perderam a capacidade saprofítica, tornando-se essencialmente biotróficos. A perda da capacidade de patogênese se deu quando esses organismos adquiriram a capacidade de regular a síntese e a atividade de enzimas hidrolíticas que causam a citólise e necrose das células do hospedeiro. Essas hipóteses são relatadas por Moreira e Siqueira, 2002.

O tempo que os fungos micorrízicos arbusculares tiveram para se dispersar e a falta de hospedeiro específico explicam a ocorrência das micorrizas arbusculares nos diversos eco e agroecossistemas, como as áreas agrícolas, florestas tropicais e temperadas, desertos, dunas e pradarias (BRUNDRETT, 1991, citado por MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Não existem padrões biogeográficos que descrevam a ocorrência dessas associações, que são raras apenas nos ambientes árticos e nas regiões de tundras, onde predominam as ericáceas e suas micorrizas específicas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

Portanto, micorrizas arbusculares são a regra na natureza e não a exceção, e a ausência da associação simbiótica é uma situação restrita a poucas famílias, gêneros ou espécies vegetais como as crucíferas, que pertencem à família das brássicas, em que 87% de seus membros não formam micorrizas. Famílias tipicamente micorrízicas, como as leguminosas, possuem espécies que não se associam aos FMAs, como acontece com 4% das espécies do gênero *Lupinus*. Outras famílias que possuem membros que não formam micorrizas são: *Chenopodiaceae*, *Poligonaceae*, *Amarantaceae*, *Comelinaceae*, *Juncaceae*, *Proteaceae* e *Cyperaceae* (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

As razões para a condição não micorrízica de algumas espécies são pouco conhecidas, mas alguns fatores já foram identificados, como a produção de compostos fungistáticos como os glicosinolatos pelas crucíferas, a insuficiência de fatores estimulantes ou sinais molecu-

lares nos exudatos de certas espécies e até mesmo deficiências na aderência ou existência de barreiras físicas na parede do hospedeiro (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

Até o momento são conhecidas entre 180 e 200 espécies de FMAs, listadas na página do International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM), http://invam.caf.wvu.edu, sendo esse número significativamente pequeno quando comparada a outros microorganismos, considerando os 400 milhões de anos de seu surgimento. Smith e Read (1997) comentam que o reduzido número de espécies e a ausência de especificidade com hospedeiro podem ser explicados pelo modo de reprodução exclusivamente clonal desses fungos, bem como pela possibilidade de uma única planta hospedeira ser colonizada por diferentes espécies desse fungo. Portanto, essa diversidade genética é considerável e inesperada para organismos de reprodução assexuada.

As possíveis razões para tal variabilidade genética podem ser explicadas por algumas características. A primeira delas é que as hifas dos FMAs são asseptadas e cenocíticas, ou seja, não possuem septos e concentram múltiplos núcleos dentro da mesma célula. Outro aspecto muito relevante é que os esporos individuais contêm centenas de núcleos geneticamente distintos (PARNISKE, 2008). Além disso, embora não haja relatos de fases sexuais no ciclo de vida desses fungos, é possível que o material genético dos mesmos seja trocado e recombinado porque ocorre anastomose nas hifas (GIOVANNETTI et al., 2004), ou seja, a fusão dessas com conexão citoplásmica e consequente troca de núcleos.

De acordo com Husband et al. (2002), a aparente 'baixa diversidade' dos FMAs comparada com a variedade de comunidades de plantas associadas a eles leva a acreditar que esses fungos constituem um grupo homogêneo e que as espécies são funcionalmente redundantes. A simbiose micorrízica é considerada não específica, mas existe entre fungos e planta hospedeira o que se denomina "habilidade discriminatória", que é o que irá determinar as variações de infectividade, eficiência e efetividade para as combinações fungo, planta e condições ambientais (PAULA et al., 1988). Entretanto, vários estudos têm demonstrado que espécies individuais de FMAs podem apresentar

uma gama de efeitos em diferentes plantas hospedeiras, promovendo o crescimento de algumas e retardando o desenvolvimento de outras (TALUKDAR; GERMIDA, 1994; STREITWOLF-ENGEL et al., 1997; VAN DER HEIJDEN et al., 1998). A resposta em crescimento das plantas também pode variar em função da colonização por espécies diferentes de FMAs (SANDERS; FITTER, 1992; BEVER et al., 1996).

O certo é que os FMAs são determinantes potenciais da estrutura das comunidades vegetais e sua diversidade determina a biodiversidade vegetal, bem como a variabilidade e produtividade dos agro e ecossistemas (VAN DER HEIJDEN et al., 1998). Daí a enorme importância do conhecimento da diversidade dos fungos micorrízicos e seu comportamento e organização em condições de campo, tais como os fatores ambientais que determinam a esporulação dos fungos, a relação entre a população e a colonização das raízes, a identificação de quais espécies estão colonizando raízes de determinadas plantas, entre outros aspectos importantes.

Parte desses estudos é dificultada pelo biotrofismo obrigatório que caracteriza essa relação simbiótica, bem como pela natureza hipógea do micosimbionte (FORTIN et al., 2002). Enormes esforços vêm sendo dispensados nas últimas décadas para a obtenção da simbiose in vitro, com estudos que envolvem culturas de raízes (transformadas geneticamente ou não), escolha de espécies hospedeiras, técnicas de inoculação e preservação e meios de cultura.

Fortin et al. (2002) realizaram uma revisão sobre o assunto, versando sobre o potencial da cultura de raízes no avanço de estudos sobre morfologia dos FMAs, taxonomia, filogenia, entendimento dos processos de colonização radicular e desenvolvimento micelial, envolvendo descobertas nos níveis fisiológicos, bioquímicos e moleculares. Várias espécies de FMAs, representativas das famílias *Acaulosporaceae, Gigasporaceae e Glomaceae* têm sido cultivadas com sucesso em culturas de raízes e existe uma coleção internacional de FMAs cultivados in vitro, a Ginco (Glomales In Vitro Collection), resultado de parcerias de universidades e centros de pesquisa da Bélgica e Canadá (FORTIN et al., 2002). Não obstante esses avanços, ainda não se conseguiu o cultivo desses fungos em meios de culturas artificiais na ausência de células vivas do hospedeiro (MIRANDA, 2008).

Métodos de avaliação de fungos micorrízicos arbusculares em raízes e solos

Coloração das raízes e quantificação da infecção

As raízes das plantas não sofrem alterações morfológicas em decorrência da colonização pelos fungos micorrízicos arbusculares. Assim, observações ao microscópio são necessárias para determinar e quantificar a infecção micorrízica, após as raízes finas serem clarificadas e coradas. Sieverding (1991) ressalta a necessidade da coloração pelo fato de o micélio e outras estruturas fúngicas serem hialinas ou transparentes e de difícil detecção, passíveis de serem confundidas com estruturas de fungos saprofíticos ou parasitas. A coloração facilita a caracterização das estruturas e sua diferenciação, mas estruturas de outros fungos além dos FMAs podem ser coradas também, requerendo certa experiência do observador.

O método clássico de coloração foi desenvolvido por Phillips e Hayman (1970), sendo relativamente simples. Essa metodologia ainda é utilizada, com modificações propostas para redução de uso de produtos tóxicos como o fenol, componente da solução corante de azul de tripano (KOSKE; GEMMA, 1989; MIRANDA, 2008) e para a clarificação e coloração de raízes mais lignificadas (SCHENCK, 1984), para espécies lenhosas e para espécies arbóreas exóticas e nativas do Cerrado, entre outras. Essas últimas foram desenvolvidas no Laboratório de Micorrizas da Embrapa Cerrados e são descritas detalhadamente em Miranda (2008).

Após a coloração, a avaliação da colonização radicular em percentagem de segmentos de raízes que contenham estruturas fúngicas se dá por meio da técnica da intercessão radicular proposta por Giovannetti e Mosse (1980).

Extração de esporos

A diversidade dos FMAs a campo tem sido tradicionalmente estimada pelo número de esporos das diferentes espécies encontradas. A identificação dos fungos se dá após os mesmos terem esporulado no

início de sua fase reprodutiva, pela separação dos esporos do solo ou do substrato onde está se cultivando a planta hospedeira.

Os procedimentos para a separação dos esporos do solo são simples e se baseiam em suspensão do material (solo e raízes) em água, com posterior peneiramento, decantação e centrifugação. A metodologia clássica de extração de esporos por peneiramento úmido foi descrita por Gerdemann e Nicolson (1963), e desde então vem sendo utilizada com algumas variações. Descrições detalhadas de outros procedimentos são encontradas em Schenck (1984); Pacioni (1994) e Tommerup (1994).

O material de solo e raízes, em massa e (ou) volume conhecido, (geralmente 50 g) é suspenso em água por tempo suficiente para a sedimentação de partículas grosseiras e a suspensão é decantada em uma série de peneiras acopladas com gradiente decrescente de malhas. Esse procedimento é repetido várias vezes (Figura 1). O material retido nas peneiras inferiores é submetido à centrifugação em água e caulim ou em solução de sacarose para a separação dos esporos das partículas mais pesadas do substrato. Quando a centrifugação é feita em solução de sacarose, os esporos permanecem na camada superficial, enquanto as partículas de solo se mantêm na parte inferior do tubo de centrífuga. Já quando a suspensão de solo é centrifugada com a adição de caulim, os esporos se prendem no fundo do tubo da centrífuga.

A metodologia adaptada e utilizada no Laboratório de Micorrizas da Embrapa Cerrados é uma combinação daquelas estabelecidas por Gerdemann e Nicolson (1963) e Coolen (1979), utilizando duas peneiras, de 710 µm e 53 µm. A centrifugação feita com caulim tende a preservar a integridade dos esporos, já a solução de sacarose pode provocar o rompimento das paredes e vazamento do conteúdo citoplasmático, desde que os esporos permaneçam na mesma. Esses procedimentos e particularidades metodológicas são descritos detalhadamente em Miranda (2008).

Uma vez extraídos, os esporos são contados em placas de petri especiais e observados em lupas e microscópios, para identificação a partir de suas características morfológicas.

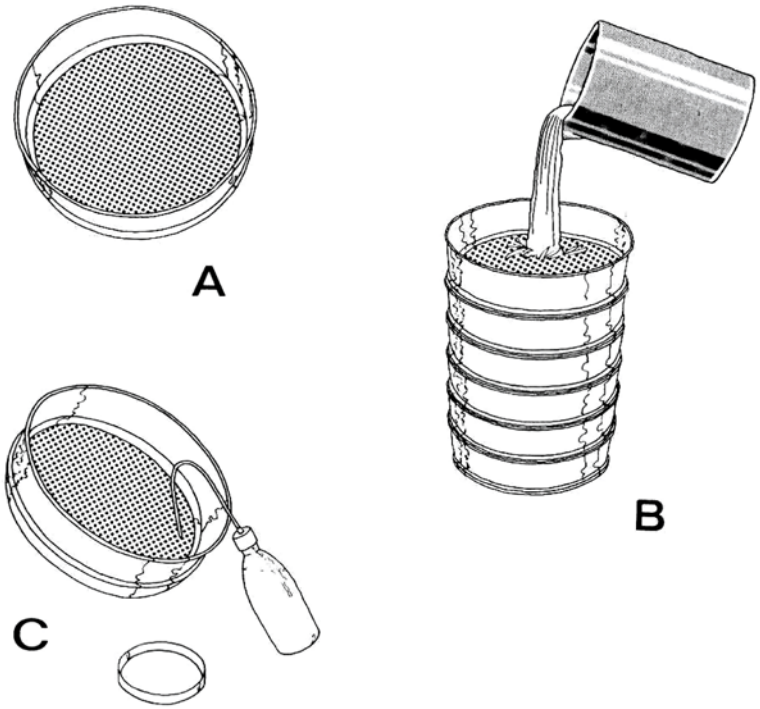


Figura 1. Etapas da técnica de peneiramento úmido: (A) peneira metálica; (B) decantação através do conjunto de peneiras; e (C) remoção dos esporos para a placa de Petri.

Fonte: Extraído de Pacioni (1994).

Determinação do potencial de inóculo pelo método do número mais provável (NMP)

Os esporos são estruturas de sobrevivência dos FMAs e, em determinadas situações, constituem a única forma de propágulo infectivo desses fungos no solo. Esse é o caso de longos períodos de seca e (ou) de solo sem vegetação. Nesses casos, de acordo com Sieverding (1991), o número de esporos por unidade de massa ou volume de solo representa a extensão dos propágulos dos fungos no campo.

Entretanto, o número de esporos é frequentemente usado para quantificar a população de FMAs durante os períodos de crescimento das plantas, em áreas normalmente vegetadas ou cultivadas. Embora a densidade de esporos possa se correlacionar bem com o total de propágulos infectivos dos FMAs nos solos em certas situações (TORO; SIEVERDING, 1986; GAVITO, 1988, citado por SIEVERDING, 1991), cuidados devem ser tomados ao interpretar esses dados como medidas efetivas do potencial de inóculo, visto que a esporulação depende do fungo propriamente dito, do hospedeiro, das características do solo e das condições climáticas. Assim, o potencial de inóculo pode ser subestimado, já que o micélio fúngico é uma importante fonte de inóculo que não é quantificada pela contagem de esporos, bem como as taxas de infecção radiculares, que constituem medidas indiretas da infectividade da população dos FMAs.

O único método que quantifica todos os propágulos infectivos dos FMAs e estima a população dos mesmos, fornecendo número de propágulos por unidade de volume ou massa de solo, inclusive com limites de intervalo de confiança, é o método do número mais provável (NMP), adaptado do método de Porter (1979) para os estudos de FMAs.

Diluições seriadas do solo que se pretende estudar são feitas nesse mesmo solo esterilizado, constituindo bioensaios com repetições e séries de diluições recomendadas para situações específicas. Nos recipientes em que o substrato nas diversas diluições é colocado (tubetes, em geral), planta-se uma espécie encontrada na área em estudo, ou uma planta teste padrão, como *Brachiaria decumbens*, por exemplo (Figura 2). Após 6 a 8 semanas, a infecção radicular dessas plantas-teste é verificada, estimando-se, por fórmulas específicas, o potencial de propágulos infectivos daquele solo, em termos de densidade e efetividade das populações.

Esse método é relativamente de fácil execução, mas existem algumas limitações. Podem ocorrer subestimativas pela não coloração de algumas micorrizas, conforme descreve Morton (1985). Outros autores, como Miranda (2008), consideram-no trabalhoso para uso em rotina de laboratórios de micorrizas, em face ao volume de amostras decorrentes das séries de diluição e do número de repetições.

Foto: Cícero Donizeti Pereira

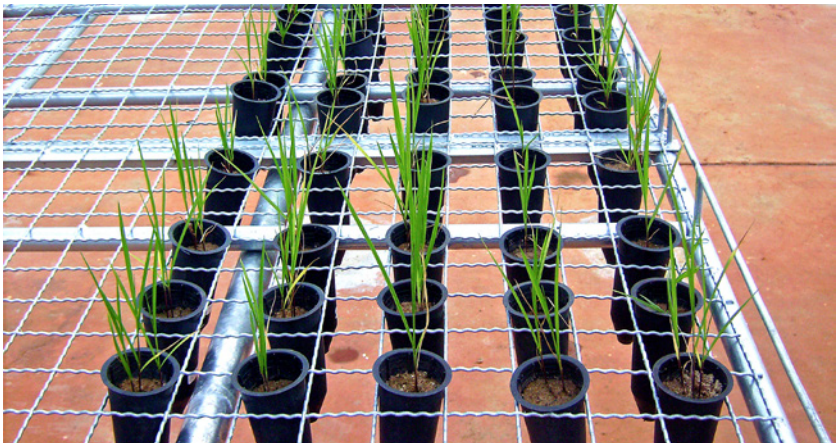


Figura 2. Ensaio de NMP, com tubetes contendo as diluições de solo e a planta teste.

Embrapa Cerrados, setembro de 2009.

Glomalina

A estimativa da biomassa fúngica pela determinação da produção de hifas externas (SYLVIA, 1994), considerada difícil e morosa por alguns autores (JAKOBSEN et al., 1992; MILLER et al., 1995; RILLIG et al., 1999 citados por ROSIER et al., 2006), evoluiu para o uso de marcadores bioquímicos como ergosterol, quitina e glomalina como indicadores dos FMAs (NYLUND; WALLANDER, 1994; WRIGHT et al., 1996). Posteriormente, verificou-se que vários outros organismos produzem ergosterol e quitina (FREY et al., 1994), bem como que existem FMAs que não contém ergosterol (OLSSON et al., 2003).

Assim, a determinação da glomalina vem sendo usada para identificar a presença (WRIGHT et al., 1996) e estimar a biomassa desses fungos (KRIVTSOV et al., 2004; LOVELOCK et al., 2004). Trata-se de uma glicoproteína insolúvel (WRIGHT; UPADHYAYA, 1996) produzida pelas hifas de todos os FMAs, mas não por outros grupos de fungos do solo (WRIGHT et al., 1996), que atua efetivamente na cementação das partículas do solo (WRIGHT; UPADHYAYA, 1998), incrementando a estabilidade dos agregados, já promovida pelo efeito

físico das redes de hifas fúngicas extraradiculares que envolvem e interligam as partículas do solo.

Na condição de glicoproteína, a glomalina possui quantidades expressivas de carbono (C), representando elevada proporção do C orgânico do solo e perfazendo quantidades muito superiores daquele armazenado na biomassa microbiana (RILLIG et al., 2001), constituindo, portanto, um indicador sensível das mudanças nos teores de C dos solos advindas das práticas de manejo e uso das terras, estando também envolvida no sequestro de C (RILLIG et al., 1999; RILLIG et al., 2003).

A determinação da glomalina se dá mais frequentemente pela extração em citrato de sódio e análise pelo reagente de Bradford ou por Elisa (WRIGHT; UPADHYAYA, 1998; ROSIER et al., 2006; JANOS et al., 2008).

Identificação e classificação e dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs)

A base da taxonomia dos FMAs é a formação dos esporos, seguida de características dessas estruturas, tais como tamanho, cor e especificidades das paredes internas e externas, como número de camadas, ornamentação, reações a corantes específicos entre outras. Atualmente são conhecidas 5 famílias e 7 gêneros de fungos micorrízicos, nas quais se distribuem aproximadamente 200 espécies desses fungos, listados na página do Invam (http://invam.caf.wvu.edu).

Os fungos micorrízicos arbusculares pertencem ao filo Glomeromycota, um filo monofilético (SCHÜBLER et al., 2001). A classificação atual, proposta por Morton e Redecker (2001), foi estabelecida a partir de consenso entre características morfológicas dos esporos e métodos moleculares. Nessa nova classificação, foram incorporadas duas novas famílias com dois gêneros: Archaeosporaceae e Paraglomaceae, com os respectivos gêneros *Archaeospora* e *Paraglomus*. Essas novas famílias foram descritas com base em caracteres morfológicos atípicos, distâncias entre padrões imunológicos e de ácidos graxos e divergências na sequência 18S do DNA ribossomal (INVAM, 2008).

As classificações anteriores datam de 1974, estabelecida por Gerdemann e Trappe (citados por MIRANDA, 2008), e 1990, proposta por Morton e Benny. Essa se deu com ênfase na filogenia, na teoria do ancestral comum, destacando-se por remover os FMAs da ordem Endogonales (vigente por mais de duas décadas desde a proposição na classificação de 1974), inserindo-os na nova ordem Glomales e definindo duas subordens: Glomineae e Gigasporineae. A família Gigasporaceae, com os gêneros *Gigaspora* e *Scutellospora,* pertencem à subordem Gigasporineae e as famílias Glomaceae (com os gêneros *Glomus* e *Sclerocystis*) e Acaulosporaceae (com os gêneros *Acaulospora* e *Entrophospora*) pertencem à subordem Glomineae. Na classificação seguinte, de 2001, o gênero *Sclerocystis* foi extinto.

As principais características que diferenciam as subordens, seus gêneros e as respectivas espécies são sumarizadas no Tabela 1.

Tabela 1. Diferenças entre as subordens Glomineae e Gigasporineae.

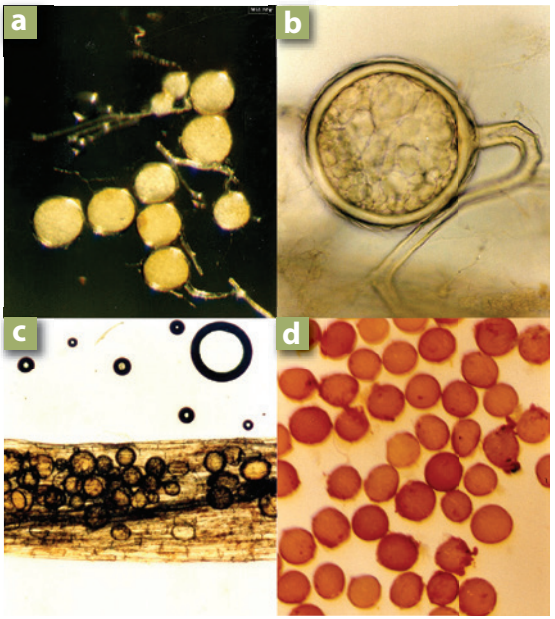
Subordem Glomineae	Subordem Gigasporineae
Arbúsculos e vesículas dentro das raízes – fungos micorrízicos vesículo arbusculares	Arbúsculos – fungos micorrízicos arbusculares
Hifas cilíndricas com ramificações perpendiculares	Células auxiliares
Esporos com camadas evanescentes envolvendo a camada laminar da parede	Esporos em célula bulbo-suspensora; com camadas permanentes envolvendo a camada laminar da parede
Propágulos infectivos: esporos, hifas e vesículas	Propágulos infectivos: esporos

As famílias da subordem Glomineae, com seus respectivos gêneros, Glomaceae (*Glomus*) (Figura 3); Acaulosporaceae (gêneros *Acaulospora* e *Entrophsopora*); Archaeosporaceae (*Archaeospora*) (Figura 4); e Paraglomaceae (*Paraglomus)*, possuem características bastante peculiares que as diferenciam entre si e dos gêneros da família Gigasporaceae (Figura 5). Essas características são as seguintes:

Família Glomaceae

Gênero *Glomus*

a) Esporos desenvolvidos terminalmente na hifa, presença de pedicelo.
b) Esporos menores, com maior número de camadas e em cores variadas.
c) Esporos isolados, em agregados ou em esporocarpos, podendo se formar dentro das raízes.
d) Hifa contínua à parede do esporo.
e) Ausência de paredes germinativas.
f) Vesículas podem ou não se formar.



Fotos Valter Lopes

Figura 3. (a) e (b) *Glomus clarum*; (c) *Glomus intraradices*; e (d) *Glomus etunicatum*.

Família Acaulosporaceae

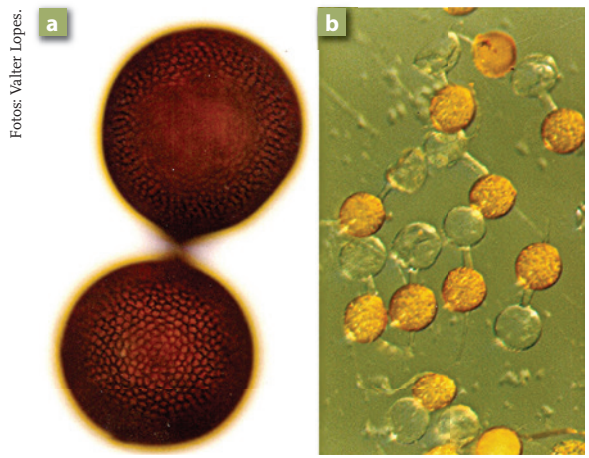
Paredes germinativas, formação de sáculo esporífero antes do desenvolvimento dos esporos, esporos formados na hifa do sáculo esporífero.

Gênero Acaulospora:

a) Esporos formados na lateral da hifa do sáculo esporífero.

Gênero Entrophospora:

a) Esporos formados dentro da hifa do sáculo esporífero.



Fotos: Valter Lopes.

Figura 4. (a) *Acauposporа denticulata* e (b) *Entrophopora colombiana*.

Família Archaeosporaceae

Gênero Archaeospora

a) Não formam vesículas.
b) Arbúsculos se colorem muito pouco; distribuição irregular em cereais e gramíneas hospedeiras.
c) Formação de esporos glomo e acaulosporoides – 3 modos: sáculo esporífero larteral, semelhante a *Acaulospora*; terminalmente na hifa, como *Glomus* e com formação de pedicelo no sáculo esporífe*ro que se d*esprende.

Família Paraglomaceae

Gênero Paraglomus

a) Vesículas pobremente caracterizadas.
b) Arbúsculos também não se colorem bem.
c) Formação de esporos semelhante ao gênero *Glomus*.
d) Duas espécies: *P. occultum* e *P. brasilianum*.

A família Gigasporaceae, da subordem Gigasporineae, possui dois gêneros, *Gigaspora* e *Scutellospora*. Essa família tem por característica principal a formação de esporos em célula bulbo ou esporógena. As peculiaridades que diferem os gêneros dessa família são listadas a seguir.

Família Gigasporaceae

Formação de esporos em célula bulbo ou esporógena

Gênero Gigaspora

a) Esporos "gigantes".
b) Esporos sem ornamentação.
c) Tubo germinativo emerge a partir de camada fina e verrugosa da parede laminar interna.
d) Paredes dos esporos possuem duas camadas.
e) Células auxilares com ornamentação equinulada.

Gênero *Scutellospora*

a) Esporos com escutelo, escudo ou placa de germinação
b) Placa de germinação persistente formada a partir da parede interna, de onde emergem os tubos de germinação
c) Células auxiliares com ornamentação nodosa ou lobada
d) Paredes do esporo: camadas permanente e laminar (até 30)
e) Esporos com ou sem ornamentação

Fotos: Valter Lopes.

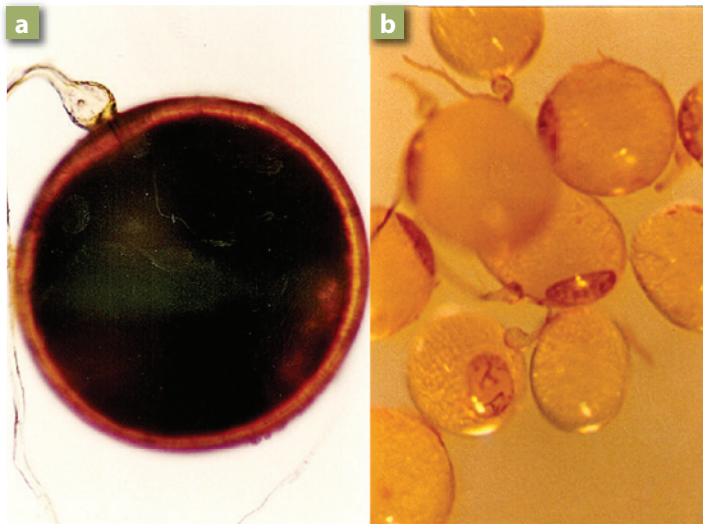


Figura 5. (a) *Gigaspora decipiens* e(b) *Scutellospora cerradensis*.

Aplicação de métodos moleculares em estudos com fungos micorrízicos arbusculares

A identificação dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) é essencial para pesquisas com esses organismos, sendo feita baseando-se na ontogenia e morfologia dos esporos. É um processo complexo, dependente da utilização de chaves de identificação e altamente dependente de profissionais especialistas e experientes em taxonomia.

Alguns autores consideram que a identificação por métodos morfológicos pode ser imprecisa devido à grande homogeneidade morfológica e anatômica das estruturas desses fungos, ao fato de algumas espécies formarem tipos muito similares de esporos, dificultando a diferenciação de espécies, bem como pela ocorrência de alterações morfológicas em função das condições ambientais a campo (CLAPP et al., 1995; SALES; SOUZA, 1998; REDECKER et al., 2000; RENKER et al., 2003; MA et al., 2005).

Assim, o emprego de métodos moleculares em análises de comunidades de FMAs baseados na extração, amplificação e caracterização de ácidos nucleicos ganhou notoriedade nas últimas décadas, com-

plementando os até então utilizados extração direta de esporos e cultivo armadilha (GOI; SOUZA, 2006). A maioria das técnicas moleculares utilizadas na identificação de FMAs é baseada na utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction), que tem como finalidade produzir uma quantidade efetiva de um segmento específico de DNA, a partir de uma quantidade mínima de DNA molde associado a moléculas iniciadoras (primers) de sequências específicas, às regiões de DNA que se deseja amplificar.

A primeira sequência de DNA de FMAs obtidas de raízes infectadas por esses fungos foi apresentada por Simon et al. (1992). Eles afirmaram que a possibilidade de se amplificar sequências da subunidade menor do rRNA (SSU), região codificadora 18S, fornecia uma nova abordagem para a detecção rápida, identificação e quantificação dos FMAs, além de maior facilidade em estudos de filogenia desses organismos. No ano seguinte, os estudos dessa região foram ampliados usando uma quantidade maior de primers específicos para FMAs associados à técnica Single Strand Conformation Polymorphims (SSCP), para identificar diferenças nas sequências amplificadas (SIMON et al., 1993).

Utilizando a técnica de *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) e como molde DNA genômico de FMAs, Wyss e Bonfante (1993) identificaram polimorfismos entre espécies desses fungos, sugerindo um possível desenvolvimento de sondas específicas para estudo de biodiversidade para espécies desse filo. Longato e Bonfante (1997) compararam a técnica de microsatélites com RAPD e verificaram vantagens na utilização de microsatélites, pois produziram fingerprints únicos, mesmo em genomas heterogêneos como os de FMAs, quando comparados às amplificações por RAPD. Entretanto, genes que codificam para rDNA são os mais utilizados nesse tipo de estudo por atenderem alguns critérios, entre os quais, a alta variedade que possibilita o desenvolvimento de primers para inúmeras classes taxonômicas (BRUNS; GARDNES, 1993). Nesses genes, as regiões codificadoras (18S, 5,8S e 25S) são as mais conservadas, as regiões internas (ITS) mostram uma variação relativamente mediana e as regiões intergênicas (IGS) são as mais variáveis (LANFRANCO, 1998; citado por NOVAIS, 2008).

Clapp et al (1995), utilizando a técnica denominada enriquecimento seletivo de DNA amplificado – Selective Enrichment of Amplified DNA (SEAD), identificaram FMAs a partir de DNA extraído diretamente de raízes. Nessa técnica, o DNA foi amplificado com os primers universais para eucariotos, SS38 e NS21, e, associando a um método baseado no princípio de hibridação subtrativa para a remoção de produtos amplificados de DNA de plantas pela PCR, selecionaram sequências específicas para FMAs. Nesse mesmo estudo, os autores comentam sobre a importância de utilização de métodos que possam revelar diretamente a taxa de colonização de FMAs em raízes, de grande importância na elucidação de biodiversidade e ecologia desses. Apesar de outras técnicas como o uso de isozimas (ROSENDAHL; SEN, 1992) e métodos imunológicos (WRIGHT et al, 1987) terem sido inicialmente aplicados nesses estudos, Clapp et al (1995) consideram o PCR o mais promissor dos métodos.

A amplificação de DNA de um único esporo para estudar a diversidade de FMAs em populações naturais foi realizada por Sanders et al. (1995). Nesse estudo, foram utilizados os primers ITS1 e ITS4 na PCR, tendo-se realizado a subsequente restrição do produto de amplificação por enzimas de restrição. Essa técnica, conhecida como Restriction Fragment Length Polimorfism-PCR (RFLP-PCR), detectou diferentes padrões de bandeamento obtidos de diversos isolados.

A associação de caracteres morfológicos a resultados moleculares, entretanto, deu-se pela primeira vez em um trabalho realizado por Morton e Redecker (2001), que, na ocasião, propuseram duas novas famílias na árvore filogenética dos FMAs: *Archaeosporaceae* e *Paraglomaceae*. Posteriormente, estudos moleculares similares, baseados na região 18S do rDNA, demonstraram a natureza monofilética do grupo de espécies dos FMAs, incluindo-os em um novo filo: Glomeromycota (SCHÜßLER et al., 2001).

Tonin et al (2001) caracterizaram esporos de FMAs de solo rizosférico e raízes de *Viola alaminaria*, planta tolerante a metais pesados, por meio de PCR para a região 18S rDNA. O estudo da diversidade desses e de outros fungos foi avaliada por Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP), utilizando as enzimas de restrição *Hinf*I, *Hae*III. Os resultados confirmaram que a análise por T-RFLP é

uma ferramenta muito útil para avaliação da diversidade microbiana de comunidades complexas, inclusive, podendo ser utilizada para a identificação de espécies de FMAs, quando primers universais forem utilizadas para o filo glomeromicota. Anos mais tarde, em uma revisão de literatura, Dickie e Fitzjohn (2007) mostraram a ampla utilização desta técnica em estudos da ecologia de FMAs, relatada em vários trabalhos sobre o assunto (TONIN et al, 2001; JOHNSON et al, 2003; MUMMEY et al, 2005; RÄBERG et al, 2005).

Um "nested PCR" foi desenvolvido por Renker et al. (2003) para amplificar espaço interno de transcrito (ITS) de FMAs a partir de raízes, possibilitando a identificação de espécies desse fungo por meio de uma técnica molecular. Essa técnica e algumas variações dela são frequentemente usadas para análises filogenéticas entre espécies estreitamente relacionadas e de populações de uma mesma espécie (MA et al, 2005; RENKER et al, 2005; RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA; FREITA, 2006; WU et al, 2007; APPOLONI et al., 2008; NOVAIS, 2008; OLIVEIRA, 2009; ZHANG et al, 2010).

Cornejo et al (2004) utilizaram "nested PCR" associada à técnica Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE) para sequências da região codificadora 18S de FMAs. Essa técnica usa o mesmo princípio do Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP), permitindo a migração diferenciada do segmento de DNA de acordo com a sua sequência de nucleotídeos, possibilitando, neste estudo, a identificação de espécies de *Glomus* colonizando raízes de diferentes espécies de plantas.

A variação inter e intraespecífica da região codificadora 18S do gênero *Gigaspora* foi explorada por Souza et al. (2004). Um screening sobre 48 isolados por PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) revelou que a região V3-V4 do gene 18S contém variação suficiente para discriminar diferentes espécies do gênero *Gisgaspora*. Esses autores mostraram que a identificação via DGGE é mais confiável que a identificação morfológica para algumas espécies desse gênero, mas afirmaram que, apesar dos avanços em estudo moleculares, houve pouco progresso na identificação e caracterização de espécies, ainda muito dependentes de análises morfológicas.

Outros estudos foram conduzidos por Ma et al (2005), que descreveram a PCR com primers específicos para a região 18S associada a um

DGGE como uma ferramenta importante para se caracterizar comunidades complexas de FMAs em agroecossistemas e por Appoloni et al (2008), que, realizando sequenciamento dos produtos amplicados por nested-PCR, determinaram diferenças entre comunidades de FMAs em solos geotérmicos do Parque Nacional Yellowstone (EUA), identificando filotipos específicos para aquele tipo de solo.

Novais (2008) fez uma caracterização molecular com base na discriminação específica da região V9 da região codificadora 18S, por PCR-DGGE, que permitiram a diferenciação de espécies de FMAs inclusive das espécies *Gisgapora albida, G. margarita e G. gigantea*, pertencentes a um mesmo gênero, corroborando com a identificação fenotípica. Zhang et al (2009) usaram essa mesma técnica para estudar a interação entre FMAs e bactérias na rizosfera de duas espécies vegetais dominantes numa região de Zhifanggou, noroeste da China. Os resultados das análises moleculares indicaram que as plantas têm um efeito seletivo na estrutura da comunidade bacteriana, mas os FMAs não tiveram estrita especificidade com a planta hospedeira. Essa técnica também foi usada com sucesso por Oliveira et al (2009), na análise da estrutura da comunidade de FMAs na rizosfera de genótipos de milho contrastantes quanto a eficiência de fósforo.

Estabelecimento da associação micorrízica

O estabelecimento da associação micorrízica resulta de uma sequência de eventos coordenados pelo fungo e pela planta e por suas interações. Na Figura 6, ilustram-se essas fases, de forma simplificada, mostrando que a regulação do micotrofismo, ou seja, do fluxo de nutrientes do fungo para as plantas é o que determina a resposta das mesmas à colonização, enquanto a regulação do biotrofismo (fluxo de fotoassimilados das plantas para os fungos) controla o grau de colonização, produção de propágulos e sobrevivência dos micosimbiontes.

Os esporos são unidades biológicas em processo de quiescência que precisam ser ativados para desencadear os processos e funções metabólicas que sustentam a germinação e o crescimento da fase filamentosa (das hifas) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Não se conhece o mecanismo exato da ativação, mas sabe-se que a germinação dessas estruturas geralmente não requer a presença da raiz do hospedeiro,

sendo um estágio não simbiótico (FORTIN et al., 2002). Entretanto, apesar dos esporos dos FMAs serem capazes de germinar na ausência das plantas hospedeiras, esses microganismos são biotróficos obrigatórios que dependem de um parceiro fotoautotrófico vivo para completar seu ciclo de vida e produzir a próxima geração de esporos (PARNISKE, 2008).

Uma das possibilidades relatadas em Moreira e Siqueira (2002) é que o início da germinação se dá pela ativação de proteases até então inativas das membranas dos esporos, resultante da absorção de água e consequente aumento de volume. A partir dessa modificação nas condições biofísicas da membrana, ocorre a ativação das enzimas proteolíticas armazenadas, hidrólise de proteínas de reserva com o aumento da concentração de aminoácidos livres, que, por sua vez, sintetizarão novas proteínas com funções enzimáticas específicas, dependentes do código genético do esporo, iniciando o processo de germinação.

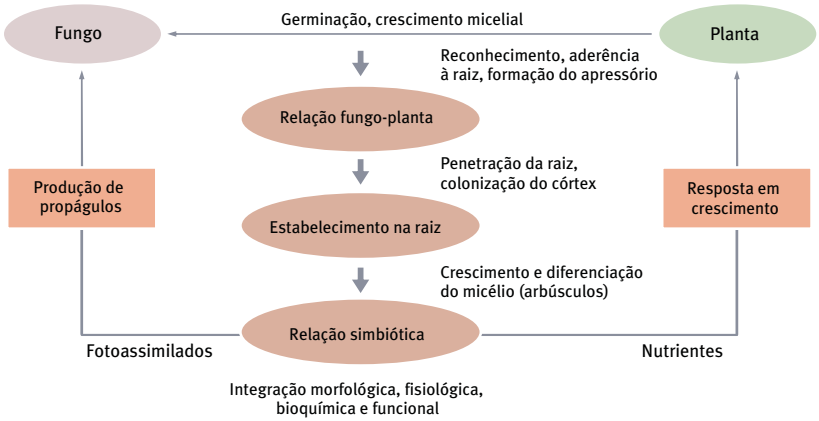


Figura 6. Estabelecimento da relação simbiótica.

Fonte: adaptado de Moreira e Siqueira (2002).

Ainda de acordo com Moreira e Siqueira (2002), que revisaram em sua obra os estudos conduzidos nessa linha, o estabelecimento da relação segue a partir da ativação e crescimento assimbiótico não só dos esporos, mas dos segmentos de raízes infectados e das hifas do solo, que constituem as demais formas de propágulo dos FMAs. A etapa seguinte é o crescimento micelial na rizosfera, com a propaga-

ção das hifas infectivas e o contato destas com as raízes. Nesse ponto, forma-se o apressório, uma diferenciação da hifa infectiva, que é a primeira e mais importante resposta fenotípica do reconhecimento entre os hospedeiros. Plantas não-hospedeiras dos FMAs não formam apressórios funcionais.

Em seguida, ocorrem a colonização do córtex e a penetração intracelular e o estabelecimento da micorriza, com a formação das vesículas e arbúsculos, iniciando o mutualismo. Como comentado anteriormente, arbúsculos são estruturas de troca e transferência de nutrientes e carbono (C), a partir dos quais os fungos acessam o suprimento de fotoassimilados das plantas. Surgem da diferenciação das hifas e são efêmeros, durando de 4 a 5 dias. Já as vesículas ocorrem apenas em membros da família Glomaceae e são estruturas globosas, também resultantes da diferenciação de hifas, que possuem função de reserva, sendo ricas em lipídeos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

A penetração decorre da pressão mecânica e da degradação enzimática parcial da parede do hospedeiro pela ação de pectinases, celulases e hemicelulases do fungo. A quantidade de enzimas, entretanto, é muito menor que a produzida por fungos fitopatogênicos. A menor quantidade de enzimas produzidas localizadamente garante a integridade do tecido hospedeiro e evita a ativação do sistema de defesa vegetal (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

A partir das raízes colonizadas, o micélio externo se expande formando uma rede de hifas que irá garantir a absorção de nutrientes e água, bem como os eventos de colonização secundária e formação de novos esporos.

Para cada estádio, ocorrem estímulos, como a liberação de exudatos radiculares (flavonoides, isoflavonoides, ácidos fenólicos, hormônios vegetais), respostas específicas e mecanismos de controle das plantas (FORTIN et al., 2002; PARNISKE, 2008). Todas essas fases estão sobre estrito controle genético dos simbiontes. Já em 1990, Toth e colaboradores afirmavam que o controle genético, tanto nos vegetais como nos fungos, era provavelmente a característica mais importante na determinação da condição micorrízica, sendo os fatores ambientais de importância secundária.

Atualmente sabe-se que ocorrem sucessivos ciclos de germinação de esporos e retração de núcleo e citoplasma, os quais podem ocorrer

nos FMAs, e também que o desenvolvimento das hifas se modifica na presença de sinais derivados das plantas. Os efeitos estimulatórios dos exudatos radiculares são estudados há tempos, mas a identificação molecular dos chamados fatores de ramificação é recente. Entre esses, os hormônios vegetais estrigogalactonas. Os fungos também possuem moléculas sinalizadoras que induzem respostas específicas na raiz hospedeira, chamados genericamente de fatores *Myc* (PARNISKE, 2008).

Principal efeito nutricional da simbiose nas plantas – absorção de fósforo

A colonização pelos fungos micorrízicos arbusculares (MA) promove a tolerância a estresses bióticos ou abióticos, aumentando o crescimento e produtividade das plantas. Enquanto as plantas fornecem ao fungo carboidratos, os fungos exploram água e minerais do solo mais eficientemente, e os fornece efetivamente às plantas, particularmente sob condições de limitação de nutrientes (SMITH; SMITH, 1990; KOTHARI et al., 1990).

Os benefícios da associação simbiótica das plantas com os fungos micorrízicos na nutrição fosfatada, principalmente aumentando a eficiência de aquisição do P, são extensivamente descritos na literatura. Outros nutrientes ou formas menos móveis no solo também têm sua aquisição potencializada pela associação micorrízica, como zinco (Zn), cobre (Cu) (LIU et al., 2000) e nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_4^+$) (AMES et al., 1983; JOHANSEN et al., 1994; PEREIRA et al, 1996). A rede de hifas fúngicas, pela sua dimensão, chegando até a 100 m de hifas/cm^3 (MILLER et al., 1995), está em posição ideal para absorver eficientemente água e nutrientes do solo. Os fungos possuem também transportadores específicos envolvidos nesse processo, entre os quais, os de P, NH_4+ e Zn já foram identificados e até mesmo clonados (PARNISKE, 2008).

De acordo com Smith e Read (1997), as possíveis explicações para os benefícios na nutrição fosfatada são as seguintes: (a) as hifas dos fungos micorrízicos são capazes de absorver o P da solução do solo e translocá-lo para as raízes, em processo muito mais rápido que a difusão desse elemento pelo solo, sendo capazes de transpor as zonas de

depleção de P que se formam em volta das raízes. A produção de hifas envolve um menor consumo de carbono (C) por unidade de comprimento ou área de absorção, e seu menor diâmetro permite que elas penetrem em poros do solo de diâmetro menor que as raízes, aumentando assim o volume de solo explorado; (b) as hifas são mais efetivas, em consequência de seu tamanho e distribuição espacial, em competir com os microrganismos de vida livre do solo pelo P recentemente mineralizado ou solubilizado; (c) a cinética de absorção de P nas hifas difere da apresentada pelas raízes, com valores mais baixos de Km, possibilitando, portanto, absorção mais efetiva do P em concentrações nas quais a aquisição pelas raízes já tenha cessado; (d) raízes micorrizadas podem usar fontes de P que não estejam disponíveis para as raízes.

Em função dessas características, a simbiose micorrízica constitui um mecanismo adaptativo que permite maximizar a aquisição do P de uma forma que dispende menos energia que a própria produção de raízes (CHAPIN III, 1980).

A colonização das raízes pelos fungos micorrízicos aumenta quando as concentrações de P do solo e das raízes são baixas e a fertilização fosfatada afeta adversamente o desenvolvimento de arbúsculos, vesículas, hifas externas e esporos (SYLVIA; NEAL, 1990), reduzindo os benefícios e a dependência micorrízica de uma planta, que certamente estão relacionados com a fertilidade do solo (PLENCHETTE et al., 1983). Atributos da planta, como comprimento e massa de raízes e relação raiz/parte aérea, também controlam a dependência micorrízica, apresentando com essa última uma relação inversa (KOIDE et al., 1988). Outros fatores ambientais podem influenciar a colonização como pesticidas, umidade do solo, pH e até mesmo a intensidade de luz (AZCÓN; OCAMPO, 1981).

Avanços em pesquisas em fungos micorrízicos na Embrapa Cerrados

A pesquisa em fungos micorrízicos na Embrapa Cerrados centrou-se, principalmente, em micorrizas arbusculares, tendo-se iniciado em 1977 com trabalhos sobre alternativas ao manejo da fer-

tilidade do solo e maior eficiência na utilização dos fertilizantes fosfatados. Esses estudos, conduzidos com diferentes espécies vegetais, demonstraram que as respostas das culturas a adubos fosfatados podem ser maximizadas pela presença de fungos micorrízicos no solo, dependendo das doses (MIRANDA, 1982; MIRANDA et al., 1984) e fontes utilizadas (REIN; MIRANDA, 1995; MIRANDA; MIRANDA, 2003). Nessa linha, foram conduzidos estudos com fontes de fósforo (P) de granulometria e solubilidade variadas. Em todas as áreas de pesquisa com FMAs na Embrapa Cerrados, os projetos pautaram em duas linhas principais: o manejo dos fungos micorrízicos arbusculares nativos nos sistemas de produção e o processo de sua inoculação.

O efeito dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) no uso de outros fertilizantes também foi estudado, verificando-se que a presença de micorriza potencializa, igualmente, a resposta aos adubos potássicos solúveis ou de rochas. Para as rochas potássicas moídas, o efeito seria consequência da dissolução das mesmas, acelerada pela remoção de nutrientes e adição de ácidos pela micorriza arbuscular (ANDRADE et al., 2005).

Confirmou-se também que os fungos micorrízicos alteram a eficiência de corretivos. Miranda e Miranda (1997) mostraram que a presença dos (FMAs) maximiza a resposta das culturas ao calcário, e também que a condição micorrízica natural do solo pode interferir diretamente na resposta das culturas à calagem e alterar interpretações e recomendações quanto ao manejo do calcário para a correção da acidez do solo.

Estudando o efeito da calagem sobre a comunidade micorrízica do solo, Miranda e Miranda (2003) também mostraram a variação quantitativa (número de esporos) em função das doses de calcário aplicadas, com aumento gradativo da esporulação da comunidade micorrízica até a dose de 4 t/ha e decréscimo da população a partir dessa dose. Em outro importante estudo, Miranda et al. (2005) verificaram o comportamento diferencial das espécies de FMAs *Acaulospora scrobiculata*, *Glomus etunicatum* e *Glomus manihotis* em função da elevação na saturação de bases proporcionada por diferentes níveis de calagem.

O efeito das micorrizas arbusculares no processo de fixação biológica de nitrogênio também foi estudado, verificando-se benefícios sob

condições de extrema deficiência de P (FARIA, 1998). Outros resultados interessantes nessa linha versam sobre a influência da condição micorrízica da planta na competição entre estirpes eficientes de rizóbio pela ocupação dos nódulos nas raízes (OLIVEIRA, 1998).

Os efeitos no crescimento de diferentes culturas e espécies forrageiras (sorgo, soja, mandioca, estilosantes, andropogon, entre outras) e no aumento da produção de grãos de cereais como milho, feijão e soja pela inoculação das áreas ou pelo aumento da comunidade nativa dos FMAs por práticas de manejo específicas também foram descritos em estudos conduzidos entre as décadas de 1980 e 2000 (MIRANDA, 1982; 1992; MIRANDA; MIRANDA, 1997, 2000, 2002, 2004, 2007; MIRANDA et al., 2001).

Outra importante linha de trabalho conduzida na Embrapa Cerrados trata do efeito dos FMAs na produção de mudas. A maioria das espécies arbóreas tropicais, frutíferas e florestais, nativas e exóticas à região do Cerrado passa pela fase de formação de mudas em canteiros ou viveiros antes de serem transplantadas para o campo. O benefício da associação micorrízica e da inoculação, bem como a combinação FMAs e planta hospedeira mais adequada, foram determinados para diferentes espécies, tais como pequi, mangaba, buriti, gueroba, manga, graviola, maracujá, acerola, entre outras (MIRANDA; MIRANDA, 2000; 2001).

Alguns estudos com FMAs foram conduzidos também nos temas de recuperação áreas degradadas e controle biológico. A contribuição determinante de fungos nativos no estabelecimento de uma gramínea também nativa (*Aristida setifolia*) em áreas degradadas no Cerrado foi descrita, com efeitos altamente significativos no crescimento dessa planta (MARTINS et al., 1999).

O efeito dos fungos como agentes de controle biológico foi demonstrado especificamente com o nematoide *Meloidogyne javanica* (DIEDERICHS, 1987), que parasita diversas plantas cultivadas em solos de Cerrado, como soja, feijão, milho, mandioca e arroz, entre outras. A ação dos FMAs como agentes de biocontrole, amenizando os danos causados por fitopatógeno, pode ser pela melhoria do estado nutricional das plantas e (ou) pela maior resistência do sistema radicular.

Estudos valiosos para o manejo das populações de FMAs foram realizados com identificação da dependência micorrízica e capacidade de multiplicação desses fungos por parte de várias culturas anuais ou perenes, entre gramíneas e leguminosas em solos com baixa disponibilidade de P (MIRANDA; MIRANDA, 2004). Estratégias de utilização de culturas multiplicadores desses fungos e dependentes da simbiose são muito importantes em situações onde se necessita aumentar as populações dos mesmos.

Nesse período, foram encontradas nos solos de Cerrado e descritas duas novas espécies de fungos micorrízicos arbusculares: *Scutellospora cerradensis* (SPAIN; MIRANDA, 1996a) e *Paraglomus brasilianum* (SPAIN; MIRANDA, 1996b). Essas espécies estão depositadas e registradas na Coleção Internacional de Culturas de Fungos Micorrízicos Arbusculares e Vesículo-Arbusculares, no Banco europeu de Glomales e no Banco Ativo de Glomales da Embrapa Agrobiologia.

Outras importantes pesquisas realizadas e avanços alcançados nas três primeiras décadas de micorrizologia da Embrapa Cerrados encontram-se bem descritos e documentados em Miranda (2008).

As atividades de pesquisa atuais têm se concentrado em estudos de ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares e avaliação do potencial de inóculo desses importantes microrganismos em sistemas de produção agroecológicos e de baixo uso de insumos externos e em ecossistemas naturais em áreas de agricultores familiares do estado de Goiás e no norte de Minas, em área de transição dos biomas Cerrado e Caatinga. Essas avaliações estão sendo conduzidas em projetos em andamento, considerando a grande contribuição dos FMAs na aquisição de nutrientes em baixas concentrações ou em formas menos disponíveis para as plantas.

Paralelamente tem-se avaliado a ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares e o potencial de inóculo de áreas de solos ultramáficos com diferentes disponibilidades de níquel (Ni), colaborando em projetos que objetivam estudar as relações entre metais do solo e a biodiversidade no Cerrado visando à conservação ambiental e a recuperação de áreas degradadas. Com esse estudo, pretende-se estimar as diferenças quantitativas na população de FMAs em áreas distintas quanto à disponibilidade de Ni e sob o efeito de plantas hiperacumu-

ladoras ou não do metal, que ocorrem na região. Os padrões de colonização micorrízica dessas plantas também estão sendo avaliados.

Os estudos sobre o potencial desses fungos como agentes de controle biológico de nematoides terá continuidade, enfocando agora os do gênero *Pratylenchus*. A determinação da glomalina em estudos de parâmetros bioindicadores de qualidade de solo será iniciada em 2010 e pretende-se também incluir as técnicas moleculares de forma complementar às identificações morfológicas dos FMAs, enriquecendo enormemente os estudos de ecologia desses organismos nos diferentes agroecossistemas do Bioma Cerrado.

Considerações finais

As pesquisas sobre fungos micorrízicos arbusculares e sua simbiose com as plantas terrestres tiveram início há mais de um século e se desenvolveram dentro das mais variadas vertentes das ciências biológicas e agrárias. As temáticas não se esgotam e os fundamentos e benefícios dessa associação seguem instigando os cientistas, apesar das limitações metodológicas decorrentes do caráter biotrófico obrigatório da simbiose.

As biotecnologias, incluindo os métodos enzimáticos e moleculares, representam ferramentas importantes para o progresso das pesquisas em micorrizas, permitindo elucidar desde aspectos evolucionários e ecológicos da simbiose, até a participação desses importantes fungos na eficiência e sustentabilidade ambiental de sistemas de produção agroalimentares.

A identificação de genes e sinais envolvidos na infecção e estabelecimento da colonização, a diversidade da população dos FMAs associados às diferentes espécies vegetais e os padrões de colonização das plantas representam um universo enorme para as pesquisas em ecologia, e estudos nessa linha vem sendo conduzidos em todo o mundo. A função dessa simbiose no aproveitamento dos fertilizantes e nutrientes, bem como nos aspectos de conservação de solo e armazenamento de carbono pela glomalina, apresentam-se como estratégias de manejo de agroecossistemas condizentes com as demandas atuais da agricultura em aliar a produtividade com a conservação ambiental. Nesse sentido, a potencialização dessa associação pelo uso de espécies

vegetais que a promovam e a combinação dessas com novas fontes de nutrientes é de inestimável valor. Esses desafios e as aplicações dessa simbiose mantém as pesquisas em micorrizas bastante atuais e motivadoras, pelo potencial de agregação das diferentes áreas de conhecimento e pelos importantes avanços que ainda se pode conseguir.

Referências

ANDRADE, L. R. M.; MIRANDA, J. C. C.; FALEIRO, A. S. G.; NASCIMENTO, M. T.; SOBRINHO, D. A.; SILVA, H. C. Efeitos de rochas potássicas e fungos micorrízicos arbusculares no crescimento de plantas de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISIOLOGIA VEGETAL, 10. ; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE FISIOLOGIA VEGETAL, 12., 2005, Recife. **Anais**... Recife: SBFV, 2005. 1 CD-ROM.

AMES, R. N.; REID, C. P. P.; PORTER, L. K.; CAMBARDELLA, C. Hyphal uptake and transport of nitrogen from two ^{15}N-labelled sources by *Glomus mosseae*, a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. **New Phytologist**, London, v. 95, p. 381-396, 1983.

APPOLONI, S.; LEKBERK, Y; TERCEK, M. T.; ZABINSKI, C. A.; REDECKER, D. Molecular community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of geothermal soils in Yellowstone National Park (USA). **Microbial Ecology**, New York, v. 56, p. 649–659, 2008.

AZCÓN, R.; OCAMPO, J. A. Factors affecting the vesicular : arbuscular infection and mycorrhizal dependency of thirteen wheat cultivars. **New Phytologist,** London, v. 87, p. 677-685, 1981.

BAGO, B.; PFEFFER, P. E.; SHACHAR-HILL, Y. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. **Plant Physiology,** Bethesda, v. 124, p. 949-958, 2000.

BEVER, J. D.; MORTON, J. B.; ANTONOVICS, J.; SCHULTZ, P. A. Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. **Journal of Ecology,** Oxford, v. 84, p. 71-82, 1996.

BRUNS, T. D.; GARDES, M. Molecular tools for indentification of ectomycorryzal fungi-Taxon-specific oligonucleotide probes for suilloid fungi. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 2, p 1-10, 1993.

CHAPIN III, F. S. The mineral nutrition of wild plants. **Annual Review of Ecology and Systematics,** Palo Alto, v. 11, p. 233-260, 1980.

CLAPP, B. J. P.; YOUNG, J. P. W.; MERRYWEATHER, J. W.; EITTER, A. H. Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. **New Phytologist,** Oxford, v. 130. p. 259-265, 1995.

COOLEN, W. R. Methods for the extraction of *Meloydogine* spp. and other nematodes from roots and soil. In: LAMBERTI, F.; TAYOR, C. E. (Ed.). **Root-knot nematodes (m**eloidogyne species**):** systematics, ecology and control. London: Academic Press, 1979. p. 317-329.

CORNEJO, P.; AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J. M.; FERROL, N. Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Haren, v. 241, p. 265–270, 2004.

DICKIE, I. A.; FITZJOHN, R. G. Using terminal restriction fragment length olymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi: a methods review. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 17, p. 259–270, 2007.

DIEDERICHS, C. Interaction between five endomycorrhizal fungi and the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on chickpea under tropical conditions. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 64, p. 353-355, 1987.

FARIA, F. C. **Efeitos de associações micorrízicas na eficiência e competitividade de estirpes de rizóbio no feijoeiro.** 1998. 105 f. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília, Brasília, DF.

FORTIN, J. A.; BÉCARD, G.; DECLERCK, S.; DALPÉ, Y.; ST-ARNAUD, M.; COUGHLAN, A. P.; PICHÉ, Y. Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. **Canadian Journal of Botany,** Ottawa, v. 80, p. 1-20, 2002.

FREY, B.; VILARINA, A.; SCHÜEPP, H.; ARINES, J. Chitin and ergosterol content of extraradical and intraradical mycelium of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *glomus intraradices*. **Soil Biology and Biochemistry,** Oxford, v. 26, p. 711-717, 1994.

GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 46, p. 235-244, 1963.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques to measuring vesicular arbuscular infection in roots. **New Phytologist,** Oxford, v. 84, p. 489-500, 1980.

GIOVANNETTI, M.; SBRANA, C.; AVIO, L.; STRANI, P. Patterns of belowground plant interconnections established by means of arbuscular mycorrhizal networks. **New Phytologist**, London, v. 164, p. 175-181, 2004.

GOI, S. R.; SOUZA, F. A.; Diversidade de microrganismos do solo. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, p. 46-65, 2006

HAYMAN, D. S. Influence of soils and fertility on activity and survival of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Phytopatology**, St. Paul, v. 72, p. 1119-1125, 1982.

HECKMAN, D. S.; GEISER, D. M.; EIDELL, B. R.; STAUFFER, R. L.; KARDOS, N. L. HEDGES, S. B. Molecular evidence for the earlycolonization of land by fungi and plants. **Science,** Washington, v. 293, p. 1129-1133, 2001.

VAN DER HEIDJEN, M. G. A.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; SANDERS, I. R. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. **Ecology,** Tempe, v. 79, p. 2082-2091, 1998.

HUSBAND, R.; HERRE, E. A.; TURNER, S. L.; GALLERY, R.; YOUNG, J. P. W. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and patterns of host association over time and space in a tropical forest. **Molecular Ecology**, New York, v. 11, p. 2669-2678, 2002.

INVAM. **International culture collection of arbuscular and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi.** Disponível em: <http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/classification.htm>. Acesso em 10 jul 2008.

JAKOBSEN, I.; ABBOTT, L. K.; ROBSON, A. D. External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. : 1. spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. **New Phytologist**, Oxford, v. 120, p. 317-380, 1992.

JANOS, D. P.; GARAMSZEGI, S.; BELTRAN, B. Glomalin extraction and measurement. **Soil Biology and Biochemistry,** Oxford, v. 40, p. 728-739, 2008.

JOHANSEN, A.; JAKOBSEN, I.; JENSEN, E. S. Hyphal N transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus associated with cucumber grown at three nitrogen levels. Plant and Soil, Dordrecht, v. 160, p. 1-9, 1994.

JOHNSON, D.; VANDENKOORNHUYSE, P. J.; LEAKE, J. R.; GILBERT, L.; BOOTH, R. E.; GRIME, J. P.; YOUNG, P. W.; READ, D. J. Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. **New Phytologist**, Oxford, v. 161, p. 503–515. 2003.

KOIDE, R. T; LI, M.; LEWIS, J.; IRBY, C. Role of mycorrhizal infection in the growth and reproduction of wild vs. cultivated plants. I. Wild vs. cultivated oats. **Oecologia,** Berlin, v. 77, p. 537-543, 1988.

KOSKE, R. E; GEMMA, J. N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research,** Cambridge, v. 92, p. 488-505, 1989.

KOTHARI, S. K.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. Direct and indirect effects of VAM fungi and rizosphere microorganisms on acquisition of mineral nutrients by maize (*Zea mays* L.) in a calcareous soil. **New Phytologist,** London, v. 116, p. 637-645,1990.

KRIVTSOV, V.; GRIFFITHS, B. S.; SALMOND, R.; LIDDELL, K.; GARSIDE, A.; BEZGINOVA, T.; THOMPSON, J. A.; STAINES, H. J.; WATLING, R.; PALFREYMAN, J. W. Some aspects of interrelations between fungi and other biota in forest soil. **Mycological Research,** Cambridge, v. 108, p. 933-946, 2004.

LIU,A.; HAMEL, C.; HAMILTON, R. I.; MA, B. L.; SMITH, D. L. Acquistion of Cu, Zn, Mn and Fe by mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) grown in soil at different P and micronutrient levels. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 9, p. 331-336, 2000.

LONGATO, S.; BONFANTE, P. Molecular identification of mycorrhizal fungi by direct amplification of microsatellite regions. **Mycological Research**, Cambridge, v. 101, p.425–432, 1997.

LOVELOCK, C. E.; WRIGHT, S. F.; NICHOLS, K. A. Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphal growth: an example from a tropical rain forest soil. **Soil Biology and Biochemistry,** Oxford, v. 36, p. 1009-1012, 2004.

MA, W. K.; SICILIANO, S. D.; GERMIDA, J. J. A PCR-DGGE method for detecting arbuscular mycorrhizal fungi in cultivated soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 1589–1597, 2005.

MARTINS, C. R.; MIRANDA, J. C. C.; MIRANDA, L. N. Contribuição de fungos micorrízicos arbusculares nativos no estabelecimento de A*ristida setifolia* kunth em áreas degradadas no cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v. 34, p. 665-674, 1999.

MILLER, R. M.; REINHARDT, D. R.; JASTROW, J. D. External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. **Oecologia,** Berlin, v. 103, p. 17-23, 1995.

MIRANDA, J. C. C. Influência de fungos endomicorrízicos inoculados a campo, na cultura de sorgo e soja em um solo sob Cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** Campinas, v. 6, p. 19-23, 1982.

MIRANDA, J. C. C. **A endomicorriza na região dos Cerrados:** uma revisão. Planaltina, DF: CPAC, 1992. 35 p. (Embrapa CPAC. Documentos, 42).

MIRANDA, J. C. C. **Cerrado:** micorriza arbuscular: ocorrência e manejo. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. 169 p.

MIRANDA, J. C. C.; MIRANDA, L.N. Micorriza Arbuscular. In: VARGAS, M.A.A; HUNGRIA, M. (Ed.). **Biologia dos solos dos Cerrados.** Planaltina, DF: Embrapa-CPAC, 1997. p. 69-123.

MIRANDA, J. C. C.; MIRANDA, L. N. **Introdução da tecnologia de inoculação com fungos micorrízicos arbusculares na produção de mudas em viveiros.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2000. 4 p. (Embrapa Cerrados. Comunicado Técnico, 24).

MIRANDA, J. C. C.; MIRANDA, L. N. **Seleção e recomendação de uso de espécies de fungos micorrízicos arbusculares.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2001. 3 p. (Embrapa Cerrados. Comunicado Técnico, 52).

MIRANDA, J. C. C.; MIRANDA, L. N. **A importância da micorriza arbuscular para o cultivo da soja na região dos Cerrados.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002. 4 p. (Embrapa Cerrados. Comunicado Técnico, 75).

MIRANDA, J. C. C.; MIRANDA, L. N. **Contribuição da micorriza arbuscular na resposta das culturas à calagem e adubação fosfatada em solos de cerrado.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2003. 4 p. (Embrapa Cerrados. Comunicado Técnico, 89).

MIRANDA, J. C. C.; MIRANDA, L. N. **Dependência micorrízica de diferentes culturas anuais, adubos verdes e pastagens e solos de Cerrado.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2004. 4 p. (Embrapa Cerrados. Comunicado Técnico, 114).

MIRANDA, J. C. C.; MIRANDA, L. N. **Contribuição da micorriza arbuscular para a produtividade e sustentabilidade nos sistemas de produção com plantio direto no Cerrado**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. (Embrapa Cerrados. Comunicado Técnico, 134).

MIRANDA, J. C. C.; FIALHO, J. F.; MIRANDA, L. N. **Importância da micorriza arbuscular para o cultivo da mandioca na região do Cerrado**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. 4 p. (Embrapa Cerrados. Comunicado Técnico, 119).

MIRANDA, J. C. C.; MIRANDA, L. N. VILELA, L., VARGAS, M. A.; CARVALHO, A. M. **Manejo da micorriza arbuscular por meio da rotação de culturas nos sistemas agrícolas do Cerrado.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2001. 3 p. (Embrapa Cerrados. Comunicado Técnico, 42).

MIRANDA, J. C. C.; SOUSA, D. M. G.; MIRANDA, L. N. Influência de fungos endomicorrízicos vesicular-arbusculares na absorção de fósforo e no rendimento de matéria seca de plantas de sorgo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 8, p. 31-36, 1984.

MIRANDA, J. C. C.; LOBATO, E.; MIRANDA, L. N. Dinâmica e contribuição da micorriza arbuscular na resposta de uma gramínea forrageira à adubação fosfatada. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29., 2003, Ribeirão Preto. **Resumos expandidos.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo: Universidade Estadual de São Paulo, 2003. 1 CD-ROM.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. 626 p.

MORTON, J. B. Underestimation of most probable numbers of vesicular-arbuscular endophytes because non-staining mycorrhizae. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 17, p. 383-384, 1985.

MORTON, J. B.; BENNY, G. L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, *Glomales*, **two new suborders,** *Glomineae* **and** *Gigasporineae*, **and two new families,** *Acaulosporaceae* **and** *Gigasporaceae*, **with an emendation of** *Glomaceae*. **Mycotaxon, Ithaca, v. 37, p. 471-491, 1990.**

MORTON, J. B.; REDECKER, D. **Two new families of glomales, archaeosporaceae and paraglomaceae, with two new genera Archaeospora and Paraglomus, based on concordant molecular and morphological characters. Mycologia, New York, v. 93, p. 181-195, 2001.**

MUMMEY, D. L., RILLIG, M. C., HOLBEN, W. E. Neighboring plant influences on arbuscular mycorrhizal fungal community composition as assessed by T-RFLP analysis. **Plant and Soil**, The Hague, v. 271, p. 83–90, 2005.

NOVAIS, C. B. de. **Colonização, esporulação e caracterização fenotípica e molecular de fungos micorrízicos arbusculares mantidos em cultura.** 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

NYLUND, J. E.; WALLANDER, H. Ergosterol analysis as a means of quantifying mycorrhizal biomass. In: NORRIS, J. R.; READ, D. J.; VARMA, A. K. **Methods in microbiology:** techniques for mycorrhizal research. London: Academic Press, 1994. p. 537-548.

OLIVEIRA, R. S. **Alterações na dinâmica da competição entre estirpes de rizóbio pelos sítios de nodulação nas raízes de soja e suas consequências no crescimento da planta causadas por fungo micorrízico arbuscular.** 1998. 75 f. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília, Brasília, DF.

OLIVEIRA, C. A.; SA, N. M. H; GOMES, E. A.; MARRIEL, I. E.; SCOTTI, M. R.; GUIMARÃES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; ALVES, V. M. C. Assessment of the mycorrhizal community in the rhizosphere of maize (Zea mays L.) genotypes contrasting for phosphorus efficiency in the acid savannas of Brazil using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 41, p. 249 – 258, 2009.

OLSSON, P. A.; LARSSON, L.; BAGO, B.; WALLANDER, H.; VAN AARLE, I. M. Ergosterol and fatty acid for biomass estimates of mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Oxford, v. 159, p. 7-10, 2003.

PACIONI , G. Wet sieving and decanting techniques for the extraction of spores of vesicular –arbuscular fungi. In: NORRIS, J. R.; READ, D. J.; VARMA, A. K. **Methods in microbiology:** techniques for mycorrhizal research. London: Academic Press, 1994. p. 777-782.

PARNISKE, M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. **Nature Rewiews,** London, v. 6, p. 763-775, 2008.

PAULA, M. A.; SIQUEIRA, J. O.; OLIVEIRA, L. H.; OLIVEIRA, E. Efetividade simbiótica relativa em soja de populações de fungos endomicorrízicos nativos e de isolados de g*lomus macrocarpum* e g*igaspora margarita*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** Campinas, v. 12, p. 25-31, 1988.

PEREIRA, E. G.; SIQUEIRA, J. O.; CURI, N.; MOREIRA, M. F. S.; PURCINO, A. A. C. Efeitos da micorriza e do suprimento de fósforo na atividade enzimática e na resposta de espécies arbóreas ao nitrogênio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 8, n. 1, p. 59-65, 1996.

PLENCHETTE, C.; FORTIN, J. A.; FURLAN, V. Growth responses of several plant species to mycorrhizal in a soil of moderate P - fertility. I. Mycorrhizal dependency under field conditions. **Plant and Soil,** Dordrecht, v. 70, p. 199-209, 1983a.

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society,** London, v. 55, p. 158-161, 1970.

PORTER, W. M. The "most probable number" method for enumerating infective propagules of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soil. **Ustralian Journal of Soil Research,** Victoria, v. 17, p. 515-519, 1979.

RABERG, G. U.; HÖGBERG, N. O. S.; LAND, C. J. Detection and species discrimination using rDNA T-RFLP for identification of wood decay fungi. **Holzforschung**, Berlin, v. 59, n. 6, p.696–702, 2005.

REIN, T. A.; MIRANDA, J. C. C. Variação na resposta à micorriza arbuscular em função da granulometria do fertilizante fosfatado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 25., 1995. Viçosa. **Resumos expandidos.** Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1995. v. 1, p. 415-417.

RENKER, C.; BLANKE, V.; BUSCOT, F. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grassland spontaneously developed on area polluted by a fertilizer plant. **Environmental Pollution, Amsterdam**, v. 135, p. 255–266, 2005.

RENKER, C.; HEINRIDHS, J.; KALDORF, M.; BUSCOT, F. Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 13, p. 191-198, 2003.

RILLIG, M. C.; FIELD, C. B.; ALLEN, M. F. Soil biota responses to long-term atmospheric CO2 enrichment in two California annual grassland. **Oecologia**, Berlin, v. 119, p. 572-577, 1999.

RILLIG, M. C.; WRIGHT, S. F., NICHOLS, K. A., SCHMIDT, W. F.; TORN, M. S. Large contribution or arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 233, p. 167-177, 2001.

RILLIG, M. C.; RAMSEY, P. W.; MORRIS, S.; PAUL, E. A. Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change. **Plant and Soil**, The Hague, v. 253, p. 293-299, 2003.

RODRIGUEZ-ECHEVERRIA; FREITAS, H. Diversity of AMF associated to ammophila arenaria ssp. arundinacea in portuguese sand dunes. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 16, p. 543-552, 2006.

ROSENDAHL S.; SEN, R. Isozyme analysis of mycorrhizal fungi and their mycorrhiza. **Methods in Microbiology**, Amsterdam, v. 24, p. 169-194, 1992.

ROSIER, C. L.; HOYE, A. T.; RILLIG, M. C. Glomalin-related soil protein: assessment of current detection and quantification tools. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 2205-2211, 2006.

SALLES, J. F.; SOUZA, F. A. **Revisões em micorriza I:** técnicas moleculares aplicadas ao estudo dos fungos micorrízicos arbusculares. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, nov. 1998. 24 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 68).

SANDERS, I. R.; FITTER, A. H. Evidence for differential responses between host fungus combinations of vesicular mycorrhizas from a grassland. **Mycological Research**, Lancaster, v. 96, p. 415-419, 1992.

SCHENCK, N. C. **Methods and principles of mycorrhizal research**. 2nd. ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1984. 244 p.

SCHÜßLER A.; SCHWARZOTT D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 1413–1421, 2001.

SIEVERDING, E. **Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems.** Eschborn: Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit, 1991. 371 p.

SIMON, L.; LALONDE, M.; BRUNS, T. D. Specific amplification of 18S fungal ribossomal genes from vesicular arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 1, p. 291-295, 1992.

SIMON, L.; LÉVESQUE, R. C.; LALONDE, M. Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation polymorphismpolymerase chain reaction. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 12, p. 4211-4215, 1993.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**. San Diego: Academic Press, 1997. 603 p.

SMITH, S. E.; SMITH, F. A. Structure and function of the interfaces in biotrophic symbiosis as they relate to nutrient transport. **New Phytologist**, London, v. 114, n. 1, p. 1-38, 1990.

SPAIN, J. L.; MIRANDA, J. C. C. Scutellospora cerradensis: an ornamented species in the Gigsaporaceae (Glomales). **Mycotaxon**, Ithaca, v. 60, p. 129-136, 1996a.

SPAIN, J. L.; MIRANDA, J. C. C. Glomus brasilianum: an ornamented species in the *Gigsaporaceae*. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 60, p. 137-142, 1996b.

SOLAIMAN; M. D. Z; SAITO, M. Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry. **New Phytologist**, London, v. 136, p. 533-538, 1997.

SOUZA, F. A. de; KOWALCHUK, G. A, LEEFLANG, P; VENN, J. A. ; SMIT, E. P. C. R. Denaturing gradient gel electrophoresis profiling of inter- and intraspecies 18S rRNA gene sequence heterogeneity is an accurate and sensitive method to assess species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of the genus g*igaspora*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 3, p: 1413-1424. 2004.

STREITWOLF-ENGEL, R.; BOLER, T.; WIEMKEN, A.; SANDERS, I. R. Clonal growth traits of two *Prunella* species are determined by occurring arbuscular mycorrhizal fungi from a calcareous grassland. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 85, p. 181-191, 1997.

SYLVIA, D. M. Quantification of external hyphae of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi. In: NORRIS, J. R.; READ, D. J.; VARMA, A. K. **Methods in microbiology:** techniques for mycorrhizal research. London: Academic Press, 1994. p. 513-525.

SYLVIA, D. M.; NEAL, L. H. Nitrogen affects the phosphorus response of VA mycorrhiza. **New Phytologist**, London, v. 115, p. 303-310, 1990.

TALUKDAR, N. C.; GERMIDA, J. J. Growth and yield of lentil and wheat inoculated with 3 *Glomus* isolates from Saskatchewan soils. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 5, p. 145-152, 1994.

TOMMERUP, I.C. Methods for the study of the population biology of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi. In: NORRIS, J.R.; READ, D.J.; VARMA, A.K. **Methods in microbiology:** techniques for mycorrhizal research. London: Academic Press, 1994. p. 483-511.

TONIN C, VANDENKOORNHUYSE P, JONER EJ, STRACZEK J, LEYVAL C. Assessment of arbuscular mycorrhizal fungi diversity in the rhizosphere of Viola calaminaria and effect of these fungi on heavy metal uptake by clover. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 10, p.161–168, 2001.

TORO, T.; SIEVERDING, E. Evaluación cuantitativa y cualitativa de hongos formadores de micorriza vesiculo arbuscular en la región de Mondomo, Colômbia. **Suelos Ecuatoriales**, Colombia, v. 16, n. 1, p. 122-129, 1986.

TOTH, R.; TOTH, D.; STARKE, D.; SMITH, D. R. Vesicular - arbuscular mycorrhizar colonization in *Zea mays* affected by breeding for resistance to funghal pathogens. **Canadian Journal of Botany,** Ottawa, v. 68, n. 5, p. 1039-1044, 1990.

WIDMER, F.; HARTMANN, M.; FREY, B.; KÖLLIKER, R. A novel strategy to extract specific phylogenetic sequence information from community T-RFLP. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 66, p. 512–529, 2006.

WRIGHT, S. F., MORTON, J. B., SWOROBUK, J. E. Identification of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by using monoclonal antibodies in an enzyme-linked immunosorbent assayt. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 9, p. 2222-2225. 1987.

WRIGHT, S. F.; FRANKEE-SNYDER, M.; MORTON, J. B.; UPADHYAYA, A. Time–course study and parcial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrizal fungi during active colonization of roots. **Plant and Soil,** The Hague, v. 181, p. 193-203, 1996.

WRIGHT, S. F.; UPADHYAYA, A. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Science**, Baltimore, v. 161, p. 1-12, 1996.

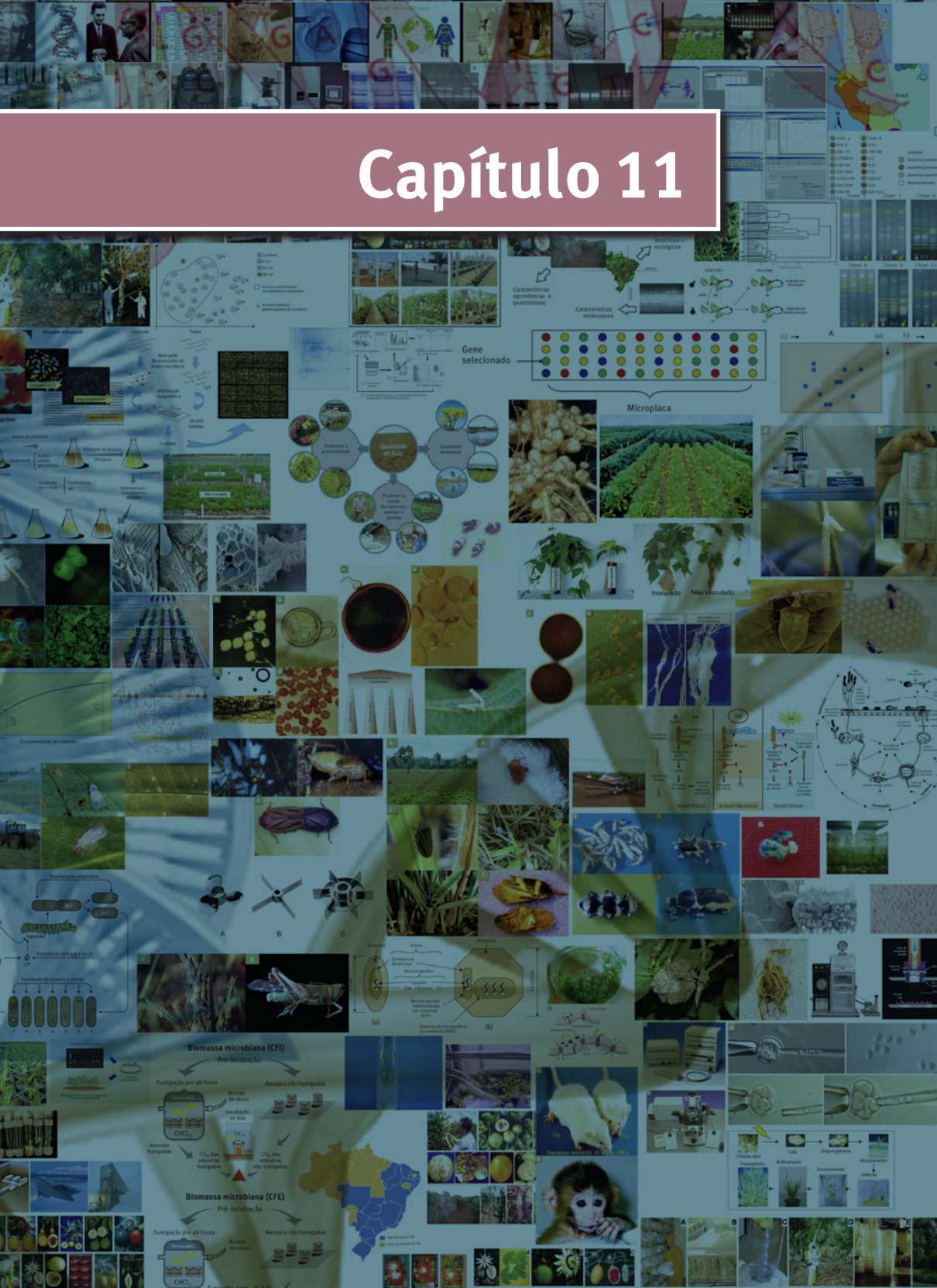
WRIGHT, S. F.; UPADHYAYA, A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil,** The Hague, v. 198, p. 97-107, 1998.

WU, B.; HOGETSU, T.; ISOBE, K.; ISHII, R. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in a primary successional volcanic desert on the southeast slope of Mount Fuji. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 17, p. 495–506, 2007.

WYSS, P.; BONFANTE, P. Amplification of genomic DNA of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi by PCR using short arbitrary primers. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, p. 1351-1357. 1993.

ZHANG, H.; TANG, M.; CHEN, H.; TIAN, Z.; XUE, Y.; FENG, Y. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria in the rhizosphere of caragana korshinkii and hippophae rhamnoides in zhifanggou watershed. **Plant and Soil**, The Hague, v. 326, n. 1-2, 2010.

Capítulo 11


Gene selecionado
Microplaca
Inoculado
Não inoculado
Biomassa microbiana (CFI)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas
Biomassa microbiana (CFE)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas

Biotecnologia aplicada à engenharia de alimentos

Sonia Maria Costa Celestino
Klecius Renato Silveira Celestino

Introdução

A tecnologia da fermentação está concernida com a condução de processos biológicos em escala industrial, fazendo a ligação entre a biologia, a microbiologia, a engenharia química e a engenharia de alimentos. Os processos na tecnologia de fermentação são catalisados ou por células vivas, ou por seus substratos.

O uso da microbiologia para a obtenção de alimentos antecede a Era Cristã; e há milhares de anos, sem saber da existência dos microrganismos, fabricava-se pão, vinho, cerveja, leite fermentado, queijos e outros.

A tecnologia da fermentação iniciou-se com Pasteur, em 1857. Esse descobriu que certas doenças eram causadas por microrganismos e que fermentações alcoólicas também ocorriam na presença deles.

Em 1921, o primeiro antibiótico foi fabricado por *Piocianases*; em 1928, ocorreu a descoberta da penicilina por Fleming; e, na Segunda Guerra Mundial, houve grande avanço na área de biotecnologia, como a fabricação de antibióticos e solventes por meio da condução de processos microbiológicos.

Há cerca de 50 anos, poucos produtos, como bebidas alcoólicas e álcool etílico, eram produzidos em escala industrial, hoje essa produção abrange áreas mais amplas como tratamento de resíduos, obtenção de alimentos e rações, proteínas, enzimas, vitaminas, hormônios, antibióticos, solventes orgânicos, ácidos, polímeros, soros e vacinas.

Engenharia bioquímica

A engenharia bioquímica é o ramo da engenharia que se concentra na condução de processos biológicos em escala industrial, utilizando conhecimentos de microbiologia, bioquímica, termodinâmica, fenômenos de transporte e operações unitárias.

O objetivo da engenharia bioquímica é a aplicação dos conhecimentos até aqui adquiridos na solução de problemas que se apresentam na implantação de processos biotecnológicos em larga escala, e em sua otimização.

O início da engenharia bioquímica se deu após a Segunda Guerra Mundial, quando ocorreu o desenvolvimento em larga escala de processos de produção de alimentos e medicamentos de origem biotecnológica.

Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial

Neste tópico, descrevem-se as características gerais que microrganismos e meios de cultura devem apresentar, para que seja possível utilizá-los em processos de larga escala, ou seja, em biorreatores de grande volume.

O sucesso de um processo biotecnológico depende da combinação de quatro elementos/operações importantes (Figura 1):

a) Microrganismo.
b) Meio de cultura.
c) Condução do processo.
d) Recuperação do produto.

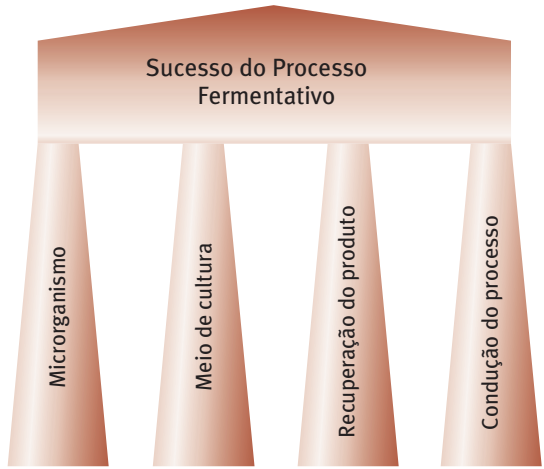


Figura 1. Os pilares do sucesso da tecnologia da fermentação.

O microrganismo terá preferencialmente de apresentar as seguintes características:

1) Ser capaz de produzir o produto desejável e com cinética rápida.
2) Converter altas concentrações de produto.
3) Produzir poucos subprodutos.
4) Ter a possibilidade de ser reutilizável e de uma forma barata.
5) Poder ser estocado em condições não extremas.
6) Trabalhar em condições de fácil condução.
7) Suportar situações de estresse.
8) Não ser patogênico.
9) Não exigir meios de culturas dispendiosos.

As combinações desses fatores devem ser levadas em consideração na escolha do melhor microrganismo para o seu processo biotecnológico.

Microrganismos que possam ter interesse industrial podem ser obtidos basicamente das seguintes formas:

1) Isolamento a partir de fontes naturais.
2) Compra em coleções de culturas.
3) Obtenção de mutantes naturais.
4) Obtenção de mutantes induzidos por métodos convencionais.
5) Obtenção de microrganismos recombinantes por técnicas de engenharia genética.

Já o meio de cultura tem de ter as seguintes características:

1) Atender às necessidades nutricionais do microrganismo.
2) Ser o mais barato possível.
3) Não provocar problemas de recuperação do produto.
4) Auxiliar no controle do processo.
5) Os componentes devem permitir algum tempo de armazenagem, a fim de estarem disponíveis todo o tempo.
6) Ter composição razoavelmente fixa.
7) Não causar dificuldades no tratamento do efluente.

Todas essas características são importantes, enfatizando-se o custo, que deve ser o menor possível, de forma a atender as necessidades nutricionais do microrganismo.

Na Figura 2, apresenta-se a sequência de desenvolvimento de um processo fermentativo, desde a adaptação do microrganismo, até a fermentação em larga escala no biorreator industrial.

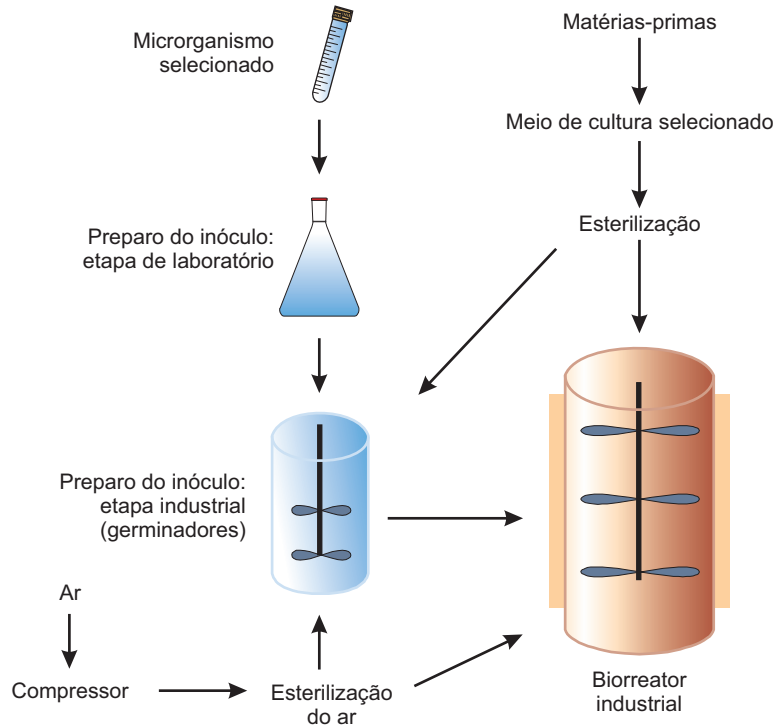


Figura 2. Desenvolvimento de um processo fermentativo.

Estequiometria e cinética microbiana e enzimática

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste inicialmente na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação. Entendem-se como componentes o microrganismo (ou biomassa), os produtos do metabolismo (ou metabólitos) e os nutrientes ou substratos que compõem o meio de cultura.

Esses valores experimentais de concentração (X, P e S, respectivamente), quando representados em função do tempo, permitirão os traçados das curvas de ajuste, conforme ilustrados na Figura 3.

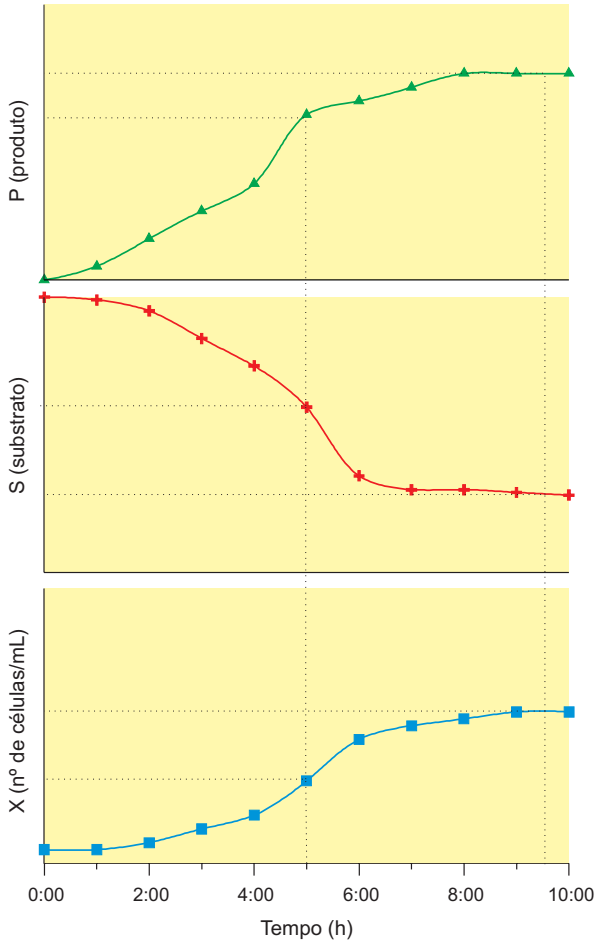


Figura 3. Curvas de ajuste dos resultados de uma experiência idealizada de fermentação (X, P e S são as concentrações do microrganismo, do produto e do substrato residual no meio, respectivamente).

Cinética das fermentações

Microrganismos crescem em um largo espectro de ambientes físicos e químicos; seu crescimento e outras atividades fisiológicas são de fato uma resposta ao seu ambiente físico-químico. A cinética das fermentações descreve o crescimento e a formação de produtos por microrganismos, e não somente o crescimento de células ativas, mas também as atividades de células em repouso, já que muitos produtos de fermentação de interesse comercial são produzidos após o crescimento ter parado.

Crescimento microbiano

O crescimento microbiano é usualmente caracterizado pelo tempo requerido para duplicar massa celular ou número de células. Tempo de duplicação de massa difere do de duplicação de células, pois a massa celular pode aumentar sem um acréscimo no número de células. Todavia, se, em dado ambiente, o intervalo entre duplicações de massa celular ou do número de células é constante com o tempo, o microrganismo está crescendo a uma velocidade exponencial.

Nessas condições, o crescimento é dado por:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

$$\frac{dN}{dt} = \mu_n \cdot N$$

Em que:
X = concentração celular em g/L.
N = concentração celular em células/L.
t = tempo.
μ = velocidade específica do crescimento em h^{-1}.
μ_n = velocidade específica de crescimento em h^{-1}.

Na maioria das circunstâncias, crescimento é medido pelo aumento de massa. O valor μ .X é a taxa de crescimento volumétrico (produtividade volumétrica) em g/L.h.

Integrando:

$$\int_{x_1}^{x_2} \frac{dx}{x} = \mu \cdot \int_{t_1}^{t_2} dt$$

Considerando μ constante, temos o seguinte resultado:

$$\ln \frac{x_2}{x_1} = \mu \cdot \Delta t$$

Quando $\Delta t = t_d$, isto é, o tempo requerido para que $x_2=2x_1$, chamado de tempo de geração ou tempo de duplicação, temos a seguinte expressão;

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu} = \frac{0{,}693}{\mu}$$

Crescimento bacteriano

Bactérias se dividem por fissão ou divisão simples; durante o crescimento, a célula duplica a sua massa e a quantidade de todos os constituintes da mesma. Algumas bactérias, em dadas condições, dividem-se em 15 a 20 minutos, porém os tempos de duplicação típicos são de 45 a 60 minutos.

Crescimento de leveduras

Normalmente as leveduras se multiplicam por brotamento, algumas, por exceção, crescem (multiplicam) por fissão ou por formação de hifas.

Em condições maximizadas, leveduras podem se dividir a cada 45 minutos, porém os tempos de 90 a 120 minutos são os mais típicos.

Descrição química do crescimento microbiano

O crescimento de microrganismos pode ser visto como uma série de reações químicas, levando à síntese da massa celular. A estequio-

metria generalizada para o crescimento celular pode ser descrita de acordo com a reação abaixo:

$$A(C_aH_bO_c) + B(O_2) + D(NH_3) \longrightarrow M(C_\alpha H_\beta O_\gamma N_\delta) + P(CO_2) + Q(H_2O)$$

Em que A, B, D, M, P e Q são os moles dos respectivos compostos; $C_aH_bO_c$ é uma fonte de carbono genérica; o M é o número de moles de uma unidade de célula CαHβOγN. Por exemplo, uma levedura típica pode ser representada por $C_6H_{11}NO_3$. Assim a fração orgânica da célula tem um peso molecular unitário de 145. Se a célula é 90% orgânica e 10% cinzas, o peso molecular global de uma célula unitária é 145/0,9 = 161.

A partir dessa relação estequiométrica, pode-se ver que a relação de massa celular formada pela massa de substrato consumido (M/A), referido como rendimento celular, é dependente da eficiência da utilização da fonte de carbono para a incorporação na massa celular e para a combustão a CO_2 e H_2O, na obtenção de energia para o crescimento (multiplicação).

Exemplo:

Numa fermentação sobre n-tetradecano com vistas à produção de massa celular, uma levedura, *Cândida lipolytica M12*, apresentou os seguintes valores médios dos principais elementos de sua composição celular:

C - 43,76%
H - 6,63%
N - 8,26%
P - 2,25%
O - 33,22%

Calcule a fórmula bruta do microrganismo, considerando que a sua massa molecular é igual a 100.

Resolução:

Para uma unidade de célula $C\alpha H\beta ON_\delta$ temos de calcular a nova composição celular em função de C, H, O e N.

Composição celular em relação ao carbono:

$$\frac{43,76}{43,76+6,63+8,26+33,22} = \frac{43,76}{91,87} = 0,4763x100 = 47,63\%$$

Composição celular em relação ao Hidrogênio:

$$\frac{6,63}{43,76+6,63+8,26+33,22} = \frac{6,63}{91,87} = 0,722x100 = 7,22\%$$

Composição celular em relação ao oxigênio:

$$\frac{33,22}{43,76+6,63+8,26+33,22} = \frac{33,22}{91,87} = 0,3616x100 = 36,16\%$$

Composição celular em relação ao nitrogênio:

$$\frac{8,26}{43,76+6,63+8,26+33,22} = \frac{8,26}{91,87} = 0,090x100 = 9,00\%$$

$12 \cdot \alpha = 47,63 \rightarrow \alpha = 3,96 \cong 4,00$

$1 \cdot \beta = 7,22 \rightarrow \beta = 7,22 \cong 7$

$16 \cdot \gamma = 36,16 \rightarrow \gamma = 2,26 \cong 2$

$14 \cdot \delta = 9,00 \rightarrow \delta = 0,64 \cong 1$

Então a formula bruta do microrganismo é: $C_4H_7O_2N$

Cinética do crescimento microbiano

Após a inoculação de um meio de cultura favorável ao desenvolvimento do microrganismo em estudo, sob condições adequadas, observa-se um comportamento nos valores da concentração celular (crescimento celular), que é caracterizado por um acréscimo de massa e (ou) número de células.

Uma curva de crescimento descontínuo típico, para um microrganismo que cresceu em um meio quimicamente definido, é mostrado na Figura 4.

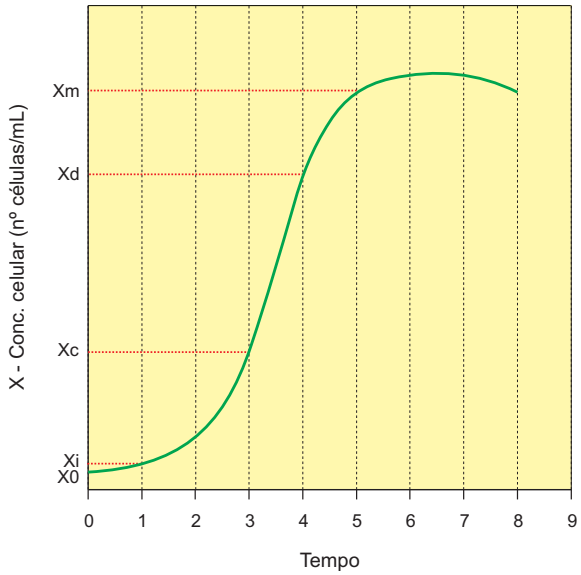


Figura 4. Curva de crescimento do microrganismo em cultivo descontínuo.

As seguintes fases no crescimento são observadas:

Fase 1 – (Intervalo de tempo entre 0 e 1 – Figura 4): conhecida como fase "lag" ou de latência, que segue imediatamente após a inoculação do meio com microrganismo em questão. Trata-se de um período de adaptação durante o qual a célula sintetiza as enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes presentes no meio.

Durante essa primeira fase, não há reprodução celular e, assim, $X=X_0$=constante. A duração dessa fase varia principalmente com a concentração do inóculo (e, portanto, com o valor de X_0), com a idade do microrganismo (tempo de pré-cultivo) e com o seu estado fisiológico.

Quando uma cultura microbiana é mudada de um ambiente a outro, é necessário reorganizar ambos os seus constituintes, micro e macromoleculares; isso pode envolver a síntese ou repressão de enzimas ou constituintes. A fase "lag", como consequência, pode ser muito curta ou mais extensa. Pode haver uma aparente ou pseudo fase "lag" quando o inoculo é pequeno ou tem baixa viabilidade, já que crescimento somente pode ser registrado acima do nível de sensibilidade do método de análise.

A duração da fase "lag" é bastante difícil de estimar, sendo mais fácil sua determinação experimental. O objetivo geral de um bom processo seria minimizar a fase "lag".

Fase 2 - (Intervalo de tempo entre 1 e 5 – Figura 4): conhecida como fase "logarítmica" ou "exponencial".

Uma vez completadas as alterações necessárias, termina o período de adaptação e as células começam a crescer, normalmente em crescimento exponencial ou logarítmico.

A fase exponencial é caracterizada por uma linha reta em um gráfico semilog de ln X por tempo. Esse é um período de crescimento em estado estacionário, durante o qual a velocidade de crescimento específico μ é constante. Durante a fermentação, a composição química do meio está variando, já que os nutrientes estão sendo consumidos e os produtos formados. Como consequência, o ambiente não está em estado estacionário. Num intervalo de concentração de nutrientes, a taxa de crescimento é independente da concentração. Também, durante a fase log, a composição macromolecular da célula permanece constante (Figura 5).

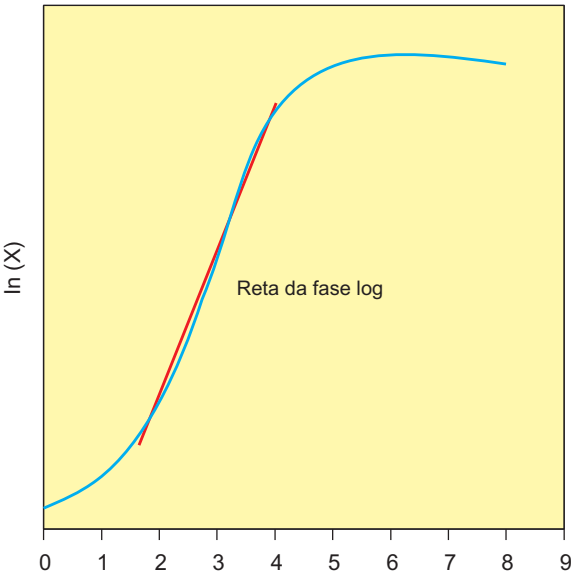


Figura 5. Fase exponencial caracterizada por uma linha reta em um gráfico semilog (crescimento de microrganismo por tempo em cultivo descontínuo).

Na fase exponencial, podemos aplicar a equação abaixo descrita:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

Fase 3 – (Intervalo de tempo entre 5 e 8 – Figura 4): fase "estacionária". Em algum momento, a velocidade de crescimento começa a diminuir, ou devido ao desaparecimento de um nutriente essencial ou devido ao acúmulo de um produto inibidor. A célula passa por uma transição até que a velocidade de crescimento seja zero.

Essa fase estacionária ocorre quando todas as células alcançaram equilíbrio com células mortas, isto é, com a velocidade de morte. Durante a fase estacionária e de morte, ou de declínio, algumas células estão se dividindo, enquanto outras morrem. Frequentemente as células mortas sofrem autólise, e os carboidratos, aminoácidos e outros componentes liberados da célula rompida são então usados como nutrientes pelas células remanescentes da população. Esses eventos canibalísticos ajudam a manter a população durante a fase estacionária. Devido à falta de nutrientes e presença de produtos tóxicos, a população não pode sustentar-se e a fase de morte se inicia.

Relativamente, poucos estudos têm sido feitos sobre a fase de morte de culturas de células, talvez porque a maioria dos processos microbiológicos descontínuos industriais é terminada antes da fase de morte começar.

Velocidade de crescimento versus concentração de nutrientes

Durante a maioria das fermentações descontínuas, a velocidade específica de crescimento (μ) é constante e independente da concentração de nutrientes que está variando. Porém, a velocidade de crescimento, como uma velocidade de reação química, é uma concentração de produtos químicos. Os produtos químicos nesse caso são nutrientes essenciais ou substratos para crescimento. A forma de relação entre velocidade de crescimento e concentração de substrato foi observada em 1949 por Monod. O modelo de Monod tem a forma:

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S}$$

Em que:
μ = velocidade específica de crescimento.
μ_m = velocidade específica de crescimento máximo.
S = concentração do substrato.
K_S = constante, igual a S quando $\mu = 0{,}5.\mu_m$

Na Figura 6, está representado graficamente em função de S; e, na Figura 7, o gráfico de Lineweaver-Burk correspondente, utilizando para a determinação dos parâmetros cinéticos de μ_m e K_S.

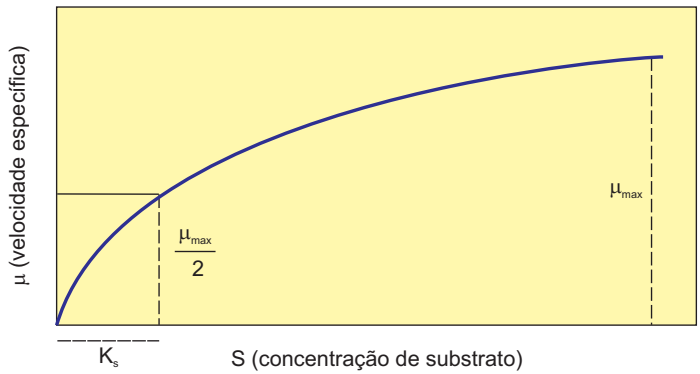


Figura 6. Representação gráfica do modelo de Monod.

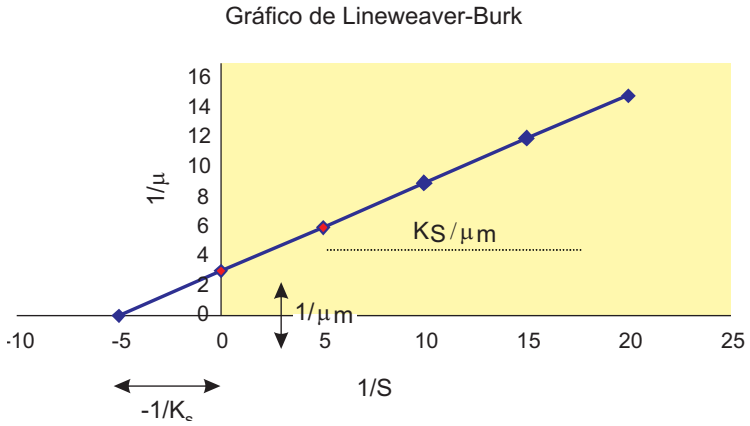


Figura 7. Representação gráfica da equação: $\frac{1}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_m} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_m}$.

Na Tabela 1, apresentam-se valores de K_S do modelo de Monod para o crescimento de microrganismos no substrato glicose.

Tabela 1. Alguns valores de K_S do modelo de Monod para crescimento.

Substrato	KS (mg/L)	Microrganismo
Glicose	1,0	*Enterobacter aerogenes*
Glicose	2,0 – 4,0	*Escherichia coli*
Glicose	25,0	*Saccharomyces cerevisiae*

Observações:

a) Os valores de Ks são muito pequenos em relação à concentração do substrato nas fermentações industriais.
b) $\mu \approx \mu_m$, quando $S>10.K_S$.
c) Para $S<10.K_S$, é uma forte função da concentração de substrato.
d) Durante a fase exponencial, μ=constante.

Muitos outros modelos têm sido propostos para relacionar velocidade de crescimento com concentração de substrato, mas o modelo de Monod é mais comumente usado.

Exercícios:

1) Foi verificado em laboratório que um certo microrganismo a 25 °C e tendo como substrato a maltotriose segue a cinética de Monod, determine os parâmetros cinéticos K_S e μ_m a partir da tabela abaixo.

μ (h-1)	S de maltotriose(g/L)
0,05	2,04
0,10	4,50
0,15	7,50
0,20	11,25
0,25	16,07
0,30	22,50
0,35	31,50
0,40	45,00
0,45	67,50
0,50	112,50
0,55	247,50

2) O mesmo microrganismo do item anterior, fermentando nas mesmas condições, porém utilizando a maltose. Determine os parâmetros cinéticos K_S e μ_m a partir da tabela abaixo.

μ (h-1)	S de maltose (g/L)
0,05	2,00
0,10	4,50
0,15	7,70
0,20	12,00
0,25	18,00
0,30	27,00
0,35	42,00
0,40	72,00
0,45	162,00

O microrganismo tem afinidade maior pela maltotriose ou maltose? Explique a sua resposta.

Aeração e agitação

A velocidade de agitação e a taxa de aeração são importantes para o suprimento de oxigênio ao microrganismo no processo fermentativo, sendo o oxigênio normalmente suprido à cultura microbiana na forma de ar. Entre os processos biotecnológicos de interesse industrial, envolvendo culturas de células microbianas, os de aerobiose encontram-se em maior destaque: produção de antibióticos, enzimas, vitaminas, tratamento biológico de resíduos, etc; assim um adequado dimensionamento do sistema de transferência de oxigênio é necessário para uma alta produção da biomolécula de interesse.

Transferência de oxigênio

O objetivo central de um sistema de aeração e agitação é o fornecimento de oxigênio para a manutenção de uma dada atividade respiratória de um certo conjunto de células. Assim o que se visa é transferir o oxigênio da fase gasosa (bolha de ar) para o líquido, fazer com que

esse oxigênio dissolvido chegue às células suspensas e, finalmente, seja consumido.

Nesse caminho a ser percorrido pelo oxigênio, existem muitas resistências, porém devemos considerar a resistência de uma película líquida (meio de cultura) ao redor da bolha de ar. A taxa de transferência de oxigênio pode ser descrita pela equação abaixo:

$$\frac{dC}{dt} = K_L.a\ (C_s\text{-}C)$$

Em que:

C = concentração de O_2 dissolvido no meio de cultura.

C_s = concentração de saturação de O_2 dissolvido no meio de cultura.

$K_L.a$ = coeficiente de transferência de massa.

$\frac{dC}{dt}$ = variação da concentração de O_2 dissolvido no meio de cultura com o tempo durante a aeração.

O parâmetro K_L.a deve ser determinado experimentalmente, e é usado para avaliar a capacidade de aeração de um fermentador.

Para a determinação de K_L.a, deve-se obter dados sobre a concentração de O_2 dissolvido no meio de cultura ao longo do tempo até a saturação. O sinal de resposta de um eletrodo específico para a medição de oxigênio dissolvido é uma técnica muito utilizada. Consiste em inicialmente borbulhar nitrogênio no líquido (meio de cultura), a fim de retirar todo o O_2 dissolvido, até que a sonda indique zero. A seguir, inicia-se a aeração e a agitação do meio líquido nas condições em que se pretende obter K_L.a, passando então a registrar o sinal da sonda. Esse sinal sairá do valor zero, aumentando até atingir a concentração de saturação $\mathbf{C}_s$. Na Figura 8, a concentração de saturação (8 ppm) é atingida após 25 minutos.

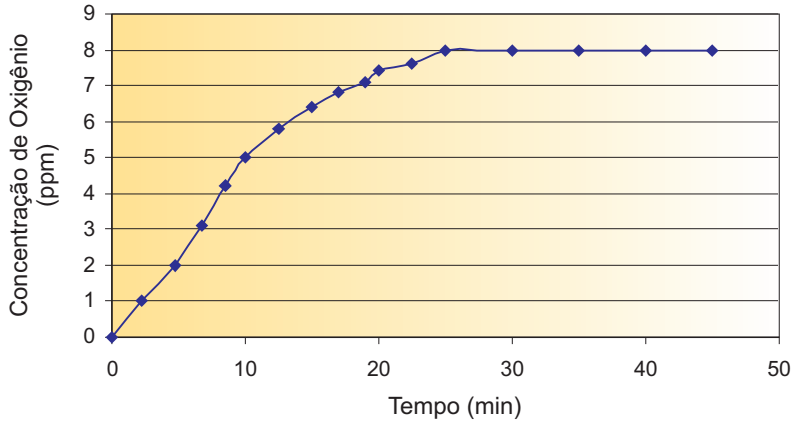


Figura 8. Valores de concentração de oxigênio ao longo do tempo em um processo de aeração.

Integrando a equação anterior com as condições iniciais de t=0 e C=0:

$$Ln(1\text{-}C/Cs) = -K_L.a.t$$

Graficando-se $Ln(1\text{-}C/C_s)$ versus tempo t, tem-se uma reta cujo coeficiente angular é $-K_L.a$.

Biorreatores e sistemas para suprimento de oxigênio

O valor de $K_L.a$ dependerá de variáveis como taxa de aeração, velocidade de agitação e configuração das pás do agitador.

A taxa de aeração fornecida ao fermentador é dada em VVM [volume de ar/ (volume de meio de cultura x minuto]. Antes da entrada do ar no fermentador, medidores de vazão registram o volume de ar/minuto e ocorre a esterilização por meio de filtros que apresentam material filtrante com poros de dimensões menores do que os microorganismos a serem retidos. Normalmente, utilizam-se membranas com poros de 0,2 µm a 0,22 µm.

A agitação incrementa o valor de $K_L.a$ por diminuir a resistência de transferência entre as bolhas de ar e o meio de cultura, entretanto a mesma causa tensões de cisalhamento que podem destruir os microorganismos.

O detalhe A na Figura 9 é um biorreator agitado e aerado (Stirred Tank Reactor – STR), constituindo 93% das aplicações na indústria de alimentos. Os tanques agitados e aerados são projetados com as seguintes relações: a altura do líquido igual ao diâmetro do tanque; e o agitador é do tipo turbina constituído por seis pás planas (detalhe C da Figura 10), apresentando um diâmetro igual a um terço do diâmetro do tanque. Usa-se um sistema de quatro chicanas, para evitar a formação do vórtice, diametralmente opostas, apresentando cada uma largura de 1/10 ou 1/12 do diâmetro do tanque. Os detalhes B e C na Figura 9 sugerem a possibilidade de se transferir oxigênio apenas por borbulhamento de ar. No detalhe B (coluna de bolhas), são instalados distribuidores de bolhas de ar comprimido no fundo do biorreator de modo que possam ser distribuídas uniformemente em todo meio de cultura. No detalhe C (air lift), o ar é introduzido no biorreator através de uma coluna material cerâmico sintetizado de pequenos poros, ocorrendo a difusão das bolhas de ar do interior da coluna para o meio de cultura.

As vantagens dos sistemas exclusivamente de borbulhamento são: menor cisalhamento das células; economia de energia por não necessitar de agitação mecânica; construção do reator ser facilitada. As desvantagens são as vazões de aeração elevadas par um bom nível de agitação e gastos de energia na compressão do ar.

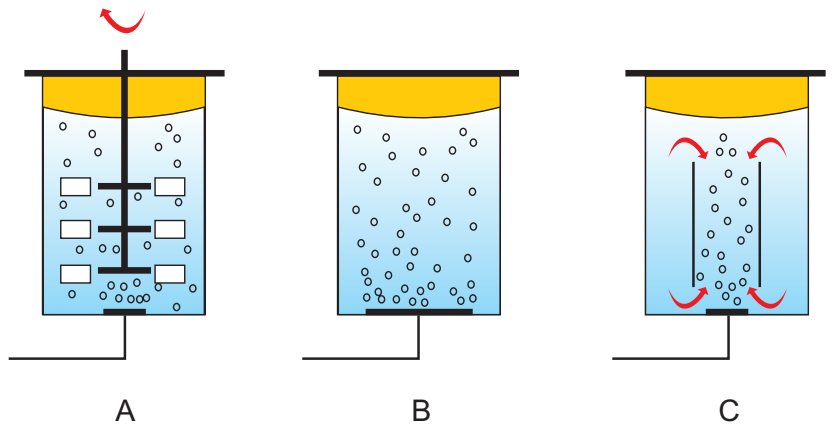


Figura 9. Tipos de biorreatores: (A) Stirred Tank Reactor (STR); (B) coluna de bolhas; (C) "air- lift".

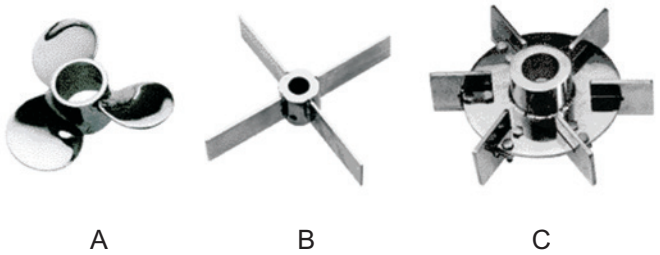


Figura 10. Principais tipos de agitadores: (A) tipo hélice marinha (*propeller*); (B) tipo lâmina ("*paddle*") verticail; (C) turbina com seis pás.

Tensão cisalhante na agitação

A tensão de cisalhamento é função da geometria das pás do agitador e de sua velocidade rotacional. Na Figura 10, são apresentados alguns modelos de pás de agitadores mais utilizados.

Os agitadores promovem um turbilhonamento *axial* e (ou) *radial*. Os agitadores do tipo *propeller* são de escoamento axial, usados para agitar meios de baixa viscosidade; opera a velocidades elevadas e são também de menores dimensões (geralmente < 50 cm). As *paddles* operam a velocidades baixas ou moderadas (20-150 rpm) e o seu diâmetro é da ordem de 50% a 80% do diâmetro do tanque do fermentador; o escoamento é radial, se as lâminas forem verticais, ou axiais, se as lâminas forem inclinadas. Os agitadores tipo turbina com seis pás são os mais utilizados.

A tensão de cisalhamento média em um tanque agitado pode ser calculada pelas seguintes equações:

$$\gamma = kN$$
$$\tau = \mu\,\gamma$$

Em que:

μ: viscosidade dinâmica do meio de cultura (Pa.s).

N: velocidade rotacional do agitador (rps).

k: constante que depende da geometria do sistema (k=15 para agitador tipo turbina com 6 pás e k=11 para agitador tipo hélice marinha).

τ: tensão cisalhante média (Pa).

γ: taxa de deformação.

Para o crescimento de microrganismos aeróbios e a produção do metabólito de interesse, não somente o suprimento apropriado de oxigênio é importante, mas também o grau de cisalhamento na agitação, que pode ser determinante para o sucesso do processo fermentativo.

Produção de alimentos e aditivos por fermentação

Fermentação lática de frutas e hortaliças

A fermentação lática é utilizada na conservação de alimentos por meio do preparo de picles. Além do pepino, outras matérias-primas podem ser utilizadas, como cebola, cenoura, couve-flor, brócoli, chuchu, pêssego, figo, pêra, morango e outras. A fermentação representa economia de energia, pois não são necessárias operações como refrigeração ou pasteurização para a conservação do alimento.

A microbiologia da fermentação é composta por bactérias láticas, enterobactérias e leveduras. Os dois últimos são indesejáveis, pois são as primeiras as responsáveis pela produção do ácido lático e pelas características desejáveis do produto. Durante a fermentação, com a produção de ácido lático, o pH diminui e o desenvolvimento das enterobactérias é inibido a partir de pH 4,5. O pH ácido não inibe o desenvolvimento de leveduras, as quais formam películas na superfície das hortaliças em fermentação, consomem ácido lático, aumentando o pH, e permitindo que outros microrganismos cresçam. Amolecimento, mudanças de cor e aparecimento de manchas brancas em hortaliças são consequências do crescimento de leveduras.

A microbiota da fermentação está presente na superfície das hortaliças, assim como bactérias aeróbias indesejáveis. As condições da fermentação na ausência de ar e na presença de sal (cloreto de sódio) são desfavoráveis às bactérias aeróbias e favoráveis às bactérias láticas. A concentração de sal no início da fermentação deve ser de 12 °Brix. A temperatura ideal de fermentação para as bactérias láticas está entre 18 °C e 20 °C. A relação entre salmoura e hortaliça deve ser de 1,8:1. No final da fermentação, os valores de pH e acidez total apresentam-se praticamente constantes, e os tecidos das hortaliças tornam-se translú-

cidos, com coloração de tonalidade mais clara. A fermentação requer de 4 a 6 semanas. As bactérias láticas produzem compostos antimicrobianos (bacteriocinas), garantindo a inocuidade e extensão da vida de prateleira dos produtos fermentados.

Em vez da fermentação natural, pode-se utilizar fermentos láticos inoculados na salmoura. Nesse caso, é permitido um tratamento térmico do vegetal (branqueamento) antes da fermentação para a minimização da carga de microrganismos indesejáveis. O branqueamento pode ser feito pela imersão do vegetal em água a 90 °C por 5 minutos, ou tratamento com vapor. Esse procedimento também auxilia na prevenção do escurecimento enzimático do vegetal.

Os picles fermentados, antes de serem consumidos, devem ser lavados com água morna (45 °C a 50 °C) por algumas horas, podendo também ser matérias-primas para o picles em vinagre. A maioria das agroindústrias produtoras de picles não utiliza a fermentação lática, o produto é obtido com a imersão da matéria-prima em vinagre condimentado; no entanto o picles preparado com matéria-prima fermentada possui sabor agradável e possui qualidades físicas de cor e textura superiores ao tradicional picles em vinagre.

Produção de vinho

No contexto geral, pode-se destacar que o vinho é uma bebida elaborada a partir da fermentação alcoólica dos açúcares de frutas sãs e maduras, estimuladas pela ação de leveduras, que são responsáveis diretas pela transformação dos açúcares (glicose e frutose) em álcool e gás carbônico. Ao referir-se a bebida como apenas vinho, prediz-se que a matéria-prima é uva, logo vinhos elaborados de outras frutas devem ser rotulados com a denominação vinho acompanhado do nome da fruta que lhe deu origem: vinho de laranja, vinho de pera, vinho de manga, etc. A composição do vinho não só se origina em função da variedade e qualidade da matéria-prima, mas também de outros fatores do produto acabado, como sua idade, safra e conservação. Porém todos os compostos que o constituem são desenvolvidos pelo processo fermentativo, em que há uma decomposição parcial de ácidos diver-

sos, álcool, vitaminas, glicerol, composto fenólico, substâncias aromáticas, sais minerais e taninos.

O teor de açúcar das frutas (glicose, frutose, sacarose) varia em função de vários fatores, tais como o estágio de maturação, o clima, o solo e a variedade. Os vinhos sempre apresentam uma fração de frutose e um pouco de glicose. A sacarose é hidrolisada em glicose e frutose pela enzima invertase produzida pelas leveduras. Nos vinhos, a glicose provém também da hidrólise de certos glicídios durante a conservação. O álcool etílico é o constituinte mais importante do vinho depois da água, que representa cerca de 85% a 90%. O grau alcoólico dos vinhos varia entre 9 °GL e 15 °GL; existem, entretanto, vinhos de mais baixo teor e os com concentração alcoólica que chega a 18 °GL (vinhos licorosos).

Os principais ácidos orgânicos de vinhos são: o ácido málico, tartárico e cítrico, provenientes das próprias frutas; e os provenientes da fermentação: succinico, lático e acético. A maior parte dos ácidos orgânicos encontra-se nos vinhos na forma livre e constitui a acidez total.

Os compostos fenólicos são denominados matérias corantes ou matérias tânicas. Apresentam uma importância muito grande, pois conferem aos vinhos a coloração e grande parte do sabor. Os gostos de vinhos de uva tintos e brancos são diferentes pela presença de compostos fenólicos em proporções mais elevadas nos primeiros. Os compostos fenólicos são constituídos de cinco grupos químicos: antocianinas, flavonas, fenóis-ácidos, taninos condensados, taninos catequicos.

Os ésteres são normalmente formados durante a fermentação pelas leveduras, bactérias lácticas e acéticas, durante o envelhecimento na madeira ou na garrafa. Em baixa concentração, é considerado como constituinte favorável ao aroma do vinho.

Em geral, entre a colheita do fruto e expedição do vinho engarrafado, há um conjunto de etapas. Na Figura 11, apresenta um fluxograma ilustrativo do processo de produção de vinho.

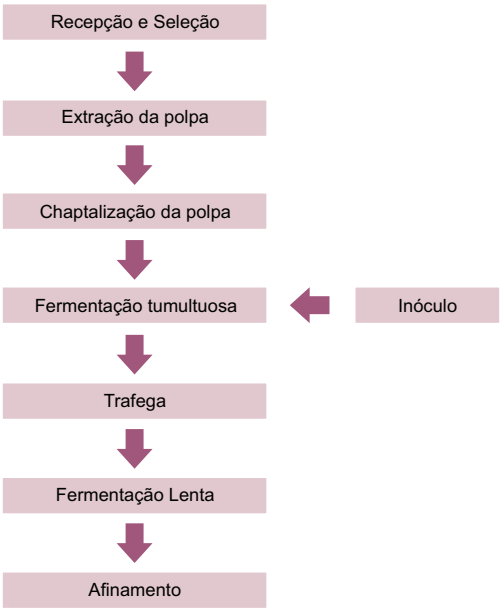


Figura 11. Processo de obtenção do vinho.

Classificação dos frutos (ou seleção dos frutos)

As frutas devem ser selecionadas de acordo com grau de maturação; fase em que se eliminaram, observando-se a aparência dos frutos, aqueles mais defeituosos, estragados, inclusive os que apresentaram algum estágio de fermentação.

Extração da polpa

A extração do suco a partir da parte comestível da fruta pode ser efetuado em despolpador munido de peneiras, importante principalmente para frutas com polpa fibrosa, como manga e abacaxi, visto que as fibras insolúveis prejudicam a fase de fermentação, e dificultam as etapas de filtração. No caso de uva, deve-se romper as bagas por compressão em uma esmagadeira que separa as sementes, as cascas e o

suco para a fermentação e elimina os engaços, os quais podem conferir características indesejáveis ao vinho.

Chaptalização da polpa

Uma correção (chaptalização) do teor de açúcar da polpa pode ser realizada a partir da adição de sacarose, para se obter uma bebida com graduação alcoólica entre aproximadamente 9% e 15% (V/V). A adição de sacarose é permitida até que o Brix duplique seu valor em relação ao medido na polpa in natura.

Inoculação de leveduras (inóculo)

O mosto pode ser inoculado com leveduras selecionadas, que dominam rapidamente os microrganismos selvagens que estão presentes nas superfícies das frutas, se for utilizado um meio preparado previamente com anidrido sulfuroso, o qual protege o mosto da oxidação e exerce uma função inibidora sobre os microrganismos selvagens.

Fermentação tumultuosa, trafega e fermentação lenta

A fase tumultuosa ocorre no início do processo fermentativo, apresentando acentuadas variações das propriedades do mosto. Quando a temperatura se eleva para acima de 33 °C, é necessária a refrigeração do mosto pra preservação das leveduras. Um dispositivo simples para a refrigeração é o mosto circular no interior de um tubo metálico disposto em forma de serpentina, mergulhado dentro de uma cuba com água fria.

Após a fermentação tumultuosa, realiza-se a trafega do vinho, o qual passa por um processo de eliminação de resíduos, ou seja, partes sólidas com fermentos, a partir de um filtro. O filtrado pode ser transferido a uma nova dorna iniciando-se assim a fermentação lenta. Durante as fases de fermentação, realiza-se o acompanhamento de parâmetros físico-químicos: temperatura, grau Brix, acidez, pH e densidade – fatores importantes para determinar o padrão de identidade e qualidade do novo produto.

No decorrer da fermentação, o Brix, a densidade e o pH diminuem, enquanto a acidez e a temperatura aumentam.

Afinamento

Após o fim do processo fermentativo, centrifuga-se o vinho para eliminar todos os resíduos, o que facilita o processo de filtração. Em todo processo de fabricação de vinho, ele deve passar por um estágio de filtração, pois, ao término da fermentação, a sua característica com relação à aparência é turva.

Produção de ácido cítrico

O ácido cítrico é um dos aditivos de alimentos produzidos por microorganismos. O ácido cítrico é responsável pelo sabor azedo de frutas cítricas. Poderia ser obtido delas, mas necessitaria de milhares de frutos para produzir a quantidade de ácido cítrico atualmente feita pela fermentação de melado com o fungo *Aspergillus niger*.

Ao contrário das principais fermentações de alimentos e de bebidas cujas origens remontam à antiguidade, os processos de produção desse ácido só começaram a ser desenvolvidos nos últimos 100 anos. Cerca de 70% da produção é utilizada pela indústria de alimentos e bebidas; 12% pela indústria farmacêutica; e 18% por outras indústrias. Na indústria de alimentos, usa-se em larga escala como acidulante e antioxidante por apresentar sabor agradável, baixíssima toxicidade e alta solubilidade. É usado em refrigerantes, sobremesas, conservas, vinhos, refrescos em pó e doces. Além disso, esse ácido tem capacidade de complexação com metais pesados como o ferro e o cobre. Essa propriedade tem conduzido a crescente utilização como estabilizante de óleos e gorduras para reduzir a sua oxidação catalisada por esses metais. Também, essa propriedade, aliada ao baixo grau de corrosividade a certos metais, tem permitido seu uso na limpeza de caldeiras e instalações especiais.

O principal processo fermentativo utilizado na produção de ácido cítrico é por cultura submersa: o fungo se desenvolve inteiramente submerso no meio de cultura líquido sobre agitação (que serve para

assegurar a homogeneidade tanto da distribuição dos microorganismos quanto dos nutrientes).

Fontes de carboidratos para a produção de ácido cítrico

- Maltose (dois monômeros de glicose), sacarose, manose, glicose e frutose são os açúcares mais apropriados para a produção de ácido.
- Na prática, o ácido cítrico é produzido a partir de carboidrato purificado (sacarose) ou da fonte de carboidrato bruto, de preço mais conveniente, como melaço de cana de açúcar, melaço de beterraba, sacarose bruta, caldo de cana e hidrolisado de amido.
- Estudos apresentam o resíduo bagaço de mandioca como fonte de carboidrato previamente tratado com enzimas amilolíticas.
- Glicerina também é um susbtrato adequado para a produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytic*. Esse fermento produziu até 35 g/L de ácido cítrico quando uma concentração inicial alta de glicerol foi usada no médio de cultura. Parâmetros de produção ácidos cítricos em glicerol foram semelhantes aos obtidos com glicose como susbtrato.

Bioquímica da fermentação do ácido cítrico

Essencialmente a glicose é transformada em piruvato pela via glicolítica. O piruvato é transformado em acetil CoA, que entrará no ciclo de Krebs para a formação do citrato.

Separação do produto

O meio fermentativo deverá ser filtrado. O citrato é precipitado da solução por adição de suspensão de hidróxido de cálcio (que deve ter um baixo teor de magnésio para não haver formação de citrato de magnésio, que é solúvel em água). Em seguida, o citrato de cálcio é filtrado e a massa, transferida para um tanque, onde ela vai ser tratada com ácido sulfúrico para precipitar o sulfato de cálcio. O sobrenadante contendo ácido cítrico é purificado por tratamento com carvão ativado e desmineralizado (retirada de íons) por sucessivas passagens

através de colunas com resina de troca iônica, e a solução purificada é então cristalizada por evaporação, sendo os cristais removidos por centrifugação.

Produção de carotenoides

Microorganismos produzem pigmentos como carotenoides, melaninas, flavonas, quinonas, etc. Os carotenoides são pigmentos (corantes) e apresentam-se na cor amarelo, laranja, vermelho. Possuem a função de antioxidantes, protegendo as células contra os radicais livres; são precursores de vitamina A (β-caroteno, α-caroteno e β-criptoxantina); e estão presentes como aditivos em diversos alimentos como manteigas, queijos, compotas e cereais.

Os corantes carotenoides podem ter preparação sintética, extração de fontes naturais (extrato de pimentão, tomate, cenoura) ou obtenção por processo fermentativo.

O uso de corante sintético em alimentos é altamente controverso devido à sua avaliação negativa, mas é permitido pela legislação. Um substituto natural (biocorante) é mais bem aceito devido ao apelo de vida saudável. Plantas e microorganismos são fontes dessas substâncias, no entanto, no que se refere à produção por fermentação, ainda são necessários estudos sobre a segurança do uso alimentar. Os carotenoides licopeno e β-caroteno provenientes de fontes vegetais estão disponíveis no mercado como suplementos na forma farmacêutica. Os principais microrganismos produtores desses carotenoides são algas unicelulares e fungos: *Blakeslea trispora* (β-caroteno) e *Erwinia uredovora* e *Fusarium sporotrichioides* (licopeno). Em adição a isso, outros microrganismos, incluindo *Serratia* e *Streptomyces*, produzem outros carotenoides em grande quantidade.

A biotecnologia poderá permitir uma produção eficiente e massiva de corantes alimentícios, mas o sucesso de qualquer pigmento produzido por fermentação depende de sua aceitabilidade no mercado, aprovação pela legislação e o investimento requerido para o desenvolvimento da produção contínua.

Produção e purificação de extratos enzimáticos

A produção de enzimas microbianas em escala industrial ocorre prioritariamente por fermentação submersa. Poucos são os processos prévios à fermentação e um dos mais importantes é o preparo do inóculo. Pode-se partir de um cultivo em frasco agitado, inoculado com a cultura estoque. Quando em fase de crescimento exponencial, esse cultivo pode ser inoculado em fermentador de escala piloto de 100 L a 500 L de capacidade, que contém meio de cultivo similar ao da escala de laboratório. Decorrido um tempo conveniente, essa cultura é inoculada no fermentador principal, que em geral tem de 10.000 L a 100.000 L de capacidade e são em geral operados em batelada. Esses fermentadores são encamisados ou possuem serpentinas internas para as necessidades de aquecimento e refrigeração e de sistemas de medidas (sensores de pH, temperatura, oxigênio dissolvido). O parâmetro de controle mais representativo para determinar o término da fermentação é a atividade enzimática. No entanto, algumas vezes a sua determinação é demorada; acarretando tempos de resposta longos. Nesse caso, a variação de outros parâmetros de processo, como pH e oxigênio dissolvido, pode ser usada para caracterizar o fim do processo.

Os meios de cultura são formulados pela utilização de compostos quimicamente conhecidos ou de matérias-primas naturais. Para a escala industrial, os compostos químicos são onerosos e a opção geralmente é feita por meios que contenham apreciáveis quantidades de matérias-primas provenientes da agricultura (Tabela 2) por serem de baixo custo.

Tabela 2. Resíduos agrícolas utilizados como substrato para a produção de enzimas.

Microrganismo	Substrato (resíduo agrícola)	Enzima produzida
Penicillium simplicissimum	farelo de soja	lipase
Thermoascus auranticus	palha de trigo	celulase
Trichoderma reesei	grão de trigo	celulase
Trichoderma harzianum	bagaço de frutas	endo ou exopoligalacturonase (pectinase)
Humicola grisea var. *thermoidea*	engaço de bananeira	xilanase (hemicelulase)

As operações que seguem ao processo fermentativo dependem da localização da enzima de interesse (intra ou extracelular). Enzimas extracelulares são recuperadas do caldo fermentativo e etapas de separação e purificação são utilizadas. A purificação de enzimas intracelulares é mais complexa, pois envolve as etapas de ruptura celular e posterior separação dos constituintes intracelulares.

No caso de enzimas extracelulares, ao término do processo fermentativo, o caldo (extrato bruto) é resfriado a cerca de 5 °C para assegurar as condições de estabilidade do produto e evitar o crescimento de microrganismos contaminantes. O pH é geralmente ajustado para o valor ótimo de atuação da enzima produzida.

A separação das células pode ser feita por centrifugação ou filtração. Fungos filamentosos podem ser separados por centrifugação, no entanto bactérias e leveduras podem necessitar de uma prévia floculação com sulfato de alumínio ou polieletrólitos. A filtração é uma alternativa para a centrifugação, sendo, em geral, conduzida em filtros-prensa ou filtros rotativos a vácuo. O extrato bruto deve ser concentrado em módulos de ultrafiltração que utilizam membranas de 2 a 300 kDa. A solução concentrada, uma vez diluída a níveis convenientes, pode ser embalada para ser comercializada com grau comercial ou técnico, ou, por diversas razões (aplicação, transporte, estocagem), torna-se uma opção viável a obtenção de um preparado enzimático bruto na forma sólida. A secagem ocorre a vácuo, por liofilização, ou por atomização em equipamento conhecido como “spray dryer”, onde a solução enzimática é injetada através de bico atomizador como gotículas e entra em contato com ar em contracorrente.

Os preparados enzimáticos com grau comercial são utilizados em indústria alimentícia, têxtil, papel, etc; mas, se for para uso analítico ou farmacêutico, processos mais sofisticados de purificação, como é o caso das separações cromatográficas (troca iônica, filtração em gel), devem ser utilizados. Assim o grau de purificação exigido está associado à aplicação do produto.

Aplicação de enzimas na produção de alimentos

Óleos de citrus ou azeite de oliva podem ser extraídos mais facilmente, e com maior rendimento, utilizando-se pectinases em substi-

tuição aos solventes. O uso da amostra enzimática com atividade de pectinase resulta em uma melhor qualidade organoléptica dos óleos, pois a extração de polifenóis, o-fenóis e de outras substâncias de sabores aromáticos é também incrementada, contribuindo para a estabilidade oxidante do óleo.

O despolpamento de grão de café envolve a remoção da casca da cereja, que é obtida por processos mecânicos. Após o despolpamento, ocorre a mucilagem, que se constitui no processo pelo qual o mesocarpo mucilaginoso aderente ao grão, rico em pectina, é degradado por enzimas (preparações de pectinases, celulases e hemicelulases). A mucilagem do café alcança dois objetivos importantes: remove a aderente camada mucilaginosa, permitindo a rápida secagem dos grãos, e melhora a torrefação, o que é refletido na qualidade da bebida.

A mucilagem por ação enzimática substitui a remoção química que pode ser feita pelo uso de álcalis, ácidos ou água morna. Hidróxido de sódio é um dos álcalis sugeridos. As desvantagens do uso de soda ou ácidos referem-se ao uso cuidadoso e descarte dos produtos que podem afetar o meio ambiente. A utilização de enzimas substitui também a remoção mecânica, em que são utilizadas máquinas desenvolvidas para esse processo, no entanto apresentam a desvantagem de alto consumo de água e de energia. Há também possibilidade de danos físicos nos grãos e possíveis efeitos na qualidade da bebida.

Os oligogalacturonídeos são conhecidos como ingredientes de alimentos bioativos. Essas moléculas, provenientes da ação de endo e exo-polimetilgalacturonases sobre pectina, são não-digestíveis e podem, dessa maneira, ser usados como componentes na nutrição humana e animal, em analogia às moléculas de fruto-oligossacarídeos (inulina). A inulina quando ingerida chega ao intestino grosso quase integralmente. Ela não é hidrolisada nas suas unidades monossacarídicas na parte superior do intestino, como consequência, não aumenta a glicemia e nem os níveis de insulina no sangue, sendo ideal para diabéticos.

Um preparado enzimático com atividade de pectinase e β-glucanase é utilizado pela indústria do vinho para decompor seletivamente os glucanos e as substâncias pécticas no mosto, e melhorar o envelhecimento e a filtração dos vinhos jovens. Para uma melhor liberação

dos valiosos compostos de aroma e cor contidos nas cascas das uvas e no engaço, estes, após a maceração, sofrem um tratamento enzimático com um complexo de pectinases, celulases e hemicelulases. O resultado é um vinho tinto de melhor qualidade e mais apreciado pelo mercado.

Considerações finais

Os processos fermentativos na indústria de alimentos representam métodos de conservação, obtenção de alimentos mais saborosos e aditivos cada vez mais necessários a outros processos industriais. A biotecnologia aplicada à Engenharia de Alimentos tem por finalidade, além da obtenção de produto, o desenvolvimento de processos industriais, com a determinação de parâmetros que permitam cálculos e dimensionamentos. Trata-se de um campo de trabalho multidisciplinar, que necessita da colaboração em diversas áreas do conhecimento (bioquímica, microbiologia, genética, engenharia). Com o envolvimento de tantos ramos da ciência, a biotecnologia em alimentos apresenta constante agregação de profissionais atuantes e inovações.

Referências

AIBA, S.; HUMPHREY, A. E.; MILLINS, N. F. **Biochemical engineering**, 2nd ed., Tokyo: University of Tokyo Press, 1973.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**, 2nd ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1986.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A., AQUARONE, E. **Fundamentos.** São Paulo: Edgard Blucher Lt, 2001. (Biotecnologia industrial, v. 1).

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A., AQUARONE, E. **Engenharia bioquímica**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 2001. (Biotecnologia industrial, v. 2).

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltd, 2001. (Biotecnologia industrial, v. 3).

DEMAIN, A. L.; SOLOMON, N. A. **Manual of industrial microbiology and biotechnology.** Washington: ASM, 1986.

GOLDINI, J. S. Fermentação lática de hortaliças e azeitonas. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A., AQUARONE, E. **Biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blucher Ltd, 2001. (Biotecnologia industrial, v. 4).

HASHIZUME, T. Tecnologia do vinho. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blucher Ltd, 2001. (Biotecnologia industrial, v. 4).

STANBURY, P. F. **Principles of fermentation technology**. 2nd ed. Berkshire: ButterWorth Heinemann, 1995.

VOGEL, H. C. **Fermentation and biochemical engineering handbook**. 2nd ed., Berkshire: Noyes Publications,1996.

FROST, G. M. **Industrial enzyme applications**: technical note, Inglaterra: Jonh& E. Sturge, 1984.

9.0 Bibliografia Recomendada

ALKORTA I.; LLAMA M. J.; SERRA J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 21-28, 1998.

CASTRO, A. G. A **Química e a reologia no processamento de alimentos**: ciência e técnica. Lisboa: Instituto Piaget, 2003.

DHARMARAJ, S.; ASHOKKUMAR. Food-grade pigments from *Streptomyces* sp. isolated from the marine sponge *Callyspongia diffusa,* **Food Research International**, p. 487-492, 2009.

GOKSUNGUR, F.; MANTZOURIDOU, T.; ROUKAS, O. Optimization of the production of β-carotene from molasses by *Blakeslea trispora*: a statistical approach. **Journal of Chemistry Technology and. Biotechnology**. *v.* **77, p.** 933–943, 2002.

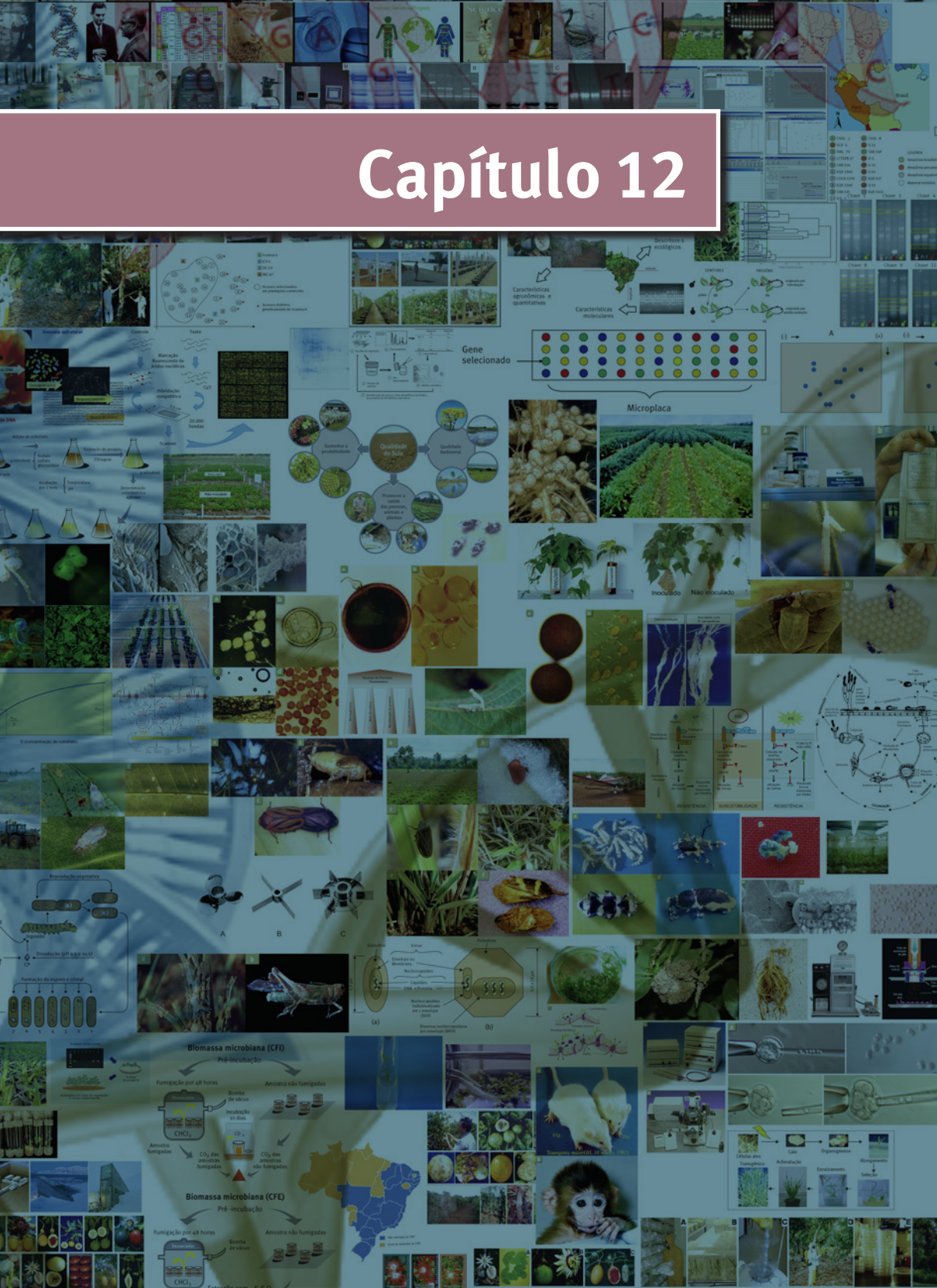
PIMENTA C. J.; CHAGAS S. J. R.; COSTA L., Pectinas e enzimas pectinolíticas em café (*Coffea arabica* L.) colhido em quatro estágios de maturação. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 4, 2000.

PRAVE, P.; FAUST, U.; SITTING, W.; SUKATSCH, D. A. **Fundamentals of biotechnology.** German: VCH, 1987.

ROUKAS, T.; ALICHANIDIS, E. Citric acid production from beet molasses by cell recycle of *Aspergillus niger*, **Journal Industrial Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 71-74, 1991.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CANTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, 30-39, 2009.

Capítulo 12


Gene selecionado
Microplaca
Inoculado
Não inoculado
Biomassa microbiana (CFI)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas
Biomassa microbiana (CFE)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas

Interações moleculares planta-patógeno

Magnólia de Araújo Campos
Mário Lúcio Vilela de Resende
Marilia Santos Silva

Introdução

A evolução de plantas na terra tem sido compartilhada por interações moleculares com microrganismos simbióticos e patogênicos, sendo estas constantemente expostas a eles. A interação entre plantas e seus patógenos é fruto de relacionamento coevolucionário entre eles e a resistência da planta, logo a patogenicidade do patógeno é resultado dessa interação. Portanto, a interação entre plantas e seus patógenos é íntima (genética, gene a gene), complexa (ativação de reações bioquímicas em cascatas, acúmulo de proteínas de defesa e mudanças citológicas e morfológicas na planta) e antiga (desde a evolução das plantas na terra). Numa batalha coevolutiva, plantas respondem ao ataque de patógenos e pragas, fazendo uso de mecanismos efetivos de resistência a doenças.

Frente ao ataque de patógenos, esses mecanismos são acionados no momento em que elas reconhecem a agressão. Se o reconhecimento for rápido, uma resistência eficiente contra doenças e ferimentos pode ser induzida, impedindo o seu alastramento e alertando a planta sobre agressões posteriores. Um reconhecimento tardio pode conduzir a uma resistência induzida "atrasada", quando o patógeno já se instalou, mas que pode, ainda, prevenir a planta contra futuras infecções.

Este capítulo apresenta uma síntese da visão global emergente de descobertas importantes sobre as interações entre plantas e seus patógenos, numa abordagem que envolve terminologia e eventos envolvidos, tais como barreiras pré-formadas, o reconhecimento dos patógenos e as diferentes respostas imunes inatas de hospedeiras e não-hospedeiras eliciadas por eles.

Bases para o entendimento do relacionamento planta-patógeno

Os termos "plantas não-hospedeiras" e "plantas hospedeiras" referem-se ao fato de que patógenos têm um limitado espectro de plantas sobre as quais eles conseguem causar doenças (THORDAL-HRISTENSEN, 2003). *A resistência de não-hospedeira* é a mais comum e durável forma de resistência a doenças exibida por plantas contra a maioria de microrganismos potencialmente patogênicos. Essa resistência descreve a imunidade de todos os membros de uma espécie de planta contra todos os variantes genéticos de uma espécie de parasita ou patógeno específico, não adaptado (Figura 1).

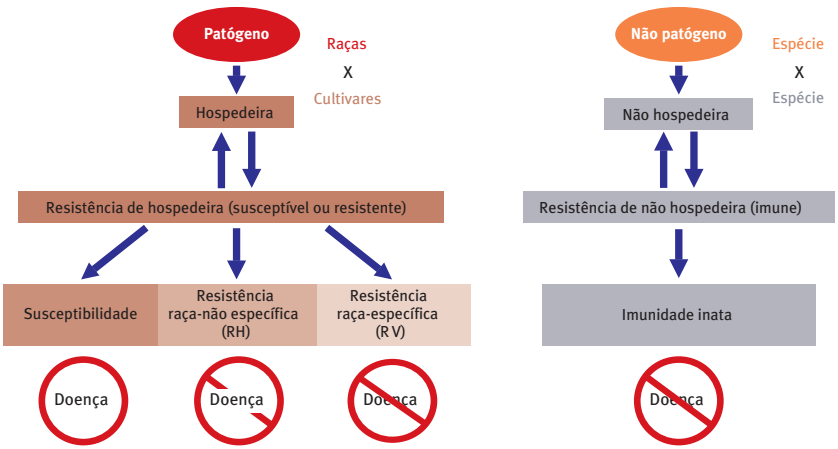


Figura 1. Visão geral do resultado da interação planta-patógeno. A interação é denominada compatível quando resulta em doença e incompatível quando resulta em resistência.

A patogênese de patógenos fúngicos não-adaptados, por exemplo, termina muitas vezes com a tentativa de penetração deles dentro das células de plantas não-hospedeiras, também referidas como hospedeiras em potencial. Um patógeno que não pode causar doença numa planta não-hospedeira é referido como um potencial patógeno de não-hospedeira ou não-patógeno. Somente após um longo período de coevolução é que uma raça ou espécie de um patógeno tem a possibilidade de adaptar-se a certas plantas não-hospedeiras, fazendo com que

elas se tornem hospedeiras específicas e que os 'genes alvos de patogenicidade' delas evoluam – fenômeno chamado *compatibilidade básica* (MYSORE; RYU, 2004; OH et al., 2006; THORDAL-CHRISTENSEN, 2003).

Compatibilidade básica é, portanto, uma adaptação evolucionária especializada, e a evolução de hospedeiras e de patógenos acontece acompanhada por mudanças na expressão de genes de defesa. Quando a compatibilidade básica existe, o patógeno deve ser capaz de: (1) crescer eficientemente dentro do "ambiente" da hospedeira; e (2) superar ou burlar as defesas da hospedeira. Entretanto, patógenos de uma espécie vegetal estão bem adaptados às defesas da hospedeira específica, mas não às defesas de outras plantas. Então, alterações na hospedeira criam condições insustentáveis (fenômeno 'resistência específica de hospedeira') para o patógeno. Da mesma forma, alterações no patógeno podem levar a quebra dessa resistência ('suscetibilidade'). No caso da resistência de não-hospedeiras, que é uma resistência multigênica, a inativação de qualquer um dos seus componentes pode não ser suficiente para levar a uma planta suscetível.

Patógenos bem-sucedidos evoluíram estratégias especializadas para suprimir as respostas de defesa da planta e induzir susceptibilidade à doença em hospedeiras resistentes por vias diferentes. No entanto, o que se observa é que alguns genótipos da planta apresentam uma imunidade raça-específica, agora referida como Imunidade Disparada por Efetores (IDE), também conhecida como *resistência de hospedeira*. Essa resistência é específica de uma cultivar, ou um acesso, de uma espécie de planta a uma raça de uma determinada espécie de patógeno (Figura 1), por isso essa resistência específica de hospedeira também é conhecida como resistência vertical. Além disso, diferentes níveis de resistência podem ser observados em diferentes cultivares de uma mesma espécie de planta em resposta aos diferentes níveis de virulência de diferentes raças de um patógeno. Porém, quando se trata da resistência referida como resistência horizontal ou quantitativa, uma mesma cultivar responde igualmente aos diferentes níveis de virulência de diferentes raças de um patógeno (Figura 1).

Nesse contexto, entende-se por resistência a capacidade da planta em evitar ou atrasar a entrada e (ou) subsequente atividade de um

patógeno. Na natureza, a resistência é a regra. Por outro lado, a colonização de patógenos dentro de tecidos vegetais, assim como fatores ambientais adversos, causa alterações prejudiciais no estado fisiológico normal da planta, as quais caracterizam *doença em plantas*. As anormalidades detectáveis ou visíveis denominam-se *sintomas*. A essa habilidade de os patógenos interferirem com uma ou mais funções essenciais da planta, dita *hospedeira suscetível*, e causarem doença denomina-se *patogenicidade*.

Como patógenos atacam plantas?

Patógenos atacam plantas porque, durante a evolução de seu desenvolvimento, eles adquiriram a habilidade de viver das substâncias produzidas pelas plantas hospedeiras. Como muitas substâncias estão contidas no protoplasma das células vegetais, para acessá-las os patógenos primeiro precisam transpor as barreiras estruturais externas da planta, a cutícula e a parede celular(AGRIOS, 1997).

A maioria dos patógenos tem acesso ao interior das plantas diretamente, via penetração da superfície foliar (ex.: fungos) ou radicular (ex.: nematoides), por meio de ferimentos (ex.: fungos, vírus, bactérias e nematoides) ou por meio de aberturas naturais, tais como estômatos e hidatódios (ex.: fungos, bactérias e vírus). Os fungos geralmente secretam um coquetel de enzimas hidrolíticas, incluindo cutinase, celulase, pectinase, poligalacturonase e proteases, e alternativamente, ou em combinação, também formam um órgão de penetração na ponta de seu tubo germinativo, denominado apressório (KNOGGE, 1996). Além desses, já foi relatada a produção de inibidores de proteínas PR do tipo inibidores de quitinase, inibidores de glucanase e inibidores de proteinases, em resposta ao relacionamento coevolucionário.

Uma vez que o interior da planta tenha sido violado, microrganismos precisam vencer o próximo obstáculo, que é a parede celular, rígida, baseada em celulose, ao redor de todas as células. Seja por meio de enzimas, toxinas ou hormônios, patógenos bem-sucedidos conseguem penetrar a parede celular e o interior das células vegetais. Entretanto, já na membrana plasmática, o microrganismo encontra os receptores de superfície extracelular capazes de reconhecer moléculas específicas de micróbios.

Como plantas se defendem de patógenos ?

Plantas se defendem de patógenos por meio de mecanismos de defesa constitutivos e induzidos. A resistência genética, dentro do conceito de fisiologia do parasitismo, pode ser definida como a habilidade da hospedeira em prevenir ou retardar o estabelecimento do patógeno em seus tecidos, num processo altamente dinâmico, coordenado e dependente da existência de mecanismos constitutivos e (ou) pós-formados. A ativação dos genes ou fatores responsáveis pela indução de sistemas de defesa pós-formados no momento, local e magnitude adequados, após o reconhecimento do patógeno pela hospedeira, constitui-se num sistema de múltiplos componentes em que seu nível de expressão é resultado do somatório das contribuições individuais de diferentes mecanismos de defesa e o *nível de resistência* é a soma das contribuições de um número desses mecanismos de resistência.

Mecanismos de defesa pré-formados ou constitutivos

Algumas defesas estão presentes na planta antes mesmo do contato com o patógeno, e certas estruturas determinarão o avanço ou não desse microrganismo na planta. Teoricamente, existem duas amplas categorias de defesa: a estrutural, morfológica ou anatômica e a bioquímica ou fisiológica. Os mecanismos ou fatores estruturais da planta atuam como barreiras físicas, impedindo a entrada do patógeno e a colonização dos tecidos, enquanto as reações químicas que ocorrem nesses tecidos produzem substâncias que se mostram tóxicas ao patógeno ou criam condições adversas ao crescimento deste no interior da hospedeira (PASCHOLATI; LEITE, 1994). O grau de envolvimento dos mecanismos estruturais e bioquímicos, pré ou pós-formados, nas respostas de resistência varia de acordo com a interação patógeno-hospedeira e, numa mesma interação, em função da idade da planta, do órgão ou tecido afetado, do estado nutricional e das demais condições ambientais (Figura 2).

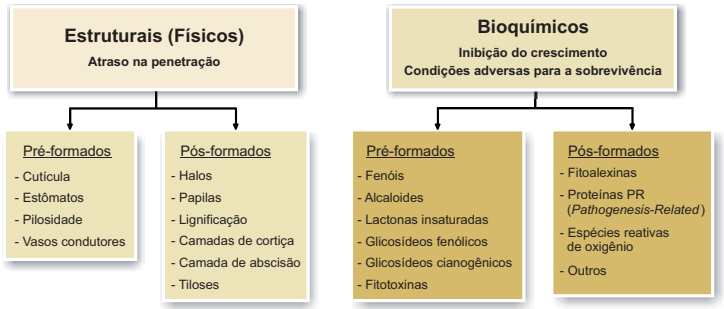


Figura 2. Representação esquemática de mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos pré-existentes em plantas e pós-formados durante interações com patógenos.

Mecanismos de defesa pós-formados ou induzidos

As respostas de defesa induzidas podem ser localizadas ou sistêmicas e são mais sofisticadas, pois envolvem o reconhecimento do patógeno pela planta hospedeira, a transdução de sinais e a expressão de vários genes de defesa (MONTESINOS et al., 2002), etapas básicas do processo de sinalização desenvolvido pelas células vegetais para perceber e responder a estímulos intrínsecos e (ou) extrínsecos ao organismo vegetal.

A ativação dos genes ou fatores responsáveis pela indução de sistemas de defesa pós-formados no momento, local e magnitude adequados, após o reconhecimento do patógeno pela hospedeira, constitui-se num sistema de componentes múltiplos cujo nível de expressão é resultado do somatório das contribuições individuais de diferentes mecanismos de defesa (Figura 2). O processo de sinalização desenvolvido pelas células vegetais para perceber e responder aos estímulos intrínsecos e (ou) extrínsecos apresenta certa analogia com o dos animais, embora possua características estruturais e funcionais peculiares, e pode ser dividido em três etapas básicas: (1) *o reconhecimento ou percepção do sinal*, realizado por receptores celulares específicos ou inespecíficos que reconhecem um determinado sinal (nesse caso,

molécula de origem do patógeno); (2) *a transdução do sinal*, que consiste na transmissão do mesmo para seu sítio de ação dentro da célula, podendo ser feita de forma direta ou indireta (via mensageiros secundários, alterações na fosforilação de proteínas e através de proteínas-G; e (3) *a tradução do sinal*, que consiste na conversão do sinal em respostas celulares específicas (CÔTÉ et al., 1995), como, por exemplo, a ativação de genes que induzem a síntese de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-PR) e de certas enzimas regulatórias do processo de produção de fitoalexinas (Figura 3).

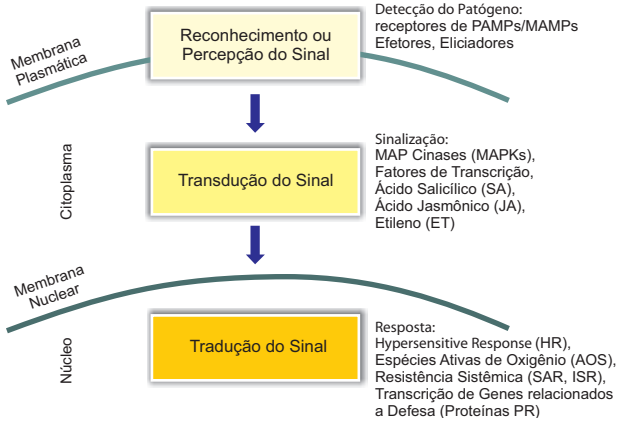


Figura 3. Visão geral das etapas envolvidas na resistência de plantas a patógenos.

Cronologicamente, a transdução de sinais para respostas de defesa em plantas pode assim ser resumida, após o reconhecimento do(s) eliciador(es) pelo(s) receptor(es): abertura de canais de íons → acidificação do citoplasma → ativação de quinases no citoplasma → ativação do complexo NADPH-oxidase → produção de espécies ativas de oxigênio → ativação de outros mensageiros secundários (ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno) → ativação de fatores de transcrição → transcrição de genes de defesa (proteínas PR, enzimas de fitoalexinas, lignificação de tecidos, calose e outros reforços da parede celular) δresistência local (reação de hipersensibilidade) e, subsequentemente, 'imunidade' sistêmica (resistência sistêmica adquirida ou resistência sistêmica induzida) (GRANT; LAMB, 2006) (Figura 4).

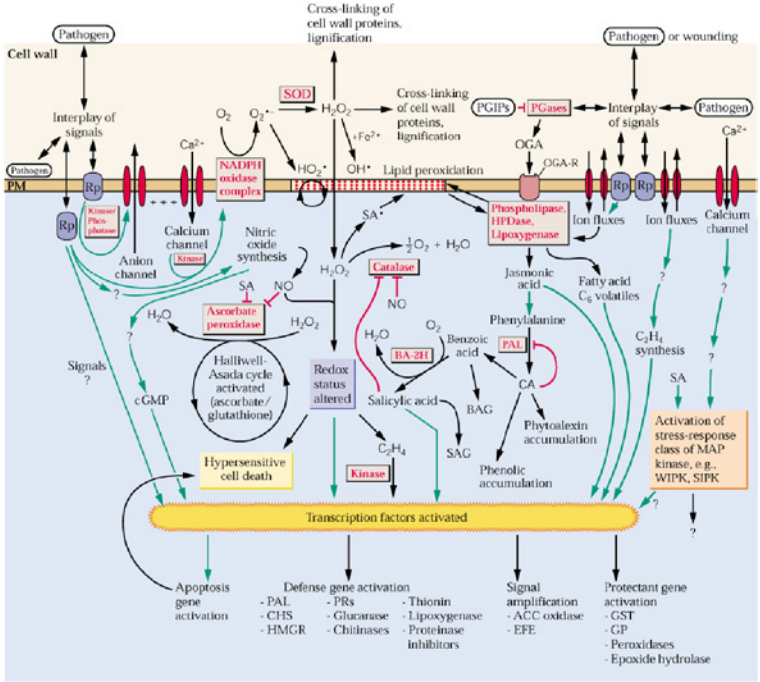


Figura 4. Panorama geral das rotas de transdução de sinais ativando e coordenando as respostas de defesa da planta. ACC oxidase: ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidase; BAG: glucosídio do ácido benzóico; ácido benzóico; BA-2H: ácido benzóico-2-hidrolase; CA: ácido cinâmico; cGMP: guanosina 5'-monofosfato cíclica; CHS: chalcona sintetase; EFE: enzima formadora de etileno; GP: glutationa peroxidase; GST: glutationa S-transferase; HMGR: 3'-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase; $HO_2^{\bullet}$: radical hidroperoxil; HPDase: hidroxiperóxido dehidrase; interação de sinais; MAP: proteína ativada por mitógeno; NO: óxido nítrico; OGA e OGA-R: fragmentos de oligalacturonídeos e respectivos receptores; $OH^{\bullet}$: radical hidroxil; PAL: fenilalanina amônia-liase; PGases: poligalacturonases; PM: membrana plasmática; SA: radical ácido salicílico; SAG: glucosídio do ácido salicílico; SIPK: proteína cinase induzida pelo ácido salicílico; WIPK: proteína cinase induzida por ferimento.

Fonte: Hammond-Kosack, K. & Jones, J. D. G. Chapter 21, Responses to Plant Pathogens. Pagina 1143. Editores. Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R. Titulo do livro: Biochemistry & Molecular Biology of Plants, 1367 paginas, ano 2000.

Com base nessa Figura 4, proteínas receptoras da planta (Rp) interceptam sinais derivados do patógeno ou dependentes de interação. Esses sinais incluem produtos diretos ou indiretos dos genes *Avr*, contato físico e componentes gerais de cada organismo, tais como quitina, enzimas e fragmentos da parede celular das plantas. Proteínas receptoras da planta podem ser ou não produtos dos genes *R*. Os eventos de sinalização mais próximos do "downstream" não são conhecidos, mas envolvem quinases, fosfatases, proteínas-G e fluxos de íons. Vários resultados distintos e rapidamente ativados são reconhecidos, incluindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico e a indução indireta da transcrição de genes de defesa (ou possivelmente genes de apoptose). A amplificação da resposta inicial de defesa ocorre através da geração de moléculas sinalizadoras adicionais, que são outras ROS, peróxidos de lipídeos, ácido benzóico (BA), ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno. Estes, por sua vez, induzem outros genes relacionados à defesa e modificam proteínas de defesa e enzimas. Alterações simultâneas do estado redox das células ou danos celulares ativam mecanismos pré-formados para a proteção da célula (por exemplo, o ciclo de Halliwell-Asada, a enzima superóxido dismutase [SOD] localizada no plastídio e a enzima catalase) e induzem genes que codificam vários protetores celulares. Estresses relacionados à defesa também podem induzir a morte celular. A comunicação entre as várias rotas induzidas parece coordenar as respostas. Em todos os processos de preparo das respostas de defesa, os mensageiros secundários têm um papel fundamental. Os fitohormônios ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) estão envolvidos em uma rede de defesa refinada, eventualmente, levando a um ótimo portfólio de respostas contra invasores. Outros mensageiros secundários importantes a serem abordados na presente revisão são: proteínas-G, inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3), ácido diacilglicerol (DAG), cálcio (Ca^{2+}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO).

Como parte do resultado dessas estratégias, células de plantas sob invasão muitas vezes desenvolvem uma resposta de hipersensibilidade (HR, *hypersensitive response*), que é uma morte celular rápida localizada no sítio de infecção; uma aumentada expressão de genes rela-

cionados com a defesa, p. ex.: genes *PR* (PR, *pathogenesis-related*), e a explosão oxidativa (VAN LOON et al., 2006). Na resistência de hospedeira, as respostas de defesa são, em geral, governadas por genes de resistência (*R*) únicos, cujos produtos cognatos reconhecem e interagem direta ou indiretamente com eliciadores específicos produzidos por genes de avirulência (*Avr*) de raças de patógenos específicos (FLOR, 1971; MARTIM, 1999; HEATH, 2000).

Ao contrário da resistência de hospedeira, a qual tem sido bem estudada, a resistência de não-hospedeira opera sob mecanismos ainda não bem entendidos, apesar dos enormes progressos nas ciências de plantas. Não está claro por que um patógeno altamente virulento sob uma espécie de planta é não-patogênico em outras.

Alguns dos mecanismos já conhecidos que contribuem com a resistência de não-hospedeira são: (1) mecanismos de defesa passivos ou pré-formados, os quais funcionam como uma barreira pré-formada, presente na planta antes da tentativa de penetração do patógeno; e (2) mecanismos de defesa induzíveis; (3) componentes de sinalização de defesa e (4) genes de resistência de amplo espectro (MYSORE; RYU, 2004). O citoesqueleto de plantas possui papel significativo durante a resistência de não-hospedeira. Já foi demonstrado que microfilamentos de actina de plantas atuam na defesa contra a penetração de fungos e sua inativação levou a perda da resistência de não-hospedeira a inúmeros fungos (KOBAYASHI et al., 1992; YUN et al., 2003). Além do citoesqueleto, metabólitos secundários e proteínas antimicrobianas também são partes da defesa pré-formada (MYSORE; RYU, 2004).

Resistência de não-hospedeira a bactérias, fungos e oomicetos pode ser de dois tipos: o Tipo I, que não apresenta qualquer sintoma visível (necrose do tipo HR), e o Tipo II, que está sempre associado a uma necrose do tipo HR. O tipo de resistência de não-hospedeira que pode ser disparado contra um dado patógeno depende de ambas as espécies que estão interagindo, da planta e do patógeno, de tal forma que uma determinada espécie de planta não-hospedeira pode responder com a resistência Tipo I contra uma espécie de patógeno e com a do Tipo II contra outra espécie. Por exemplo, *Nicotiana benthamiana* exibe uma resistência de não-hospedeira Tipo I contra *Xantomonas campestris* pv. *campestris* e Tipo II contra *P. syringae* pv. *tomato* (PEART et al., 2002;

MYSORE; RYU, 2004; OH et al., 2006). Existem fortes similaridades entre as respostas de resistência de hospedeira e a de não-hospedeira, no entanto ainda não está claro se o mesmo mecanismo está envolvido na geração dessas respostas de resistência (Revisados por Mysore & Ryu, 2004; Oh et al., 2006). Entretanto, por ser uma resistência altamente eficiente e durável, tem sido sugerido que os mecanismos de resistência de não-hospedeira poderiam ser explorados para gerar resistência em plantas agriculturáveis.

O sistema imune de plantas

Plantas, assim como animais, possuem mecanismos de defesa inatos para resistirem à infecção causada por micróbios. Uma resistência de planta eficiente está baseada em duas formas evolucionariamente ligadas de *Imunidade Inata*. A primeira resposta imune de plantas é referida como *Imunidade Disparada por PAMPs/MAMPs* (IDP). Nela, as plantas evoluíram proteínas PRRs (receptores de reconhecimento específico de padrões) para reconhecer estruturas microbianas invariantes conhecidas como eliciadores gerais, atualmente denominadas padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) ou a micróbios (MAMPs), já que todos os micróbios possuem PAMPs e não apenas patógenos, os quais estão ausentes em seus hospedeiros eucarióticos. Além desses, padrões moleculares também têm sido associados a herbívoros (HAMPs) em respostas de defesa disparadas por herbívoros. Ainda, tecidos danificados liberam eliciadores endógenos de plantas, atualmente referidos como DAMPs. Esses padrões moleculares associados a danos mediam respostas de defesa a herbívoros e patógenos e, assim como os PAMPs/MAMPs, são reconhecidos por PRRs localizados na membrana plasmática.

Por outro lado, durante a coevolução, fitopatógenos bem-sucedidos adquiriram a habilidade de direcionar proteínas efetoras para dentro das células da planta, as quais contribuem para sua virulência e podem mascarar/suprimir essa imunidade primária IDP, permitindo o seu crescimento e o aparecimento de doença. Em contrapartida, cultivares (individuais) de espécies de plantas adquiriram proteínas R (receptores de resistência específica) que reconhecem determinados efetores, codificados por genes de avirulência (Avr) de patógenos e

ditos fatores de virulência, para restaurar a resistência a doença. Esse tipo de mecanismo mais especializado de defesa de plantas para detectar patógenos é referido como *Imunidade Disparada por Efetores* (IDE).

Reconhecimento de PAMPs e Imunidade Disparada por PAMPs (IDP)

A imunidade disparada por PAMPs, imunidade basal, é iniciada após o reconhecimento de estruturas microbianas conservadas pelos receptores de superfície celular de plantas (PRRs), e sua indução está associada com sinalização de MAP cinases, indução transcricional de genes responsivos a patógenos, produção de espécies reativas de oxigênio e deposição de calose para fortalecer a parede celular no sítio de infecção, todos contribuindo para impedir o crescimento do microrganismo tanto em plantas hospedeiras quanto não-hospedeiras (Figura 5).

De acordo com a demonstração esquemática da Figura 5, o reconhecimento de PAMPs por PRRs dispara prontamente a imunidade basal, que requer sinalização por meio de cascata de MAPKs e reprogramação transcricional mediada por fatores de transcrição do tipo WRKY. Patógenos secretam proteínas efetoras, que são introduzidas por algum mecanismo no citosol da planta, as quais têm como alvo múltiplas proteínas hospedeiras para suprimir a resposta imune basal, permitindo o crescimento do patógeno no apoplasto. Proteínas de resistência de plantas, representadas pelos domínios NB-LRR, reconhecem a atividade de efetores e restauram a resistência por meio de uma resposta imune disparada por efetores. Um limitado acúmulo de patógeno pode ocorrer antes das respostas imunes disparadas por efetores.

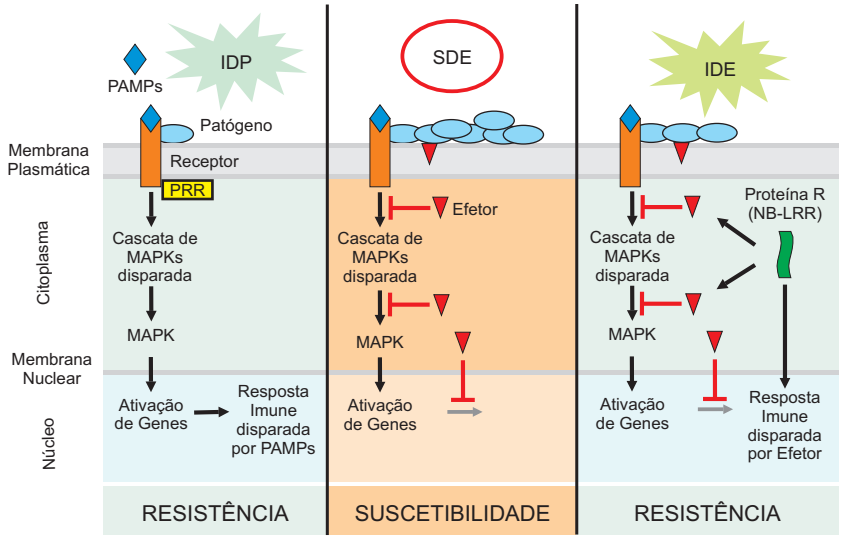


Figura 5. Modelo para a evolução do sistema imune de plantas. IDP: imunidade disparada por PAMPs; PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos; PRR: receptores de reconhecimento de padrões moleculares; MAPKs: proteínas ativadas por mitógenos (MAP) cinases; SDE: suscetibilidade disparada por efetores; IDE: imunidade disparada por efetores; NB-LRR: domínios de ligação a nucleotídeos (NB) e de repetições ricas em leucina (LRR). Adaptado do modelo descrito por Chisholm et al. 2006 e Bent e Mackey 2007 para resistência a bactérias.

Muitos PAMPs têm sido identificados como essenciais para o metabolismo ou para a penetração e invasão de uma célula hospedeira e são, portanto, amplamente conservados entre as diversas espécies de patógenos (Tabela 1) (PARKER, 2003). Entre eles estão incluídos polissacarídeos de bactérias Gram-negativas, peptídeoglucanas de bactérias Gram-positivas, flagelinas eubacteriais, bem como glucanas, quitinas e proteínas derivadas de parede celular de fungos (NÜRNBERGER; BRUNNER, 2002).

A detecção de PAMPs pode ser extracelular ou intracelular e parece ser um importante componente da resistência de não-hospedeira e serve como a primeira linha de defesa contra a presença de patógenos em potencial. Diferentes PAMPs são muitas vezes percebidos pelos distintos receptores de reconhecimento padrão de superfície celu-

lar e ativam convergentes vias de sinalização intracelular em células de plantas para obtenção de imunidade de amplo espectro, também conhecida como resistência basal.

Tabela 1. Padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e suas atividades na indução de defesa em plantas.

PAMP	Patógeno	Estrutura mínima requerida para ativação de defesa	Resposta biológica
LPS	*Xanthomonas* *Pseudomonas*	Lipídeo A?	Explosão oxidativa, produção de enzimas antimicrobianas em pimenta, fumo, aumento do potencial de defesa da planta à infecção bacteriana.
Flagelina	Bactérias Gram negativas	flg22 (fragmento do amino terminal da flagelina)	Indução das respostas de defesa em *Arabidopsis*, arroz e solanáceas.
Fator de elongação (EF-Tu)	Bactérias Gram negativas	Efl18 (fragmento amino terminal N-acetilado do EF-Tu)	Indução das respostas de defesa em *Arabidopsis* e outras brássicas.
Harpina (HrpZ)	*Pseudomonas* *Erwinia*	Indefinido	HR, indução de resposta de defesa em várias plantas, resistência sistêmica adquirida.
Proteína indutora de necrose	*Bacillus* spp. *Fusarium* spp. *Phytophthora* spp. *Pythium* spp.	Indefinido	HR, indução de resposta de defesa em várias dicotiledôneas.
Transglutaminase	*Phytophthora* spp.	Motivo Pep-13 (epitopo exposto da transglutaminase)	Indução de resposta de defesa em salsa e batata.
Elicitinas	*Phytophthora* spp. *Pythium* spp.	Indefinido	HR, indução de resposta de defesa em fumo e resistência sistêmica adquirida.
Xylanase	*Trichoderma* spp.	Pentapeptídeo TKLGE (epitopo exposto da xilanase)	HR, produção de etileno em fumo e tomate.
Invertase	Fermento	Peptídeo N-manosilado (fragmento da invertase)	Ativação da rota dos fenilpropanoides e produção de etileno em tomate.

Continua...

Tabela 1. Continuação.

PAMP	Patógeno	Estrutura mínima requerida para ativação de defesa	Resposta biológica
β -glucanas	*Pyricularia oryzae* *Phytophthora* spp. Algas marrons	Tetraglicosil glucitol, hepta- -glucosídeo ramificado, oligo- -glucosídeo linear	Indução de resposta de defesa em legumes, fumo e arroz.
Fucanas sulfatados	Algas marrons	Oligossacarideos de fucanas	Indução de resposta de defesa em tomate e resistência sistêmica adquirida à infecção viral.
Quitina	Vários fungos	Oligossacarídeos de quitina (grau de polimerização > 3)	Indução de resposta de defesa em tomate, *Arabidopsis*, arroz, trigo e cevada.
Ergosterol	Vários fungos	Indefinido	Indução de fluxo de íons em tomate.
Cerobrosídios A,C	*Magnaporthe* spp.	Base esfingoide	Produção de fitoalexinas em arroz.
Glicoproteínas fúngicas	Vários fungos	N-acetil-glicosamina	Indução de resposta de defesa em salsa.

Adaptado de Nürnberger e Lipka, 2005.

Embora um crescente número de componentes do tipo PAMPs tenha sido identificado, os receptores em potencial para a maioria deles ainda são desconhecidos. Entre os receptores de PAMPs de plantas publicados, citam-se o receptor de flagelina em *Arabidopsis* (AtFLS2), a proteína de ligação à -glucana (GnGBP) e o receptor de xilanase (LeEIX) em arroz (KUNZE, 2005).

Reconhecimento de efetores e Imunidade Disparada por Efetores (IDE)

A imunidade disparada por efetores envolve o reconhecimento direto ou indireto por proteínas R das muitas proteínas microbianas usadas para subverter IDP (Figura 5). Esse reconhecimento de um efetor pelas proteínas NB-LRR pode ser direto, explicado pelo sistema gene-a gene, em que proteínas R reconhecem diretamente produtos de genes *AVR,* ou indireto, explicado pela Hipótese Guarda, em que proteínas R estariam guardando, como um sensor, impactos

sobre outras proteínas para responder (JONES; TAKEMOTO, 2004). No reconhecimento indireto, proteínas R reconhecem efetores ligados a proteínas de planta chamadas "alvos de efetores de patógenos". A ativação de resistência mediada por proteína R também suprime o crescimento do patógeno, mas não antes que o invasor tenha tido uma oportunidade para proliferação limitada. Não é surpreendente que patógenos tenham adaptado efetores para interferirem com a Imunidade Disparada por Efetores, fenômeno bem conhecido sob condições de campo como "quebra da resistência".

Os efetores secretados por patógenos são introduzidos no citosol da planta hospedeira por algum sistema de secreção, tal como o sistema de secreção Tipo III, a exemplo de algumas bactérias (CHISHOLM et al., 2005), ou sistema de secreção baseado em motivos presentes na sequencia primária do efetor, a exemplo dos motivos RXLR-EER de *Phytophthora* spp. (KAMOUN, 2006). Na Tabela 2, contém uma compilação de efetores caracterizados bioquimicamente e suas proteínas R correspondentes.

Tabela 2. Atividade enzimática de efetores caracterizados bioquimicamente e eliciadores selecionados .

Efetores	Organismo	Função Bioquímica	Alvo na planta	Gene R	Fenótipo	Referência
AvrRpt2	*Pseudomonas syringae*	Protease*	RIN4	*RPS2*	Quebra RIN4, interfere na defesa mediada por genes R, inibe a defesa basal, e manipula a rota do ácido jasmônico (AJ)	1
AvrB	*Pseudomonas syringae*		RIN4	*RPM1*	Fosforilação do RIN4, manipula a rota do AJ	1
AvrRpm1	*Pseudomonas syringae*		RIN4	*RPM1*	Fosforilação do RIN4, inibe a defesa basal	1
HopPtoD2	*Pseudomonas syringae*	Fosfatase*			Suprime a HR e a expressão de PRP**	1
AvrPphB	*Pseudomonas syringae*	Protease*	PBS1	*RPS5*	Quebra a PBS1, manipula a rota do AJ	1
AvrPtoB	*Pseudomonas syringae*	E3 ligase, uma enzima conjugada a ubiquitina		*Pto*		2
XopD	*Xanthomonas campestris*	Cisteína protease*	SUMO			1
AvrXv4	*Xanthomonas campestris*	Cisteína protease	SUMO	*XV4*		1
AvrBsT	*Xanthomonas campestris*	Cisteína protease	SUMO			1
Avr2	*Cladosporium fulvum*	Inibidor de Protease	Rcr3	*Cf-2*	Inibe a atividade de RCR3	3
Avr4	*Cladosporium fulvum*	Ligação à quitina*	Chitinase	*Cf-4*		4
Avr9	*Cladosporium fulvum*			*Cf-9*		5
EPI10	*Phytophthora infestans*	Inibidor de protease “Kazal-like”*	Subtilisina A, P69B subtilase		Interage e interfere na PRP** P69B de tomate e subtilisina A	6
EPI1	*Phytophthora infestans*	Inibidor de protease “Kazal-like”*	P69B subtilase		Interage e interfere na PRP P69B de tomate	7
Ecp2	*Cladosporium fulvum*			*Cf-ECP2*		5
PWL1 e PWL2	*Magnaporthe grisea*					8

Continua...

Tabela 2. Continuação.

Efetores	Organismo	Função Bioquímica	Alvo na planta	Gene R	Fenótipo	Referência
AVR2-YAMO	*Magnaporthe grisea*					8
AvrM	*Melampsora lini*			*M*		9
AvrP4	*Melampsora lini*			*P4*		9
AvrP123	*Melampsora lini*			*P1, P2, P3*		9
Nip1	*Phynchosporium secalis*			*Rrs1*		8
AvrL567	*Melampsora lini*			*L5, L6, L7*		10
ATR1^{NdWsB}	*Hyaloperonospora parasitica*			*RPP1*		11
ATR13	*Hyaloperonospora parasitica*					12
Avr3a	*Phytophthora infestans*			*R3a*		13
Avr1b	*Phytophthora infestans*			*Rps1b*		14
Avr-Pita	*Magnaporthe grisea*	Metaloprotease		*Pi-ta*		15

*Função bioquímica demonstrada in vitro; **PRP: proteína relacionada à patogênese. ***Referências: (1) Revisado por Mudgett (2005): (2) Janjusevic et al., 2005: (3) Rooney et al., 2005: (4) Van den Burg et al., 2003: (5) Revisado por Rivas & Thomas (2005): (6) Tian et al., 2005: (7) Tian et al., 2004: (8) Revisado por Lauge & De Wit (1998): (9) Catanzariti et al, 2005: (10) Dodds et al., 2004: (11) Rehmany et al., 2005: (12) Allen et al., 2004: (13) Armstrong et al., 2005: (14) Shan et al., 2004: (15) Jia et al., 2000.

Fonte: Resende et al., 2007, adaptado de Chisholm et al., 2006.

Jones e Dangl (2006) e Bent e Mackey (2007) representaram a evolução do sistema imune de plantas em quatro etapas (Figura 6). Na primeira fase, PAMPs/MAMPs são reconhecidos por PRRs, resultando na IDP que pode impedir futura colonização. Na segunda fase, patógenos bem-sucedidos secretam efetores que contribuem para a virulência do patógeno e podem interferir com a IDP. Isso resulta na *suscetibilidade disparada por efetor* (SDE). Na terceira fase, um dado efetor é *'especificamente reconhecido'* direta ou indiretamente por uma das proteínas R contendo domínios NB-LRR (*nucleotide binding-leucin rich repeat*), resultando na *imunidade disparada pelo efetor* (IDE). A IDE é uma resposta de IDP amplificada e acelerada, resultando em uma resistência a doença e, normalmente, uma resposta de morte celular hipersensitiva (HR) no sítio da infecção. Na quarta fase, a seleção natural direciona patógenos para se esquivarem da IDE por meio de mudança ou diversificação do gene efetor reconhecido por uma proteína R, ou pela aquisição de efetores adicionais capazes de suprimir a IDE. A seleção natural resulta em novas especificidades de modo que a IDE possa ser eliciada novamente.

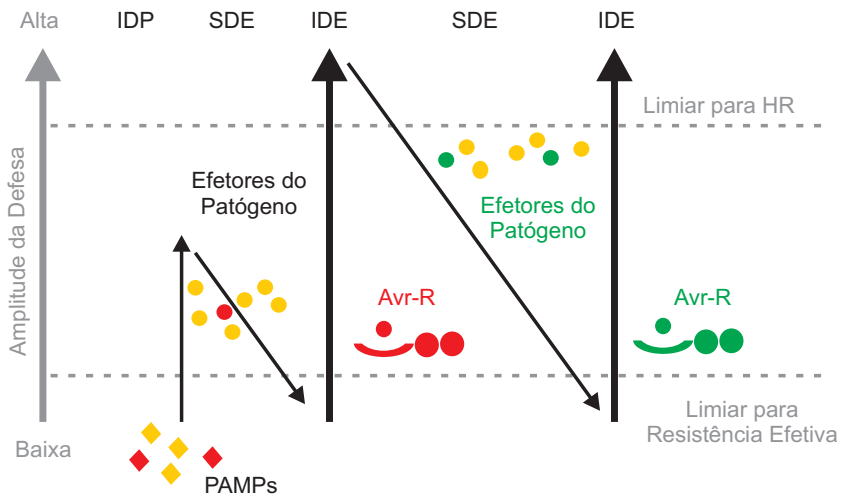


Figura 6. Modelo em ziguezague do rendimento quantitativo da evolução do sistema imune de plantas, proposto por Jones e Dangl (2006).

No esquema mostrado na Figura 6, a amplitude máxima de resistência e suscetibilidade é proporcional a [IDP – SDE + IDE], e a IDE ultrapassa o limiar de indução da morte celular hipersensitiva (HR). Os isolados do patógeno são selecionados para aqueles que perderam o efetor (róseo) que levou a primeira IDE, e talvez tenham ganhado novos efetores através de fluxo gênico horizontal (em verde) – os quais podem ajudar patógenos a suprimir a IDE. A seleção favorece novos alelos NB-LRR em plantas que podem reconhecer um dos efetores recém-adquiridos, resultando novamente em IDE.

Nesse contexto, a *resistência basal* pode ser definida como aquela ativada por patógenos virulentos sobre plantas suscetíveis. É considerada a Imunidade Disparada por PAMPs menos os efeitos da Suscetibilidade Disparada por Efetores, ou pode ser ainda uma SDE fraca eliciada pelo fraco reconhecimento de efetores. Portanto, uma definição mais acurada poderia ser "resistência basal = IDP + fraca IDE – SDE" (JONES; DANGL, 2006).

Dessa forma, é possível notar que plantas, apesar de não possuírem células móveis para se defenderem, nem um sistema imune adaptativo, de memória, como ocorre em animais, elas contam com a imunidade inata de cada célula e com sinais sistêmicos que emanam de sítios de infecções.

Considerações finais

Nos últimos anos, foi possível observar um incremento em nossos conhecimentos a cerca da natureza, elicitação e regulação de defesas de plantas a micróbios, e muitas descobertas são aplicáveis ao nosso entendimento da resistência de não-hospedeira. Entretanto, a identificação inequívoca de características que realmente impedem o desenvolvimento de patógenos em uma determinada planta não-hospedeira ainda é rara, assim como para plantas hospedeiras. Portanto, novas questões estão sempre surgindo na elucidação do "Dogma Central" da resistência de plantas a doenças e sobre quais seriam as estratégias mais eficientes para se obter visando resistência durável e de amplo espectro contra micróbios em espécies economicamente importantes.

Em virtude da conhecida durabilidade da resistência de não-hospedeiras ao longo dos tempos, comumente especula-se que essa resis-

tência possa ser explorada por melhoristas de plantas para aumentar a resistência a doenças em espécies hospedeiras. Por engenharia genética, estudos têm focalizado o uso de genes R ou genes de defesa oriundos de espécies heterólogas, ou combinações deles. Ou seria melhor o uso de genes de origem do patógeno? A superexpressão de individuais componentes de defesa não específicos em plantas transgênicas tem sido testada com vários graus de sucesso, incluindo peptídeos antimicrobianos nativos ou engenheirados. Entre as novas estratégias para se obter resistência a doença de amplo espectro está o uso de genes de eliciadores não específicos de origem de patógenos sob comando de promotores induzíveis por patógenos.

De qualquer forma, a elucidação de mecanismos que controlam a evolução de interações planta-micróbios será enormemente impactada pelas novas tecnologias, que incluem sequenciamento rápido de genomas e o desenvolvimento de métodos computacionais para analisar a riqueza e a abundância de informação genômica. Por fim, um completo entendimento da base molecular da resistência de plantas a doenças permitirá a aplicação dessas novas descobertas para construir plantas que contenham novas combinações de vias de resistência a doenças que sejam duráveis e reconheçam um amplo espectro de patógenos. Estudos concomitantes que empregam tecnologias pós-genômicas, incluindo estratégias de sistemas biológicos, irão permitir o entendimento da expressão de todos os genes e proteínas em uma planta que são simultaneamente expressos durante a expressão de resistência. Essas tecnologias irão permitir nosso entendimento sobre as interações complexas que ocorrem entre vias múltiplas que são expressas durante a resistência.

Referências

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 4th ed. California: Academic Press, 1997. 635 p.

ALLEN, R. L.; BITTNER-EDDY, P. D.; GRENVILLE-BRIGGS, L. J.; MEITZ, J. C.; REHMANY, A. P.; ROSE, L. E.; BEYNON, J. L. Host-parasite coevolutionary conflict between *Arabidopsis* and downy mildew. **Science**, v. 306, p. 1957-60, 2004.

ARMSTRONG, M. R.; WHISSON, S. C.; PRITCHARD, L.; BOS, J.I .; VENTER, E.; AVROVA, A. O.; REHMANY, A. P.; BOHME, U.; BROOKS, K.; CHEREVACH, I. An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. **Proceedings of the National Academy of Science of USA,** v. 102, p. 7766-71, 2005.

BENT, A. F.; MACKEY, D. Elicitors, effectors and r genes. **Annual Review of Phytopathology,** v. 45, p. 399-436. 2007.

CATANZARITI, A. M.; DODDS, P. N.; LAWRENCE, G. J.; AYLIFFE, M. A.; ELLIS, J. G. Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. **Plant Cell,** v. 18, p. 243-56. 2005.

CHISHOLM, S. T.; DAHLBECK, D.; KRISHNAMURTHY, N.; DAY, B.; SJOLANDER, K.; STASKAWICZ, B. J. Molecular characterization of proteolytic cleavage sites of the *Pseudomonas syringae* effector *AvrRpt2*. **Proceedings of the National Academy of Science of USA,** v. 102, p. 2087-92, 2005.

CÔTÉ, F.; CHEOG, J. J.; ALBA, R.; HAHN, M. G. Characterization of binding proteins that recognize oligoglucoside eliciadors of phytoalexins in soybean. **Physiologia Plantarum,** v. 93, p. 401-10. 1995.

DODDS, P. N.; LAWRENCE, G. J.; CATANZARITI, A. M.; AYLIFFE, M. A.; ELLIS, J. G. The *Melampsora lini AvrL567* avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. **Plant Cell,** v. 16, p. 755-68, 2004.

FLOR, H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology,** v. 9, p. 275-96, 1971.

GRANT, M.; LAMB, C. Systemic immunity. **Current Opinion in Plant Biology** v. 9, p. 414-20. 2006.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAM, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville, Maryland: APS Press, 2000 p. 1102-56

HEATH, M. C. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology,** v. 3, p. 315–319, 2000.

JANJUSEVIC, R.; ABRAMOVITCH, R. B.; MARTIN, G. B.; STREBBINS, C. E. 2005. A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. **Science,** v. 311, p. 222-6.

JONES, D. A.; TAKEMOTO, D. Plant innate immunity: direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. **Current Opinion in Immunology,** v. 16, p. 48–62, 2004.

JONES, J. D. G.; DANG, L. J. L. The plant immune system. **Nature,** v. 444 n. 16, p. 323-329. 2006.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 16, 232-239, 2006.

KAMOUN, S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. **Annual Review Phytopathology,** v. 44, p. 41-60. 2006.

KNOGGE W. Fungal infection of plants. **Plant Cell,** v. 8, p. 1711-1722, 1996.

KOBAYASHI, et al. Recognition of a pathogen and a nonpathogen by barley coleoptile cells: III: responses of microtubules and actin filaments in barley coleoptile cells to penetration attempts. **Canadian Journal of Botany,** v. 70, p. 1815-1825, 1992.

KUNZE, G. U. **Characterization of a novel bacterial PAMP**: elongation factor tu - and its role in *Arabidopsis thaliana* defense and immunity. 2005. 168 f. (Ph.D. Thesis). Univerity of Basel, Suíça.

LAUGE, R.; DE WIT, P. J. G. M. Fungal avirulence genes: structure and possible functions. **Fungal Genetic and Biology,** v. 24, p. 285-97, 1998.

MARTIN, G. B., Functional analysis of plant disease genes and their downstream effectors. **Current Opinion in Plant Biology,** v. 2, p. 273–279, *1999.*

MONTESINOS, E.; BONATERRA A.; BADOSA, E.; FRANCES, J. ALEMANY J.; LLORENTE I.; MORAGREGA, C. Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. **International Microbiology,** v. 5, p. 169–175. 2002.

MUDGETT, M. B. New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. **Annual Review of Plant Biology,** v. 56, p. 509-31, 2005.

MYSORE, K. S.; RYU, C. Nonhost resistance: how much do we know? **TRENDS in Plant Science,** v. 9 n. 2, p. 97-104, 2004.

NÜMBERGER, T.; LIPKA, V. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. **Molecular Plant Pathology,** v. 6, p. 335–345. 2005.

NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen associated molecular patterns. **Current Opinion in Plant Biology,** v. 5, p. 318-24, 2002.

OH, S.; LEE, S.; CHUNG, E.; PARK, J.; MEE; Y., SEUNG, H.; RYU, C.; CHOI, D. Insight into types I and II nonhost resistance using expression patterns of defense-related genes in tobacco. **Planta,** v. 223, n. 5, p. 1101-1107, 2006.

PARKER, J. E. Plant recognition of microbial patterns. **Trends in Plant Science,** v. 8, p. 245-7, 2003.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas,** n. 2, p. 1-51. 1994.

PEART, J. R.; LU, R; SADANANDOM, A. et al. Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is requerid for host and non-host disease resistance in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 10865-10869. 2002.

REHMANY, A. P.; GORDON, A.; ROSE, L. E.; ALLEN, R. L.; ARMSTRONG, M. R.; WHISSON, S. C.; KAMOUN, S.; TYLER, B. M.; BIRCH, P. R. J.; BEYNON, J. L. Differential recognition of highly divergent downy mildew avirulence gene alleles by RPP1 resistance genes from two Arabidopsis lines. **Plant Cell,** v. 17, p. 1839–1850, 2005.

RIVAS, S.; THOMAS, C.M. Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. **Annual Review of Phytopathology** v.43, p.395-436. 2005.

ROONEY, H. C.; VAN'T KLOOSTER, J. W.; VAN DER HOORN, R. A.; JOOSTEN, M. H.; JONES, J. D.; DE WIT, P. J. G. M. *Cladosporium* Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. **Science,** v.308, p. 1783-6. 2005.

SHAN, W.; CAO, M.; LEUNG, D.; TYLER, B. M. The Avr1b locus of Phytophthora sojae encodes an elicitor and a regulator required for avirulence on soybean plants carrying resistance gene Rps1b. **Molecular Plant-Microbe Interactions,** v. 17, p. 394-403. 2004.

THORDAL-CHRISTENSEN H. Fresh insights into processes of nonhost resistance. **Current Opinion in Plant Biology,** n. 6, v. 4, p. 351-7, 2003.

TIAN, M.; BENEDETTI, B.; KAMOUN, S. A Second kazal-like protease inhibitor from Phytophthora infestans inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato. **Plant Physiology,** v. 138, p. 1785–1793, 2005.

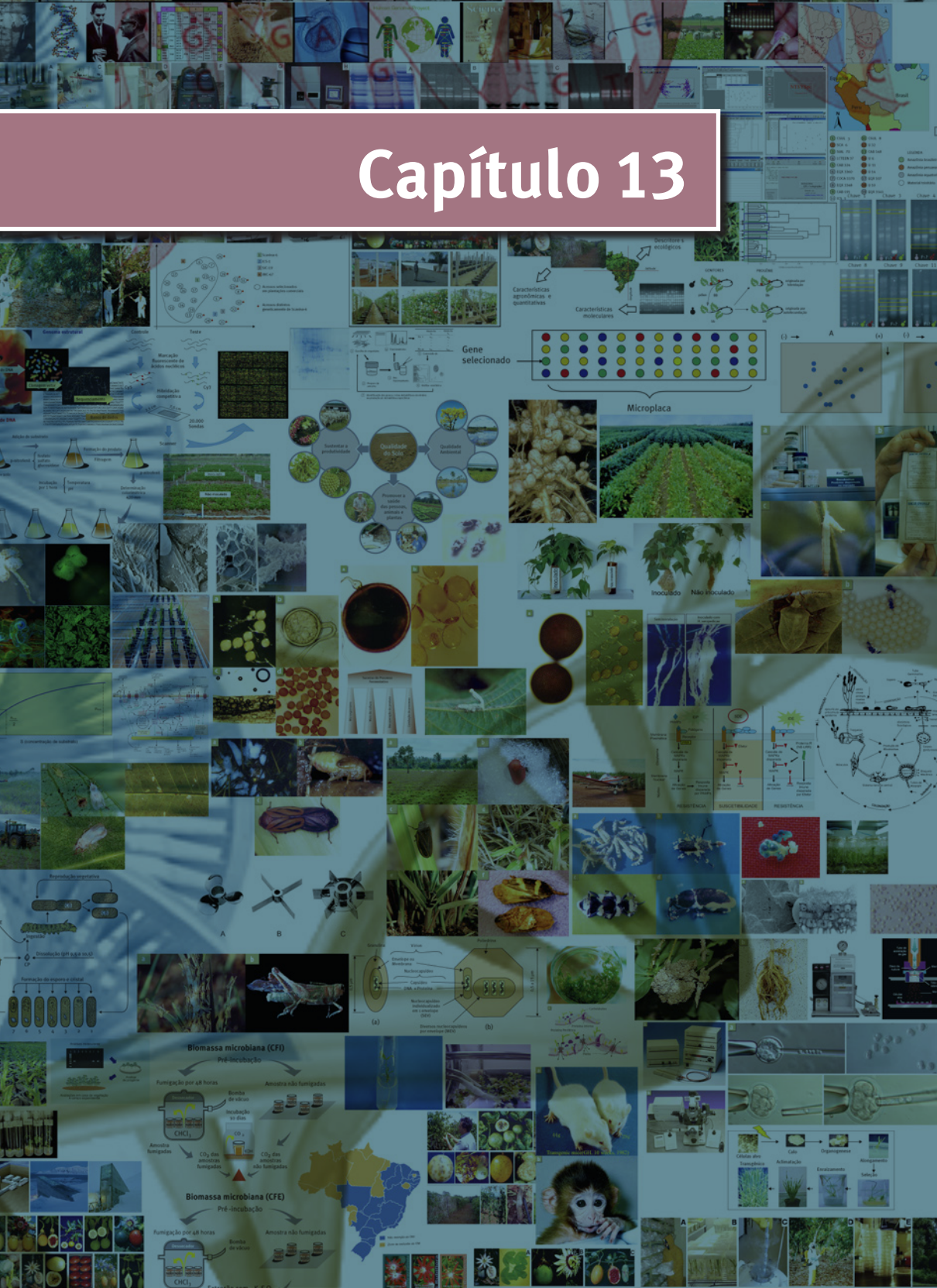
TIAN, M.; HUITEMA, E.; DA CUNHA, L.; TORTO-ALALIBO, T.; KAMOUN, S. A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from Phytophthora infestans targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. **Journal Biology Chemistry**, v. 279, p. 26370–26377, 2004.

VAN DEN BURG, H. A.; WESTERINK, N.; FRANCOIJS, K. J.; ROTH, R.; WOESTENENK, E.; BOEREN, S.; DE WIT, P. J. G. M.; JOOSTEN, M. H.; VERVOORT, J. Natural disulfide bond-disrupted mutants of AVR4 of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are sensitive to proteolysis, circumvent Cf-4-mediated resistance, but retain their chitin binding ability. **Journal of Biological Chemistry,** v. 278, p. 27340-6. 2003.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; Pieterse, C. M. J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. **Annual Review Phytopathology**, v. 44, p. 135-162, 2006.

YUN et al. Loss of actin cytoeskeletal function and EDS1 activity, in combination, severely compromises non-host resistance in Arabidopsis against wheat powdery mildew. **Plant Journal**, v. 34, p. 768-777. 2003.

Capítulo 13


Gene selecionado
Microplaca
Inoculado
Não inoculado
Biomassa microbiana (CFI)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas
Biomassa microbiana (CFE)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas

Controle biológico de insetos-praga

Roberto Teixeira Alves

Introdução

De uma maneira geral, segundo Gallo et al. (2002), os meios de controle de insetos-praga são os seguintes:

- Métodos legislativos: quarentena, medidas obrigatórias, fiscalização do comércio.
- Métodos mecânicos: barreiras, esmagamento, sulcos armadilha, frasco caça-mosca, etc.
- Métodos culturais: rotação, aração, época de plantio, destruição de restos de cultura, cultura no limpo, adubação, poda, irrigação, plantio direto.
- Métodos de controle físico: fogo, drenagem, inundação, som, temperatura, armadilhas luminosas, radiação, etc.
- Resistência de plantas: não preferência ou antixenose, antibiose e tolerância.
- Métodos de controle por comportamento: atraentes, repelentes e feromonas.
- Método químico: inseticidas, fungicidas, nematicidas e herbicidas.
- Métodos de controle biológico: patógenos, parasitoides e predadores.

Como se observa, o controle biológico é um dos vários métodos existentes de controle de insetos-praga.

É importante entender bem o conceito de controle biológico e que existem várias formas de conceituá-lo; no entanto, neste capítulo, ele será conceituado como o método que consiste no controle de pragas por meio de inimigos naturais, que são os organismos que mantêm os níveis de população dessas pragas em equilíbrio. O controle biológico deve ser considerado como um componente de programas de

Manejo Integrado de Pragas (MIP), ao lado de outros métodos de controle de insetos e ácaros (GALLO *et al.*, 2002) citados anteriormente.

Como exemplos de organismos denominados inimigos naturais, podem-se citar os vírus, bactérias, fungos, nematoides, ácaros, aranhas, insetos, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos, em que se inclui o homem.

Alguns organismos possuem maior potencial para o controle biológico de pragas, como os fungos, bactérias, vírus, alguns predadores e insetos parasitoides, por ser possível multiplicá-los em maior escala em laboratórios e ser fácil aplicá-los ou liberá-los no campo.

Pode-se entender como predadores os organismos benéficos, inimigos naturais, que geralmente consomem mais de uma presa para completarem seu desenvolvimento, podendo atacar uma grande variedade de insetos-praga. O predador pode mudar sua preferência alimentar de acordo com a abundância populacional da praga (GALLO et al., 2002; VAN DRIESCHE; BELLOWS, 1996). São exemplos: aranhas, peixes, anfíbios, répteis, aves, mamíferos e insetos predadores como *Cycloneda sanguinea*, *Nabis* spp., *Calosoma granulatum*, etc.

Já os parasitoides são insetos que necessitam, na maioria das vezes, de apenas um indivíduo do hospedeiro para completar o seu desenvolvimento. Eles matam seu hospedeiro. Geralmente são mais específicos que os predadores (GALLO et al., 2002; VAN DRIESCHE; BELLOWS, 1996). São exemplos: *Cotesia flavipes, Trissolcus basalis, Neodusmetia sangwanis, Trichogramma pretiosum,* etc.

Os patógenos são microorganismos causadores de doenças em insetos; neles se desenvolvem com certa rapidez, terminando por causar a morte da praga. Alguns patógenos são facultativos e outros são obrigatórios. Os facultativos se desenvolvem tanto no inseto-hospedeiro como em meio de cultura artificial. São exemplos: fungos como *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Nomuraea rileyi*, bactéria como *Bacillus thuringiensis*, etc. Os obrigatórios, por sua vez, só se desenvolvem no inseto-hospedeiro, como o *Baculovírus anticarsia* e o *B. erinnys* (ALVES, 1986).

Segundo Gallo et al. (2002), sempre que se trabalha com controle biológico de insetos-praga, deve-se adotar os seguintes procedimentos: introdução, conservação e multiplicação dos inimigos naturais no

ambiente. Cada um desses procedimentos representará um tipo de controle biológico: o controle biológico clássico, o natural e o aplicado.

O controle biológico clássico consiste na importação e colonização de parasitoides ou predadores, visando ao controle de pragas exóticas ou nativas. As liberações desses inimigos naturais eram ou são inoculativas, em pequeno número de insetos, como medida de controle no longo prazo mais utilizada em culturas perenes ou semiperenes (GALLO et al., 2002; VAN DRIESCHE; BELLOWS, 1996). Os entomopatógenos também podem ser introduzidos em pequena escala, dentro de um programa de controle biológico clássico.

O controle biológico natural refere-se à população de inimigos naturais que ocorre naturalmente. Visa a uma conservação dos inimigos naturais que devem ser preservados e até aumentados por meio de manipulação do seu ambiente de alguma forma favorável como o uso de inseticidas seletivos, uso de doses reduzidas de agrotóxicos, manutenção do habitat e de fontes de alimentação para esses inimigos naturais (GALLO et al., 2002; VAN DRIESCHE; BELLOWS, 1996). Os entomopatógenos também podem ser conservados por meio da manipulação adequada do ambiente, conforme explicado anteriormente.

O controle biológico aplicado trata de liberações de parasitoides ou predadores, após sua produção massal em laboratório, visando à redução rápida da população da praga para seu nível de equilíbrio (GALLO et al., 2002; VAN DRIESCHE; BELLOWS, 1996). É nele que se encaixam, com maior intensidade, os patógenos mais utilizados como produtos microbianos no controle de pragas.

Somente os patógenos e os parasitos serão enfatizados neste capítulo, por serem mais fáceis de ser multiplicados e utilizados em maior escala no Brasil.

Vantagens e desvantagens do controle biológico de insetos-praga

Segundo Alves (1986) e Gallo *et al.* (2002), existem vantagens e desvantagens em se utilizar o controle biológico, assim como acontece ao se utilizar outros métodos de controle, como o químico.

Vantagens

- Apresenta especificidade na maioria das vezes, isto é, controla apenas a praga visada sem afetar outros insetos e inimigos naturais.
- Apresenta capacidade de multiplicação e dispersão natural no campo.
- Os patógenos provocam efeitos secundários benéficos: diminuem a oviposição e a viabilidade dos ovos e aumentam a sensibilidade da população da praga a outros agentes biológicos e químicos.
- Controle mais duradouro.
- Liberação simples no campo ou aplicação com equipamento convencional.
- Não causa poluição ou toxicidade.
- Pode ser utilizado em cultivos orgânicos, que produzem alimentos mais saudáveis e é um mercado que está em franca expansão.
- Os insetos-praga dificilmente poderão se tornar resistentes aos patógenos ou ao ataque de predadores e de parasitos.
- Normalmente são mais baratos que os produtos químicos.

Desvantagens

- A especificidade não permite que o inimigo natural tenha um largo espectro de ação sobre diferentes pragas ao mesmo tempo.
- Determinados patógenos necessitam de condições climáticas favoráveis.
- Exigem maiores cuidados no armazenamento.
- Exige certo grau de conhecimento de tecnologia, às vezes de difícil implementação, por causa do nível cultural de alguns agricultores.

Entomopatógenos

Os entomopatógenos são os microrganismos causadores de doenças em insetos e alguns deles podem ser multiplicados em laboratório e aplicados racionalmente no campo ou em casas de vegetação, visando baixar a população de insetos-praga a níveis economicamente não pre-

judiciais (ALVES, 1986). Vale lembrar que eles devem sempre ser utilizados como parte de um programa de manejo integrado de pragas.

Entomopatógenos a base de fungos, bactérias e vírus são os mais utilizados no Brasil e serão comentados neste capítulo.

Desenvolvimento da doença no inseto-praga

Alguns conceitos e informações são necessários para uma compreensão maior de como os entomopatógenos agem sobre as pragas e como os fatores ambientais e fatores bióticos afetam o desenvolvimento da doença sobre a praga visada.

Pode-se conceituar epizootia como a ocorrência de uma doença, de forma generalizada, na população de uma ou mais espécie de inseto em um determinado ambiente.

A epizootiologia, segundo Alves (1986), envolve os estudos dos fatores que determinam e controlam a dinâmica de doenças em populações de insetos.

O desenvolvimento de uma doença em uma população de insetos pode ser demonstrado por uma curva denominada curva epizoótica (TANADA, 1963). Segundo o mesmo autor, a fase pré-epizoótica se caracteriza por um baixo número de hospedeiros doentes. A fase epizoótica se caracteriza por elevado índice de doença em consequência da multiplicação e disseminação do inóculo produzido nos focos primários, e a pós-epizoótica se caracteriza pela diminuição do número de insetos atacados em relação à fase anterior, conforme a Figura 1, adaptada de Alves (1986).

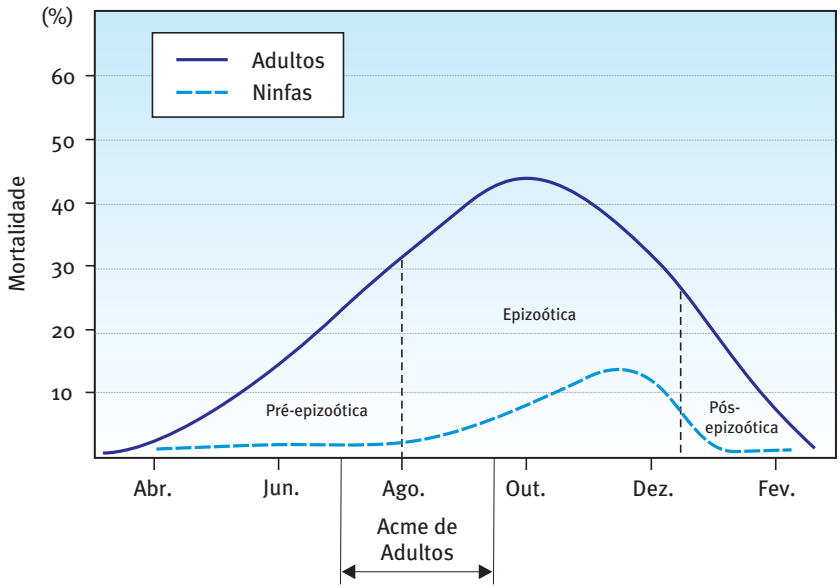


Figura 1. Número de adultos e ninfas de *Mahanarva posticata* contaminadas por *Metarhizium anisopliae* nas condições do Nordeste do Brasil, mostrando as diferentes fases da doença .

Fonte: Alves (1986).

Segundo Tanada (1963), os fatores que determinam a ocorrência ou não de uma epizootia podem ser classificados como bióticos ou abióticos.

Fatores bióticos

a) Condições do hospedeiro: quanto maior a densidade, a capacidade de migração e a predisposição do hospedeiro mais fácil será a ocorrência de epizootias.
b) Condições dos patógenos: alta virulência, alta capacidade de reprodução, alta capacidade de sobrevivência e de disseminação no ambiente são características importantes que o patógeno necessita apresentar para que ocorram epizootias.

c) As vias de infecção de alguns patógenos, segundo Alves (1998), são as seguintes:
   - Fungos – normalmente penetram no inseto através do tegumento, com atuação enzimática ou através da pressão mecânica exercida pelo tubo germinativo e apressório.
   - Bactérias – normalmente penetram via oral, com o inseto as ingerindo juntamente com o alimento.
   - Vírus – normalmente penetram via oral, com o inseto os ingerindo juntamente com o alimento.

d) Potencial de inóculo: é o número de propágulos viáveis sobre os órgãos suscetíveis dos hospedeiros capaz de iniciar o processo-doença (ALVES, 1998).

Na Tabela 1 (MOSCARDI; CORSO, 1980), pode-se observar como a dose do patógeno influencia na mortalidade e no tempo necessário para matar a praga. Quanto maior a dose, maior a mortalidade e menor o tempo necessário para que isso ocorra, porém deve-se avaliar a dose que seja eficiente e mais econômica para baratear a produção e o valor do produto final, a fim de que seja economicamente viável e utilizado em grande escala pelo produtor rural.

Tabela 1. Mortalidade de *Anticarsia gemmatalis* em relação a diferentes doses de *Baculovirus anticarsia* aplicadas a campo. Embrapa Soja. Londrina, PR. 1980.

Dose de vírus [1] (LE/ha)	Mortalidade [2,3] (%)	Tempo letal médio (dias)
0,0	2,60 e	-
10	72,40 d	8,13
20	79,30 cd	7,57
40	84,60 c	7,23
80	93,10 b	6,67
160	98,90 a	6,68
320	100,00 a	6,59

[1] 1LE = 1 lagarta grande (> 2,5 cm) morta pelo vírus ou cerca de 1,3 x 10^9 poliedros do vírus.
[2] Média de 3 repetições = 30 lagartas (3° - 4° ínstar)/repetição.
[3] Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Duncan a 5%).

Fonte: Moscardi e Corso (1980)

Ao se analisar a Tabela 1, pode-se dizer que a dose de 80 LE/ha é bastante eficiente e mata a lagarta da soja em 6,67 dias, que se asse-

melha ao resultado obtido na dose mais alta. Por isso, pode ser a dose escolhida para uso em maior escala.

Fatores abióticos

a) Temperatura: é um dos fatores de grande importância e atua sobre os patógenos afetando principalmente a estabilidade e, subsequentemente, sua aplicação e eficiência no campo.

Pode-se observar na Figura 2 a faixa média de temperatura favorável aos patógenos.

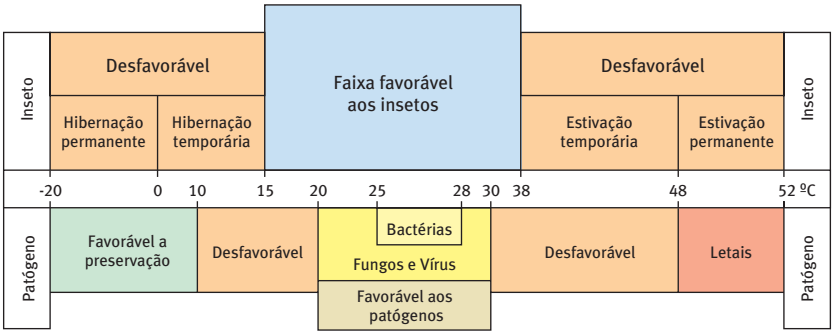


Figura 2. Escala de temperatura para insetos e patógenos.

Fonte: Alves (1986)

Existe uma faixa de temperatura entre 20 °C e 30 °C que é favorável ao desenvolvimento dos insetos e, ao mesmo tempo, também é favorável ao desenvolvimento dos patógenos. Observa-se que temperaturas acima de 30 °C são desfavoráveis ao desenvolvimento desses entomopatógenos e essa é uma das várias razões de eles não serem patógenos dos seres humanos.

b) Umidade: afeta pouco os vírus (*Baculovirus anticarsia* e outros), afeta pouco as bactérias esporulantes (*Bacillus thuringiensis* e outros), os quais podem ser armazenados por mais de três anos a 30% de umidade e continuam viáveis. Com relação aos fungos, afeta tanto no armazenamento como no desenvolvimento em campo, porém a umidade, para ser favorável ou desfavorável, vai depender de sua associação com a temperatura.

Com base no trabalho de Alves (1986), utilizando climogramas sobre um triângulo contendo condições favoráveis de temperatura e umidade para uma alta produção de conídios viáveis determinadas em laboratório, observa-se na Figura 3 que, na região de Belém, PA, durante os 12 meses do ano, pode-se aplicar o fungo *M. anisopliae* que a probabilidade de ocorrer epizootia é maior do que na região de Cuiabá, MT, e bem maior que na região de Quixadá, CE. Em Cuiabá, os meses favoráveis vão de novembro a julho do ano seguinte (Figura 4), pois estão dentro da zona favorável (triângulo) e, em Quixadá, todos os meses do ano estão fora do triângulo (Figura 5).

A condição mais comum no Brasil, onde ocorrem ataques de cigarrinhas na cana-de-açúcar e em pastagens, é semelhante ao que ocorre na região de Cuiabá, isto é, uma parte dos meses dentro da zona climática favorável e outra parte fora.

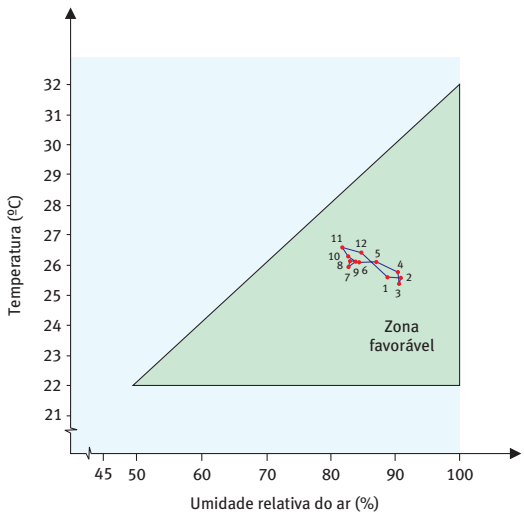


Figura 3. Climograma comparativo entre a região de Belém, PA, e a zona favorável a uma alta produção de conídios viáveis dos isolados E_9, PL-27 e PL-43 de *M. anisopliae*.

Fonte: Alves (1986).

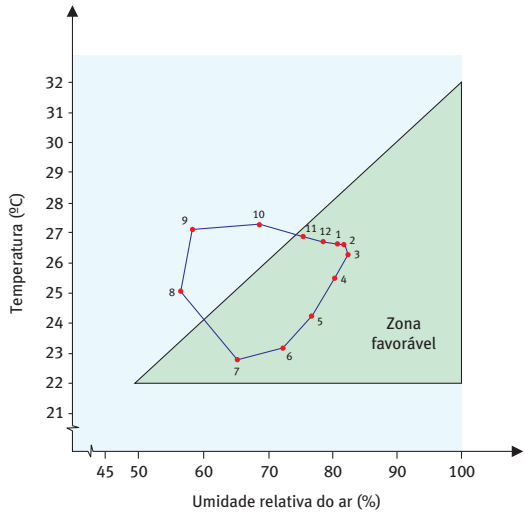


Figura 4. Climograma comparativo entre a região de Cuiabá, MT, e a zona favorável a uma alta produção de conídios viáveis dos isolados E_9, PL-27 e PL-43 de *M. anisopliae*.

Fonte: Alves (1986).

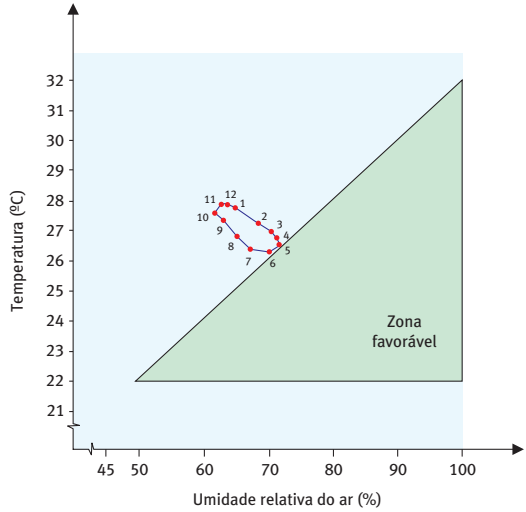


Figura 5. Climograma comparativo entre a região de Quixadá, CE, e a zona favorável a uma alta produção de conídios viáveis dos isolados E_9, PL-27 e PL-43 de *M. anisopliae*.

Fonte: Alves (1986).

c) Radiação: a radiação ultravioleta afeta as partículas de vírus, o complexo cristal-esporos das bactérias esporulantes e a germinação de conídios de fungos. O efeito prejudicial da radiação pode ser amenizado com uma formulação adequada e horário de aplicação adequado.

Alves *et al*. (1998) avaliaram a capacidade de proteção de diferentes formulações aos conídios de *M. anisopliae* contra os efeitos deletérios da radiação ultravioleta, e obtiveram resultados positivos com algumas formulações em óleos minerais e vegetais puros e em óleos emulsionáveis minerais e vegetais.

Os efeitos negativos da radiação sobre entomopatógenos podem ser bastante amenizados com o emprego de formulações apropriadas para cada tipo de patógeno a ser utilizado no campo em maior escala.

d) Outros fatores: algumas substâncias químicas na folhagem ou no solo podem ser tóxicas aos patógenos, como fungicidas, por exemplo.

Fungos entomopatogênicos

Modo de ação

Conforme pode ser visto na Figura 6 (ALVES, 1986), primeiramente, ocorre a adesão dos conídios do fungo no tegumento do inseto e, logo em seguida, inicia-se a germinação desses conídios (12 horas em temperaturas entre 23 °C e 30 °C). O processo de penetração se dá com atuação enzimática (lipases, proteases, amilases, etc) ou pela pressão mecânica exercida pelo tubo germinativo e apressório sobre o tegumento do inseto. A colonização tem início com a penetração das hifas que engrossam e se ramificam inicialmente no tegumento do inseto e depois no hemocele. A reprodução pode ser sexuada ou assexuada. Os conídios assexuais são os principais propágulos de Deuteromycotina, em que se incluem os gêneros *Metarhizium*, *Beauveria* e *Nomuraea*. A disseminação é a última fase, quando os propágulos infectivos, como os conídios de *M. anisopliae*, dispersam-se no ambiente com o auxílio do vento, chuva, homem e outros animais (ALVES, 1998).

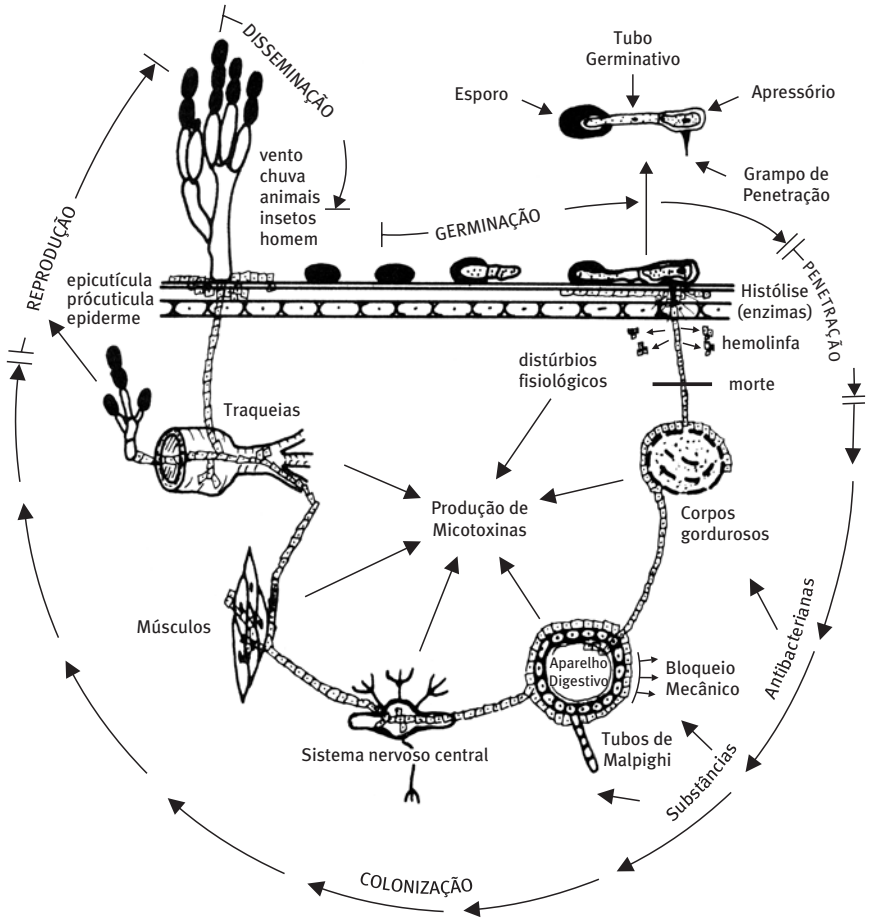


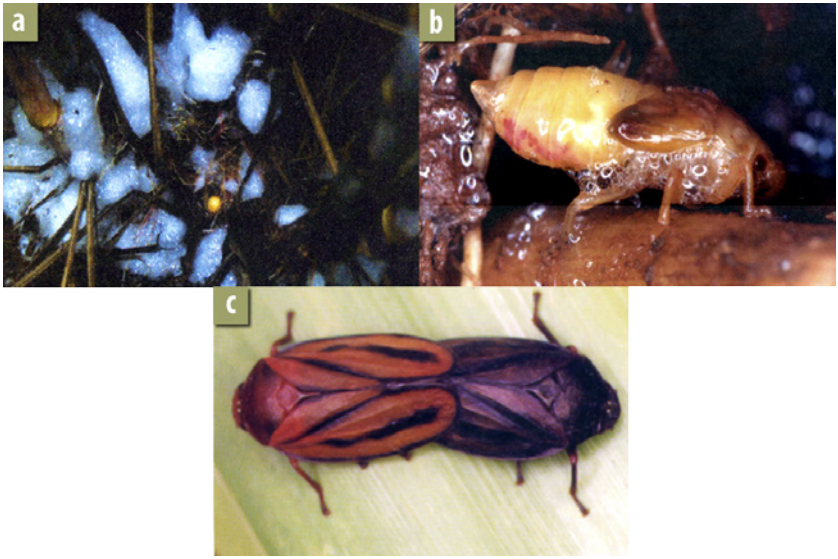
Figura 6. Esquema do ciclo das relações patógeno-hospedeiro (*M. anisopliae* x cigarrinha).

Fonte: Alves (1986).

Utilização de fungos no controle de insetos-praga no Brasil

a) *Metarhizium anisopliae* para o controle da cigarrinha-da-folha-da-cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata*, no Nordeste; e da cigarrinha-da-raiz-da-cana, *M. fimbriolata*, no Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. Esse controle já vem sendo utilizado

em grande escala desde a década de 1970 e está sendo cada vez mais aperfeiçoado e eficiente ao longo do tempo (Figura 7). Praticamente todas as áreas de produção de cana orgânica utilizam esse tipo de controle.



Fotos: José Francisco Garcia/www.cultivar.inf.br (2005)

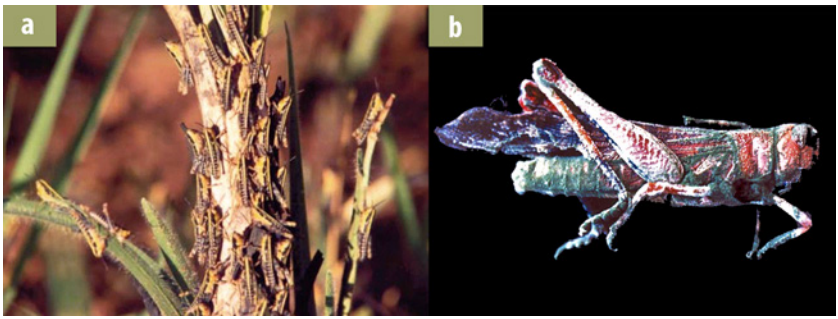
Figura 7. (A) Espumas provocadas pela sucção da seiva da cana pelas ninfas da cigarrinha-da-raiz-da-cana, *M. fimbriolata*.; (B) ninfa da cigarrinha-da-raiz-da-cana; (C) adultos da cigarrinha-da-raiz-da-cana.

b) *M. anisopliae* para controle de cigarrinha-das-pastagens dos gêneros *Deois*, *Notozulia* e *Mahanarva* nas regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (Figura 8). É bastante utilizado por alguns pecuaristas que não necessitam retirar o gado da pastagem durante a aplicação e que produzem carne de qualidade, sem resíduos de agrotóxicos.

Fotos: (A, B e C) Silvana Paula-Morais; (D e F) Roberto Alves ; (E) Márcio A. Naves

Figura 8. (A) Pastagem seca provocada pela sucção da seiva pelas ninfas e adultos da cigarrinha-da-raiz, *Mahanarva spectabilis*; (B) Adulto da cigarrinha-da-raiz, *M. spectabilis*, saindo da espuma; (C) Adulto da cigarrinha-da-raiz, *M. spectabilis*, sugando folha de Brachiaria; (D) Espumas de cigarrinha-das-pastagens, *Deois flavopicta* em Brachiaria; (E) Adulto da cigarrinha-das-pastagens, *D. flavopicta*, sugando folha de Brachiaria; (F) Adultos da cigarrinha *D. flavopicta*, mortos pelo fungo *M. anisopliae*.

c) *M. anisopliae* var. *acridum* para controle de gafanhotos no Mato Grosso e no Nordeste do Brasil (Figura 9). É utilizado em áreas protegidas como reservas indígenas onde não se pode aplicar produtos químicos (MAGALHÃES; LECOQ, 2007).



Fotos: (A) Michel Lecoq; (B) Claudio Melo

Figura 9. (A) Ninfas do gafanhoto *Rhammatocerus schistocercoides*; (B) Adulto do gafanhoto *R. schistocercoides* mortos pelo fungo *M. anisopliae* var. *acridum* .

d) *Sporothrix insectorum* para controle do percevejo-de-renda-da-seringueira, *Leptopharsa heveae*, no Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (Figura 10). Possui uma grande eficiência conforme demonstrado por Alves et al. (2003), pois a cultura da seringueira proporciona um microclima altamente favorável ao desenvolvimento de epizootias do fungo sobre o percevejo-de-renda.

Fotos: Nilton T. V. Junqueira

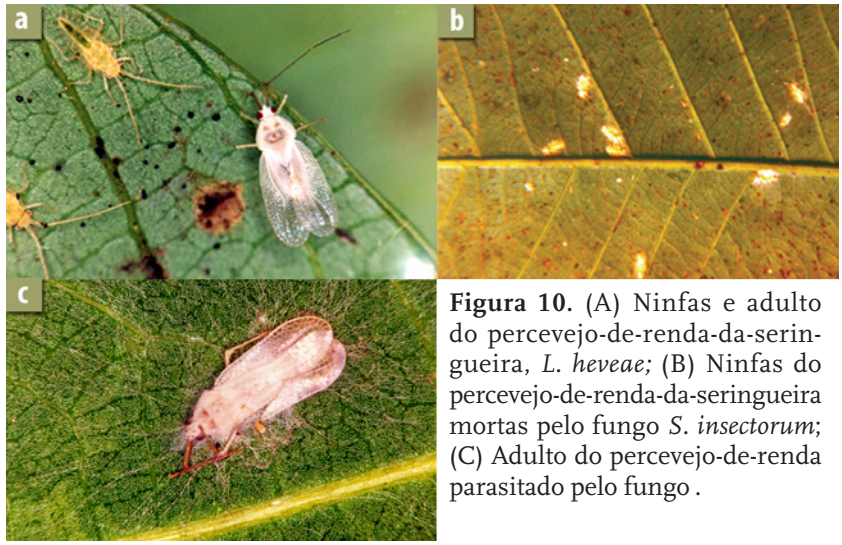


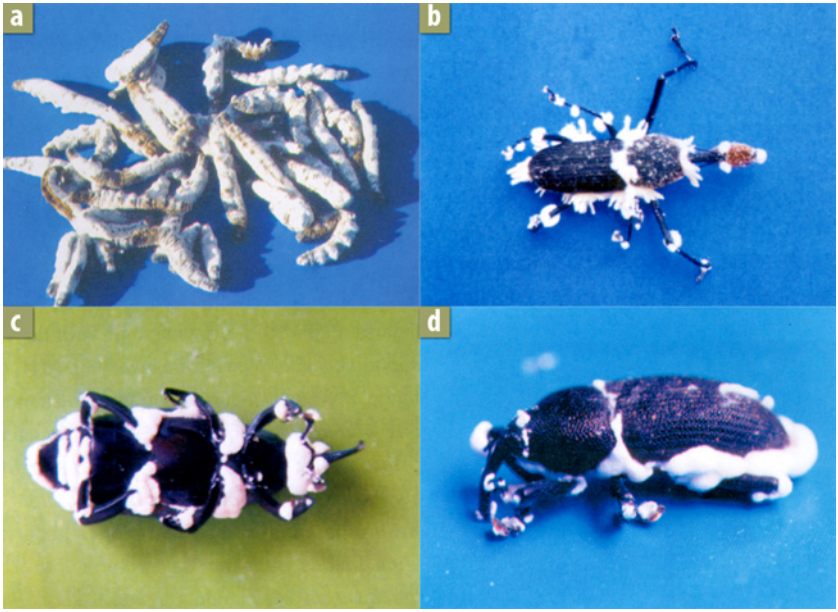
Figura 10. (A) Ninfas e adulto do percevejo-de-renda-da-seringueira, *L. heveae;* (B) Ninfas do percevejo-de-renda-da-seringueira mortas pelo fungo *S. insectorum*; (C) Adulto do percevejo-de-renda parasitado pelo fungo .

e) *Beauveria bassiana* no controle do moleque-da-bananeira, *Cosmopolites sordidus*, com iscas de pseudocaule pulverizadas com fungo, no Sudeste e Sul do Brasil (Figura 11).

Foto: Pesagro em Foco

Figura 11. Adultos do besouro moleque-da-bananeira, *C. sordidus*, mortos pelo fungo *B. bassiana* .

f) O fungo *B. bassiana* é utilizado no controle de algumas pragas do coqueiro (Figura 12) como *Rhinostomus barbirostris* (broca-do-estipe-do-coqueiro), *Rhynchophorus palmarum* (broca-olho-do-coqueiro), *Homalinotus coriaceus* (broca-do-pedúnculo-floral) e *Brassolis sophorae* (lagarta-das-folhas-do-coqueiro).



Fotos: (A) Fernanda B. Sarro; (B) Fernando L. D. Cintra; (C) Ricardo P. C. Araújo; (D) Joana M. S. Ferreira.

Figura 12. (A) Adulto do besouro *R. barbirostris*, morto pelo fungo *B. bassiana*. (B) Adulto do besouro *R. palmarum*, morto pelo fungo *B. bassiana*; (C) Adulto do besouro *H. coriaceus*, morto pelo fungo *B. bassiana*; (D) Lagartas de *B. sophorae* contaminadas pelo fungo *B. bassiana* .

g) *Nomuraea rileyi* controla a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*, naturalmente com grande eficiência, quando o clima está favorável, no Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (Figura 13).

Foto: Décio L. Gazzoni (1994)

Figura 13. Lagarta-da-soja, *A. gemmatalis*, morta pelo fungo *N. rileyi*.

Aplicação em campo

h) Via aérea: avião equipado com barra pulverizadora com volume de aplicação entre 20 L/ha e 30 L/ha com doses entre 1 e 5 x 10^{12} conídios viáveis/ha (Figura 14).

Foto: Roberto Alves

Figura 14. Avião agrícola equipado com barras pulverizadoras e bicos hidráulicos .

i) Via terrestre: pulverizadores costais manuais ou motorizados, trator equipado com atomisador ou barra pulverizadora com doses entre 1 e 5 x 10^{12} conídios viáveis/ha (Figura 15).

Fotos: (A) Máquinas Agrícolas Jacto; (B, C e D) Roberto Alves.

Figura 15. Tipos de pulverizadores. (A) Costal manual; (B) Costal motorizado; (C) Atomisador tratorizado; (D) Pulverizador de barras tratorizado .

Obs.: deve-se colocar espalhante adesivo a 0,1% do volume total de água para formulações tipo pó molhável.

Bactérias entomopatogênicas

Entre as bactérias, a espécie *Bacillus thuringiensis* se destaca como a mais utilizada para o controle de pragas, principalmente da Ordem Lepidoptera.

As diferentes variedades de *B. thuringiensis* produzem toxinas com as quais afetam o inseto durante o processo da doença. As principais toxinas são:

- delta endotoxina (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*)
- beta exotoxina (*B. thuringiensis* var. *israelensis*)

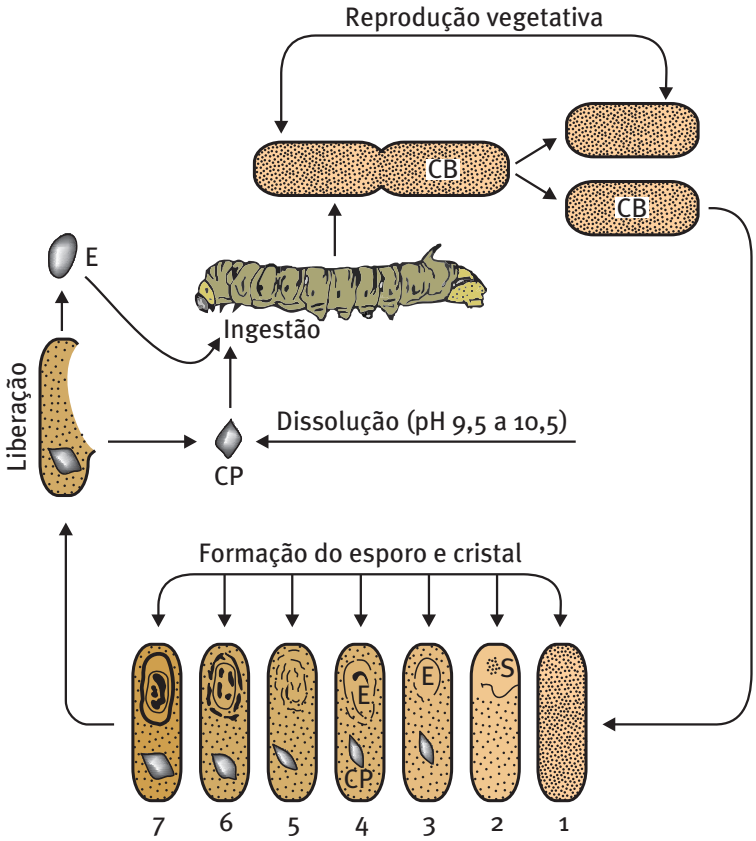


Figura 16. Ciclo evolutivo do *B. thuringiensis* em uma lagarta; CB, célula bacteriana; E, esporo; CP, cristal proteico.

Fonte: Alves, 1986.

Após a ingestão dos esporos da bactéria, esses esporos germinam e as formas vegetativas se multiplicam no intestino, passando posteriormente à cavidade geral do hospedeiro, onde se multiplicam outra

vez, produzindo uma septicemia e posteriormente causando a morte do mesmo.

Utilização de *Bacillus thuringiensis* no controle de pragas

a) *B. thuringiensis* var. *kurstaki* é utilizada no controle de lagartas desfolhadoras de grandes culturas e reflorestamentos.
b) *B. thuringiensis* var. *israelensis* para controle de larvas de pernilongos e borrachudos.

Existem vários produtos a base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* à venda no Brasil como: Agree, Bac-Control, Bactur WP, Dipel SC, Dipel WG, Dipel WP, Ecotech Pro, Thuricide e Xentari.

Na saúde pública, existem alguns biolarvicidas a base de *B. thuringiensis* var. *israelensis* para o controle de pernilongos e borrachudos como: Aquabac XT, Bactivec, Bt-horus SC, Teknar HPD, Vectobac AS, Vectobac CG e Vectobac WDG.

Existem também biolarvicidas que utilizam a bactéria *Bacillus sphaericus*, e têm-se no mercado brasileiro os produtos Grislesf, o Sphaerus SC e o Spherico SC e Vectolex CG.

No Brasil, o *B. thuringiensis* pode ser utilizado em várias culturas no controle de diversas pragas, conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Utilização do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em várias culturas para controle de diferentes insetos-praga.

Culturas	Insetos-praga
Soja	Lagarta-da-soja Lagarta-falsa-medideira
Algodão	Lagarta-das-maçãs Curuquerê
Gramíneas (pastagens, milho, cana, arroz)	Lagarta-dos-capinzais Lagarta-militar
Crucíferas (couve, couve-flor, repolho, brócolis)	Curuquerê-da-couve Lagarta-mede-palmo Traça-das-crucíferas
Tomate	Broca-grande Lagarta-mede-palmo
Fumo	Lagarta-verde
Mandioca	Mandarová
Café	Lagarta-magnífica
Eucaliptus	Lagarta-dos-eucaliptus

Continua...

Tabela 2. Continuação.

Culturas	Insetos-praga
Alfafa	Lagarta-da-alfafa Lagarta-militar Curuquerê-dos-capinzais
Citrus	Automeris
Maracujá	Lagarta-do-maracujá
Seringueira	Mandarová
Abacaxi	Broca-do-fruto
Amendoim	Lagarta-da-soja Lagarta-dos-capinzais
Coqueiros	Lagarta-das-palmeiras
Cucurbitáceas (abóbora, pepino, melão, melancia)	Broca-das-cucurbitáceas

Vírus entomopatogênicos

Existem estudos que demonstram a existência de mais de 700 viroses que atacam insetos e ácaros, porém só as mais promissoras são utilizadas no controle de pragas (Figura 17).

Estrutura de um vírus entomopatogênico

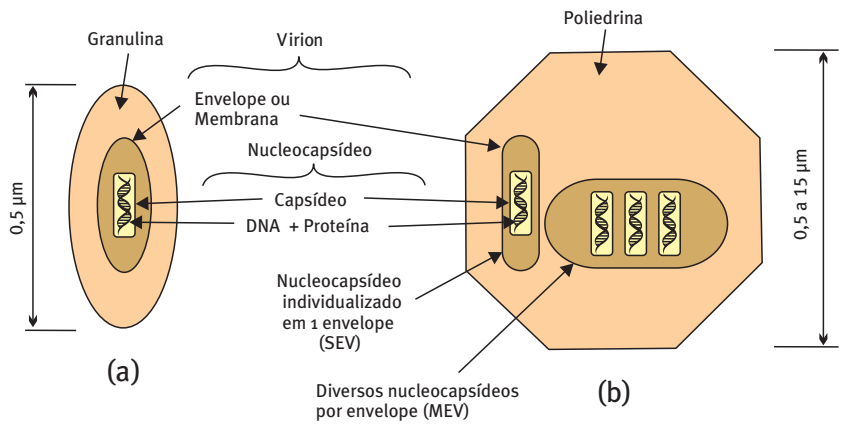


Figura 17. Corpos de inclusão de *Baculovirus*: (a) Cápsula de granulose; (b) Vírus da poliedrose nuclear.

Fonte: Alves (1986)

Modo de ação e disseminação

O vírus só atua sobre as lagartas quando é ingerido, isto é, via oral. Segundo Moscardi (1983), os poliedros localizados sobre as folhas de soja, ao serem ingeridos, atingem o intestino do inseto e ali são dissolvidos, propiciando a liberação das partículas de vírus, os virions (Figura 18). Estes penetram na membrana da parede do intestino e atingem a hemolinfa, multiplicando-se no núcleo das células de diferentes tecidos, inicialmente no tecido gorduroso e epiderme; depois na epiderme da traqueia e nos órgãos reprodutivos.

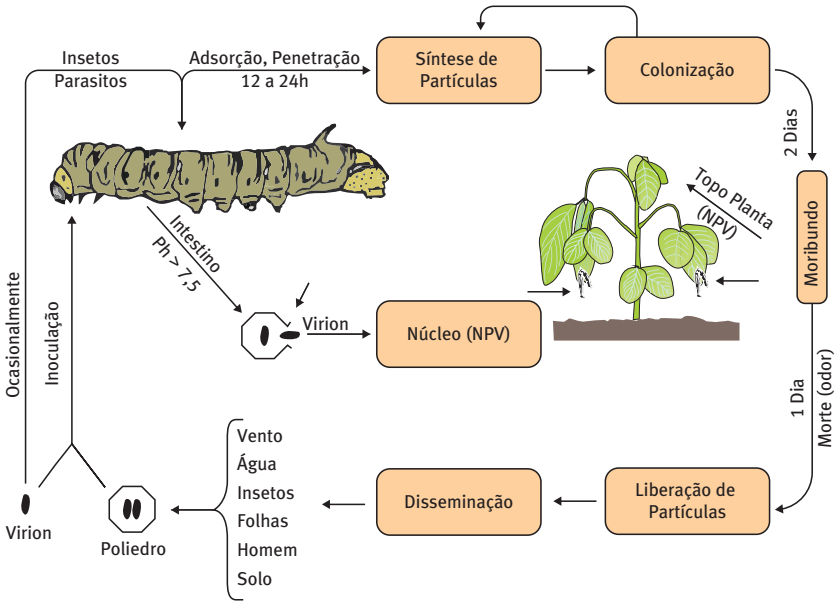


Figura 18. Ciclo das relações de *Baculovirus* com o inseto hospedeiro.

Fonte: Alves (1986).

O processo, desde a infecção até a morte da lagarta, dura em média sete dias.

Os sintomas são descoloração da parte ventral do corpo (3° e 4° dia) e depois em todo o corpo. Após o quarto dia, a lagarta infectada tem pouca mobilidade e praticamente cessa sua alimentação, indo para

a parte superior da planta, onde morre pendurada pelas patas abdominais.

A lagarta, nessa fase, possui uma coloração amarelo-esbranquiçada, não se rompendo com facilidade, mas posteriormente torna-se preta e se rompe facilmente.

Utilização de viroses no controle biológico de pragas

Baculovirus anticarsia no controle da lagarta-da-soja
Baculovirus spodoptera no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho
Baculovirus erinnys no controle de mandarová-da-mandioca

Atualmente existem vários produtos biológicos a base de *Baculovirus* no Brasil (Figura 19), como: Baculovirus AEE, Baculovirus Nitral, Coopervírus PM e Protege. A maioria das biofábricas está localizada no Paraná e Rio Grande do Sul.

Fotos: Flávio Moscardi

Figura 19. (A) Potes contendo dose de lagartas mortas por vírus para um hectare; (B) *B. anticarsia* formulado como pó molhável; (C) Lagarta-da-soja morta por *Baculovirus*.

Parasitoides

Microhimenópteros

Cotesia flavipes

O microhimenóptero *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) é utilizado no controle da broca-da-cana-de-açúcar, onde parasita na fase de lagarta de piralídeos e noctuídeos. A fêmea oviposita seus ovos no interior do corpo da lagarta, onde se desenvolverão as larvas e se empupam em forma de casulo na parte externa do corpo do hospedeiro, de onde sairão novos adultos. O seu ciclo dura, em média, 23 dias na temperatura de 25 °C. É utilizado em larga escala na região canavieira do Estado do São Paulo.

Trichogramma sp.

Trichogramma sp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae): é um parasita de ovos de lepidópteros que possui grande potencial para as condições de nosso país.

Segundo Parra *et al.* (1987), estão sendo utilizados em liberações inundativas na Rússia (10 milhões de hectares), China, Taiwan, México, EUA, Europa Ocidental, Índia, África e América do Sul (Colômbia e Peru).

No Brasil, já está se utilizando o *Trichogramma* em larga escala para o controle biológico de *Diatraea saccharalis*, *Alabama argillacea* e *Heliothis virescens*. O ciclo de vida do *Trichogramma* sp. pode ser visto na Figura 20.

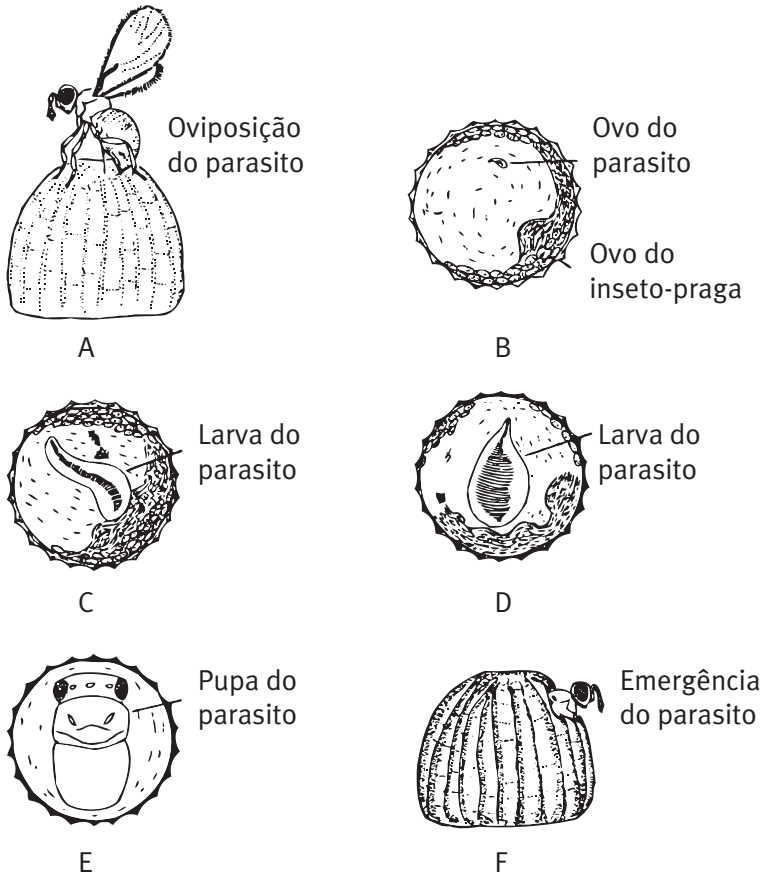
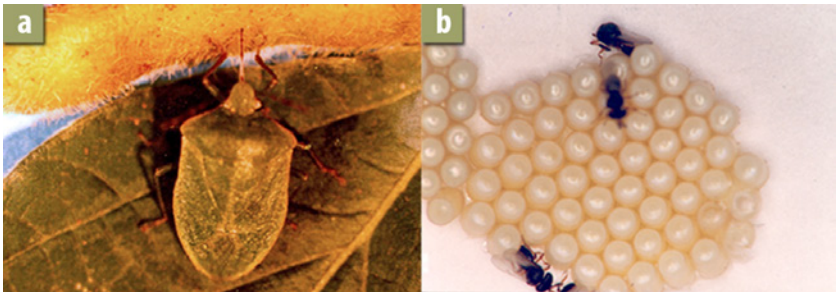


Figura 20. Ciclo de vida do *Trichogramma* sp.

Fonte: De Bach; Rosen (1991)

Trissolcus basalis (Hymenoptera: Scelionidae)

São parasitos de ovos de percevejos-da-soja, também com grande potencial para as condições do Brasil (Figura 21).



Fotos: (A) Bayer do Brasil; (B) Antonio H. Barbosa.

Figura 21. (A) Adulto do percevejo-verde-da-soja, *Nezara viridula*. (B) Adultos da vespinha *T. basalis* parasitando ovos de *N. viridula*.

Dípteros

Moscas – taquinídeas *Metagonistylum minense* (mosca-do-Amazonas) e *Paratheresia claripalpis*: são parasitos da broca-da-cana-de-açúcar. Os adultos são liberados no campo, onde procurarão ovipositar na broca-da-cana. As larvas se desenvolvem no interior do corpo do hospedeiro e empupam no orifício feito pela broca, de onde sairão os adultos.

Considerações finais

Com base nas informações contidas neste capítulo, observa-se que o controle biológico de insetos-praga já vem sendo utilizado no Brasil há vários anos em diferentes culturas agrícolas e na pecuária e que apresenta um potencial enorme para ser cada vez mais utilizado, pois novos resultados de pesquisa têm ajudado a aperfeiçoar técnicas de produção e liberação de predadores e parasitos e principalmente de patógenos, onde envolve novas técnicas de produção em larga escala, formulação, armazenamento e de aplicação no campo visando a um aumento da eficiência desses inimigos naturais contra diferentes pragas.

Apesar deste capítulo visar, apenas, dar uma visão geral e resumida da utilização dos principais inimigos naturais utilizados no controle biológico de insetos-praga no Brasil, espera-se que o leitor possa compreender um pouco mais sobre esse método e sobre os diferentes inimigos naturais, seus modos de ação e que seja mais um colabora-

dor na difusão de informações técnicas sobre o assunto, colaborando assim para o aumento do uso adequado do controle biológico de insetos-praga, o que evitará resíduos químicos nos alimentos, contaminação dos recursos naturais e haverá menos intoxicações dos trabalhadores rurais brasileiros.

Referências

ALVES, R. T. **Determinação das exigências térmicas e hídricas do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883**. 1986. 131 f. Tese (Mestrado) ESALQ/USP, Piracicaba.

ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P.; PRIOR, C.; LEATHER, S. R. Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. **Crop Protection**, v. 17, p. 675-679, 1998.

ALVES, R. T.; SILVA, E. A. F.; SOUSA, K. M.; OLIVEIRA, M. A. S.; PEREIRA, A. V.; PEREIRA, E. B. C.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ICUMA, I. M. **Controle biológico do percevejo-de-renda da seringueira com o uso de microinseticida formulado em óleo emulsionável**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2003. 22 p. (Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 113).

ALVES, S. B. Controle biológico de pragas de pastagens. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PRAGAS DAS PASTAGENS, 7., Piracicaba. **Anais**... Piracicaba, FEALQ, 1985. p. 169-208.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole Ltda, 1986. 407 p.

DE BACH, P.; ROSEN, D. **Biological control by natural enemies**. Cambridge University Press, 1991. 440 p.

GALLO, D.; O. NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba, FEALQ, 2002. 920 p.

MAGALHÃES, B. P.; LECOQ, M. **Bioinseticidas e gafanhotos-praga**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2007. 123 p.

MOSCARDI, F. **Utilização de *Baculovirus anticarsia* para o controle de lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis***. Londrina, PR: CNPS, 1983 (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 23). 21 p.

MOSCARDI, F.; CORSO, I. C. Efeito de diferentes doses de *Baculovirus anticarsia* sobre *Nomuraea rileyi*. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Londrina, PR. **Resultados de Pesquisa de Soja 1979/80**. Londrina, 1980. p. 156-8.

PARRA, J. R. P., ZUCCHI, R. A.; SILVEIRA NETO, S. A importância de *Trichogramma* no controle de pragas na agricultura. **Agrotécnica CIBA-GEIGY**, v. 1, p. 12-15, 1987.

TANADA, Y. Epizootiology of Infectious Diseases. In: STEINHAUS, E. A.(Ed.) Insect pathology: an advanced treatise. **Academic Press**, v. 2, p. 423-75, 1963.

VAN DRIESCH, R. G.; BELLOWS JUNIOR., T. S. **Biological control.** New York, Chapman & Hall, 1996. 539 p.

Literatura recomendada

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba, FEALQ, 1998. 1163 p.

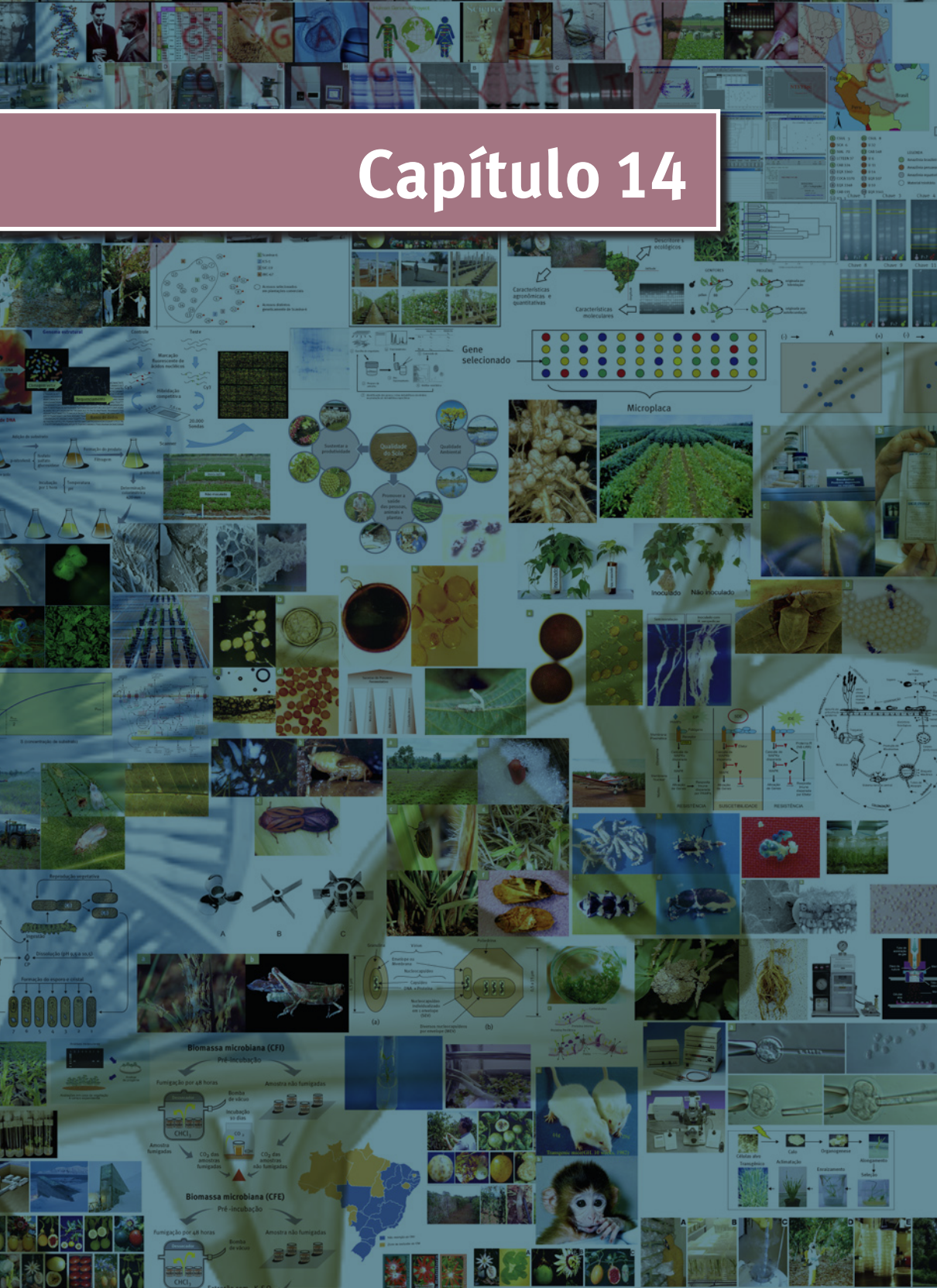
DE BACH, P.; ROSEN, D. **Biological control by natural enemies**. Cambridge University Press, 1991. 440 p.

GALLO, D.; O. NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola.** Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; MONNERAT, R. G. **Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. 352 p.

VAN DRIESCH, R. G.; BELLOWS JUNIOR, T. S. **Biological control.** New York, Chapman & Hall., 1996. 539 p.

Capítulo 14


Gene selecionado
Microplaca
Inoculado
Não inoculado
Biomassa microbiana (CFI)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas
Biomassa microbiana (CFE)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas

Cultura de tecidos vegetais: princípios e aplicações

Sebastião Pedro da Silva Neto
Solange Rocha Monteiro de Andrade

Introdução

O termo cultura de tecidos vegetais é utilizado para definir a cultura asséptica in vitro de células, tecidos, órgãos e seus componentes sob condições físicas e químicas definidas. A cultura de tecidos constitui uma importante ferramenta para estudos básicos, como a compreensão dos fatores responsáveis pelo crescimento, metabolismo, diferenciação e morfogênese das células vegetais, bem como para estudos aplicados, como micropropagação, produção de compostos secundários, transformação genética, manutenção de germoplasma in vitro e limpeza clonal (SMITH, 2000). O desenvolvimento da técnica tem uma longa história. Os esforços iniciais se concentraram na compreensão dos vários aspectos do crescimento, desenvolvimento e diferenciação vegetal, do papel dos reguladores de crescimento, dos tipos de nutrientes necessários, entre outros fatores. Tão logo os princípios e métodos básicos foram estabelecidos (primeiro quarto do século XX), verificou-se o valor prático para a agricultura e para a indústria da propagação de plantas, bem como na conservação de germoplasma (RAZDAN, 2003). Atualmente, a cultura de tecidos desempenha papel importante nos métodos moleculares utilizados em biotecnologia. A base fundamental da cultura de tecidos é a capacidade de células, tecidos ou órgãos se desenvolverem e regenerarem plantas completas, idênticas à planta-mãe. A disponibilidade de métodos adequados de cultura de tecidos para um crescente número de espécies vegetais permite ampliar o leque de aplicações da biotecnologia vegetal.

Princípios da cultura de tecidos

O termo "in vitro" é um termo latino que significa "dentro do vidro". Dessa forma, em condições de assepsia, dentro de recipientes de vidro, sob o efeito de fatores químicos (meio de cultura) e físicos (luz e temperatura), um ambiente artificial é criado, visando proporcionar condições adequadas para o processo de desenvolvimento de células, tecidos e órgãos de plantas, previamente extraídos de uma planta completa (matriz). O efeito dessas intervenções pode induzir à diferenciação e à multiplicação de órgãos a partir de meristemas ou à desdiferenciação de tecidos determinados e à indução de formação de pré-meristemas (GAHAN; GEORGE, 2008).

O cultivo in vitro baseia-se nos seguintes princípios: totipotência e competência celular. A totipotência se refere ao potencial das células vegetais de reproduzirem um organismo inteiro uma vez submetidas a estímulo apropriado (HARBERLANDT, 1902). No entanto, para as células vegetais reagirem a esse estímulo, precisam apresentar competência celular, que se refere à capacidade das células em reagir a sinais específicos de desenvolvimento, ou seja, expressar o potencial inerente à sua carga genética.

A cultura de tecidos é comumente usada para descrever todos os tipos de cultura in vitro de plantas. Didaticamente, George et al. (2008) a separa em duas categorias de acordo com a organização do crescimento in vitro: (a) cultivos com crescimento organizado e (b) cultivos com crescimento não organizado.

a) *Cultivos com crescimento organizado*:

- Cultura de meristemas: cultura de ápices caulinares muito pequenos, consistindo do domo meristemático apical com ou sem primórdios foliares, com tamanho entre 0,1 mm e 0,3 mm, dependendo da espécie. Originam eixos caulinares unipolares.
- Cultura de ápices caulinares ou gemas: inicia-se a partir de gemas ou brotos de tamanho maior que os meristemas, contendo vários primórdios foliares, que são conduzidos de forma a produzir múltiplas brotações ou multigemas.
- Cultura de segmentos nodais: inicia-se a partir de gemas laterais existentes nos nós da planta, cada um tendo anexo um pequeno

pedaço de tecido do ramo. Entrenós contendo uma ou várias gemas podem ser cultivados.
- Cultura de raízes isoladas: cultura de raízes desconectadas da parte aérea, resultando na produção de um sistema de raízes ramificadas.
- Cultura de embriões (resgate): embriões zigóticos são excisados e cultivados para dar origem a plântulas.

b) *Cultivos com crescimento não organizado:*

- Cultura de calos: indução do crescimento e manutenção de uma massa de células desorganizada, a partir do crescimento descoordenado de pequenos órgãos, pedaços de tecidos ou de células previamente cultivadas.
- Culturas em suspensão: cultura de populações de células individuais e pequenos grupos de células, dispersas em meio líquido sob agitação e aeração.
- Cultura de protoplastos: cultura de células vegetais, sem parede celular.
- Cultura de anteras e pólen: cultura de anteras completas contendo micrósporos imaturos, com o objetivo de formar embriões somáticos diretamente sobre o pólen, ou algumas vezes por organogênese passando pela fase de calo.
- Cultura de pólen: culturas iniciadas de grãos de pólen que foram removidos das anteras.

O processo de desenvolvimento de uma nova plântula pode ocorrer via organogênese ou embriogênese somática. Os fatores que influenciam na determinação da rota morfogenética são: o tipo de explante escolhido, estádio fisiológico da planta e o ambiente do meio de cultura (reguladores de crescimento, nutrientes, luz, etc). A organogênese é o processo de formação de uma nova plântula, a partir de um explante, já, na embriogênese somática, ocorre a formação de embriões a partir de células somáticas, sem a fecundação zigótica. Ambas as rotas podem ocorrer de forma direta ou indireta. O processo de organogênese/embriogênese direta ocorre quando as plântulas/embriões surgem a partir de meristemas pré-existentes nos tecidos

do explante, enquanto pela via indireta, ocorre primeiro a formação de calos, seguida da formação de meristemoides e finalmente plântulas/embriões (ANDRADE, 2002). O esquema simplificado da cultura de tecidos pode ser visto na Figura 1.

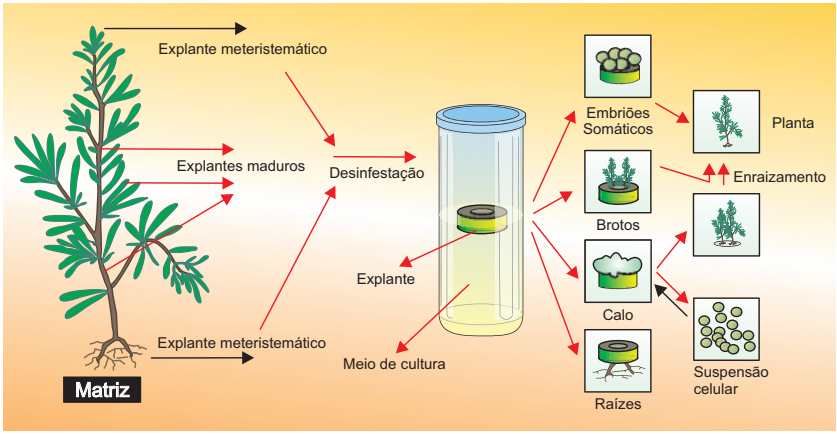


Figura 1. Etapas da cultura de tecidos .

Fonte: Kerbauy, 1997.

Aplicações da cultura de tecidos

Baseado na disponibilidade das várias técnicas in vitro já citadas, a partir de meados da década de 1960 houve um significativo crescimento das aplicações da cultura de tecidos em pesquisas nos campos da biologia, agricultura e engenharia florestal. As aplicações na agropecuária podem ser divididas em cinco áreas: (a) melhoramento genético; (b) limpeza clonal; (c) conservação de germoplasma; (d) propagação clonal; e (e) produtos do metabolismo secundário.

Melhoramento genético

O papel da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas tem sido reconhecido de forma crescente. Variações herdáveis podem ser observadas nas colônias de células ou em plantas regeneradas in vitro, as quais podem posteriormente se expressar por meio

de reprodução vegetativa ou sexual. Métodos in vitro têm sido usados de forma crescente em associação com os métodos tradicionais de melhoramento de plantas. As principais aplicações da cultura de tecidos são destacados abaixo.

Geração de variabilidade genética

Pesquisas pioneiras sobre cultura de tecidos mostraram que células cultivadas in vitro durante longos períodos podem apresentar variações genéticas inéditas. Muitos pesquisadores têm confirmado que um tecido é um mosaico de diferentes tipos de células. Algumas delas, quando cultivadas separadamente, produzem colônias organizadas, enquanto outras regeneram plantas frequentemente afetadas por variações morfológicas. Em virtude disso, as culturas in vitro são fontes diretas de variabilidade genética. Estudos citogenéticos de células cultivadas in vitro revelaram mitose anormal, o que é uma das causas da variabilidade. Números de cromossomos instáveis resultam em variabilidade na cultura de tecidos, possibilitando a seleção de variantes (RAZDAN, 2003).

A cultura de células tem desempenhado papel importante no melhoramento de plantas, uma vez que permite o isolamento de variantes somaclonais (FLICH, 1983). Embora a produção de variantes por cultura de tecidos seja conhecida desde longa data, foi somente nos anos 1970 que passou a ser utilizada no melhoramento de plantas. A variação somaclonal é dependente da variação natural que ocorre numa população de células, podendo ser pré-existente ou induzida pela cultura in vitro, e é usualmente observada nas plantas regeneradas (LARKIN; SCOWCROFT, 1981). A variação pode ser genética ou epigenética, sendo complexa quanto à origem (LARKIN et al., 1985; SCOWCROFT et al., 1987). As variações observadas nas plântulas regeneradas podem ter importância agrícola. É também possível produzir um amplo espectro de células mutantes em cultura (JACOBS et al., 1987), nas quais incluem-se células apresentando diferenças bioquímicas, algumas conferindo características úteis do ponto de vista econômico como resistência a herbicidas, antibióticos e estresses. A seleção in vitro, mediante a aplicação de um agente seletivo na presença do mutante, permite a seleção de plantas com sistemas de

desenvolvimento alterados, podendo manisfestar resistência a sais, produtos químicos e toxinas. Entretanto, somente em poucos casos, tem sido possível regenerar plantas com as características desejáveis, por exemplo, plantas de fumo resistentes a herbicidas e *Datura innoxia* resistente ao metil-triptofano (SMITH, 2000).

Polinização in vitro

A técnica da polinização controlada in vitro tem sido utilizada na produção de híbridos interespecíficos e intergenéricos, superando a autoincompatibilidade sexual (YEUNG et al., 1981; ZENKTELER, 1984). A técnica foi desenvolvida por Kanta e colaboradores (1962), e envolve o cultivo de óvulos e grãos de pólen no mesmo meio de cultura, facilitando assim a germinação do grão de pólen e a fertilização do óvulo sob condições in vitro. Por meio da aplicação dessa técnica, as barreiras de incompatibilidade sexual existentes, especialmente aquelas em que a reação ocorre no estilo ou no estigma, podem ser superadas. Esse método tem sido utilizado com sucesso na superação da autoincompatibilidade em *Petunia axillaris*. Similarmente, híbridos interespecíficos (*Melandrium album* x *M. rubrum*) e intergenéricos (*M. album* x *Silene schafta*) foram obtidos. A obtenção de embriões germináveis, desenvolvidos in vitro, a partir da fusão dos gametas masculino e feminino, tem sido a marca dessa técnica (RAZDAN, 2003).

Culturas de embriões, ovários e óvulos têm sido utilizadas para superar problemas como a inviabilidade do embrião, produção de monoploides, dormência de sementes e outros problemas relacionados (RAGHAVAN, 1980; YEUNG et al., 1981). De forma particular, o resgate de embriões tem desempenhado um papel muito importante na produção de híbridos interespecíficos e intergenéricos (COLLINS; GROSSER, 1984).

Indução de haploidia

A aplicação da cultura de tecidos na produção de haploides tem chamado a atenção pelo seu potencial de uso no melhoramento de plantas. Normalmente, as células somáticas de plantas superiores têm número de cromossomos diploide, enquanto células reprodutivas (gametas) são haploides. Guha e Maheswari (1966) cultivaram

anteras imaturas de *Datura innoxia* (*Solanaceae*) e foram capazes de gerar embrioides e plântulas. Essas plântulas tornaram-se haplóides. Aparentemente elas surgiram a partir de micrósporos dentro das anteras; isso abriu o caminho para a androgênese. Bourgin e Nitsch (1967) confirmaram a totipotência dos grãos de pólen conseguindo regenerar plantas haploides completas de tabaco, arroz e trigo. De acordo com Hu e Guo (1999), a obtenção de haploides por cultura de anteras foi relatada em 247 espécies, pertencentes a 34 famílias vegetais. Evidências experimentais indicam que as populações de pólen são praticamente dimórficas e que somente aqueles grãos de menor tamanho são capazes de formar haploides. Esses tipos de grãos de pólen ocorrem em baixa frequência e aparentemente são diferentes da maioria daqueles destinados a formação de gametas (GEORGE et al., 2008).

A indução de plantas haploides a partir de ovários e óvulos não polinizados (ginogênese) é outro avanço na cultura de tecidos. San e Gelebart (1986) relataram seu primeiro resultado em cultura in vitro de ovário isolado de *Hordeum vulgare* e, subsequentemente, muitos outros pesquisadores obtiveram plantas haploides ginogênicas de ovários e óvulos cultivados in vitro de tabaco, trigo, arroz, lírio, milho e outras plantas (THOMAS et al., 1999). Isso demonstra que não somente o micrósporo, mas também o megásporo ou gametófito feminino de angiospermas, podem ser cultivados in vitro até o desenvolvimento esporofítico, abrindo uma via alternativa para o melhoramento de plantas por meio de haploides (SMITH, 2000).

O valor dos haploides é grande nos programas de melhoramento, uma vez que eles podem ser utilizados para detectar mutações e para recuperar combinações genéticas únicas, tendo em vista que, por meio dos haploides duplicados, regeneram-se plantas completamente homozigotas, onde se visualiza a expressão de alelos recessivos, o que tem grande aplicação nos estudos genômicos. Além disso, a produção de duplos haploides tem permitido a produção de híbridos e sua integração em programas de melhoramento.

Hibridação somática

Isolamento, regeneração e fusão de protoplastos (células cuja parede celular foram digeridas) de plantas in vitro são tecnologias

com potencial para manipulação genética. A hibridação somática, uma hibridação assexual que utiliza protoplastos somáticos isolados (Figura 2), é uma ferramenta a mais no melhoramento de plantas (RAZDAN, 2003). O produto da fusão de dois protoplastos (heterocarion) pode ser cultivado para regenerar um híbrido somático com o genótipo desejado. Novas variações genéticas podem também ser introduzidas com consequências nas interações citoplasmáticas durante o processo de fusão nos protoplastos. A técnica de hibridação somática evoluiu tremendamente após se ter demonstrado a viabilidade de isolar um largo número de protoplastos por meio da incubação de uma pequena quantidade de tecido com a enzima celulase. Protoplastos isolados entram em processo de divisão celular e regeneram plantas (NAGATA; TAKEBE, 1971), comprovando a totipotência em protoplastos. Centenas de espécies de angiospermas podem ser regeneradas a partir de protoplastos (BINDING, 1986). A possibilidade de fundir protoplastos de plantas por métodos químicos (por exemplo, PEG) e físicos (por exemplo, eletrofusão) permite a produção de híbridos somáticos. Carlson et al. (1972) obtiveram o primeiro hibrido somático interespecifico por fusão de protoplastos isolados de *Nicotiana glauca* com *N. langsdorffii*. No Brasil, Matsumoto et al. (2001) conseguiram a hibridação interespecífica de bananeira (*Musa* spp.) por meio de hibridação somática (Figura 3). A fusão de protoplastos comprovou ser uma forma de se obter híbridos somáticos entre plantas sexualmente incompatíveis. O maior gargalo na técnica de fusão de protoplastos é a regeneração de plantas a partir das células hibridas (EVANS et al., 1984; SCHIEDER; KOHN, 1986).

A fusão de protoplastos tem sido utilizada para produzir combinações núcleo-citoplasma únicas. Como exemplo, pode-se citar a combinação de cloroplastos de *Brassica campestris* que codificam para resistência à atrazina (obtida de protoplastos) com protoplastos de *Brassica napus* possuindo citoplasma de *Raphanus sativus* (que confere macho esterilidade a partir de sua mitocôndria). As plantas selecionadas continham núcleo de *B. napus*, cloroplastos de *B. campestris* e mitocôndria de *R. sativus*; tinham as características desejadas em um fenótipo de *B. napus*; e são atualmente utilizadas para a produção de sementes híbridas (CHETRIT et al., 1985).

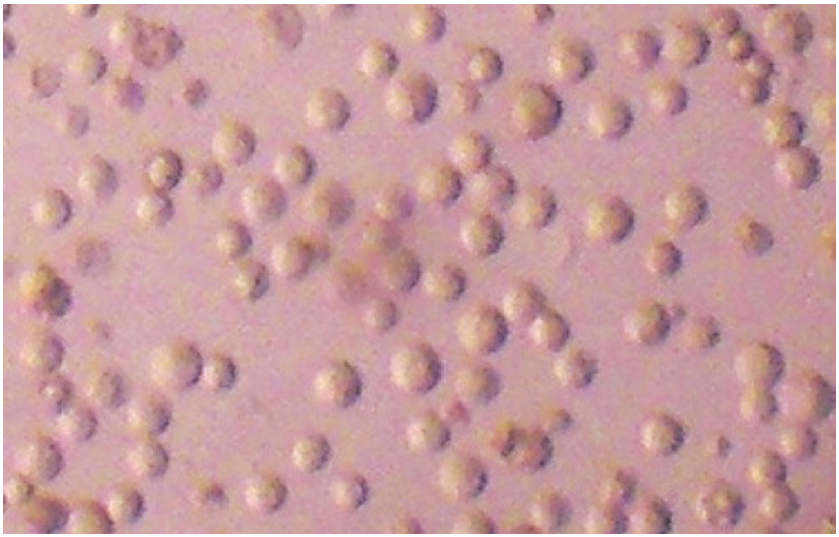


Foto: Kazumitsu Matsumoto

Figura 2. Protoplastos de bananeira .

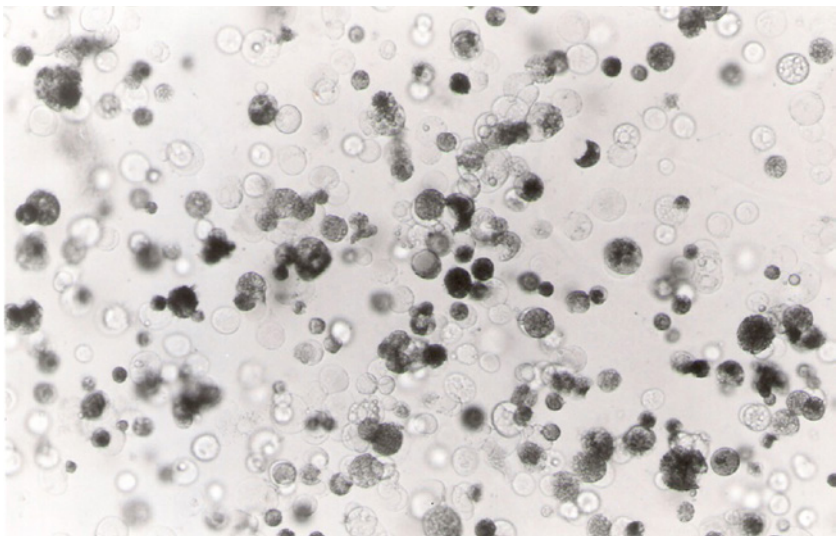


Foto: Kazumitsu Matsumoto

Figura 3. Fusão de protoplastos de bananeira.

Transformação genética

A atual importância da transformação genética de células por meio da introdução de DNA exógeno tem gerado enorme interesse pelas técnicas de regeneração oferecidas pela cultura de tecidos. A transformação genética consiste basicamente de quatro passos: inserção, integração, expressão e replicação do DNA exógeno dentro da célula hospedeira (TORRES et al., 1998).

O princípio da transformação é baseado no mecanismo de infecção por vírus. Desde 1976, muitos trabalhos têm relatado que vários genes eucarióticos introduzidos em bactéria são capazes de expressar sua atividade específica no hospedeiro e que isso possibilita obter uma transformação similar de células eucarióticas. Na natureza, *Agrobacterium tumefaciens* pode transferir informação genética para células de plantas na forma de um plasmídeo que promove formação tumoral (galha). Usando a tecnologia do DNA recombinante, foi possível introduzir o gene para resistência à kanamicina no DNA do plasmídeo do *A. tumefasciens*, e o plasmídeo modificado foi posteriormente incorporado em protoplastos de tabaco. Plantas do tabaco transformado expressaram resistência à kanamicina. Atualmente tem-se obtido êxito em modificar geneticamente plantas por meio da introdução de outros genes úteis, como resistência a insetos, ervas daninhas, herbicidas, doenças, ou para estudos do mecanismo da ação gênica (Figura 4).

Plantas geneticamente modificadas podem ser obtidas por métodos vetores-dependentes (transformação indireta) ou vetores-independentes (transformação direta). A transformação genética de plantas por transferência direta de DNA por meio de métodos vetores-independentes pode ser utilizada para transformar protoplastos e células bacterianas, e incluem eletroporação (POTRYKUS et al., 1985), fusão de liposoma (DESHAYES et al., 1985), microinjeção (CROSSWAY et al., 1986), bem como bombardeamento de micro partículas (biolística) (KLEIN et al., 1987). O método da biolística pode ser executado com células, tecidos e órgãos.

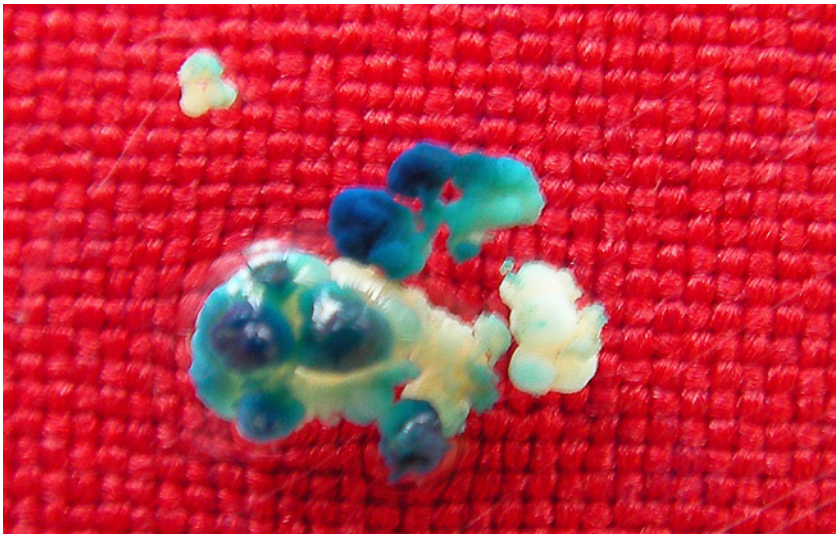


Foto: Kazumitsu Matsumoto

Figura 4. Calo geneticamente modificado .

Na transferência de genes mediada por vetor, os genes de interesse são inseridos em vetores de expressão binária em orientação 'senso' e 'antissenso' e essas construções gênicas inseridas na *Agrobacterium* para transformação de células, tecidos, culturas de órgãos, ou partes de plantas. O uso de *Agrobacterium* em transferências mediadas por vetores tem progredido muito rapidamente desde os primeiros relatos de transformação estável (DEBLOCK et al., 1984; HORSCH et al., 1984). Grande parte da atividade de pesquisa que utiliza essas ferramentas tem focalizado o desenvolvimento de importantes características agronômicas como o controle de insetos, plantas daninhas e doenças, resultando em plantas transgênicas com crescente uso na agricultura.

Limpeza clonal

A habilidade de eliminar vírus, bactérias e fungos de plantas por cultura de meristemas tem sido utilizada desde a década de 1960 (Figura 5). A técnica começou quando White (1934) observou que subcultivos de raízes infectadas com vírus frequentemente resultavam em culturas que eram isentas do vírus. Isso mostrou que, mesmo

em plantas infectadas, as células das extremidades meristemáticas ou são livres do vírus ou possuem uma concentração muito pequena do mesmo. Fato que se dá porque os tecidos meristemáticos não sendo vascularizados dificultam o acesso do vírus, que necessita dos vasos para se movimentar de forma sistêmica na planta. A técnica é particularmente importante para espécies de propagação vegetativa e quando o material vegetal está infectado por vírus (BHOJWANI; RAZDAN, 1983). A cultura de meristemas é frequentemente associada com termoterapia ou quimioterapia para a erradicação de vírus na limpeza clonal (RAZDAN, 2003).

Foto: Solange Rocha Monteiro de Andrade

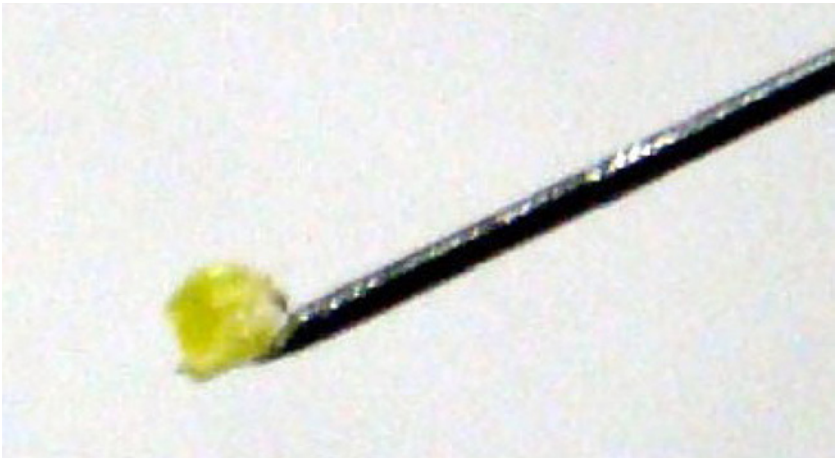


Figura 5. Meristema de maracujá na ponta de uma agulha .

Conservação de germoplasma

Tradicionalmente, os germoplasmas de plantas cultivadas têm sido mantidos na forma de materiais propagativos como sementes, tubérculos, raízes, bulbos, rizomas, gemas, estacas, etc. Canteiros, estufas e casas de vegetação são outras formas de se manter os germoplasmas ou bancos genéticos. Entretanto, algumas dificuldades podem ser encontradas na utilização dessas formas de conservação. Entre elas, está o fato de que importantes espécies produzem sementes recalcitrantes, com degeneração rápida do embrião (SMITH, 2000). Além disso, a manutenção de coleções a campo pode ser cara e ter como

desvantagem o fato de as plantas serem vulneráveis a insetos, patógenos e variações do clima. Milhares de espécies de plantas superiores são consideradas ameaçadas de extinção e necessitam ser mantidas em bancos de germoplasmas visando à preservação e à utilização de fontes de genes para futuros projetos de melhoramento genético. A habilidade de regenerar plantas completas a partir de células embrionárias e gaméticas, e ápices caulinares, tem levado ao seu uso na conservação de germoplasma (RAZDAN, 2003) (Figura 6).

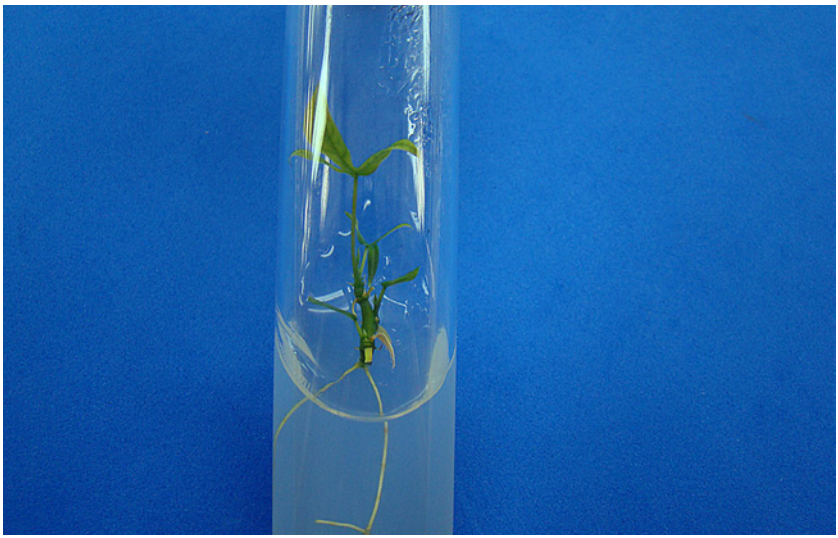


Foto: Sebastião Pedro da Silva Neto

Figura 6. Conservação in vitro de mandioca .

Três técnicas in vitro têm sido desenvolvidas a partir do uso de componentes que retardam o crescimento (por exemplo: hidrazida malica, B995, e ABA; Dodds, 1989), baixas temperaturas (1 °C a 9 °C; RAZDAN, 2003), e criopreservação (KARTHA, 1981). Nessa última técnica, suspensões celulares, ápices caulinares, embriões assexuais e plântulas jovens, após o tratamento com um "crioprotetor", são congelados e conservados em baixas temperaturas (-196 °C), em nitrogênio líquido (KARTHA, 1981; WITHERS, 1985). A cultura de tecidos é considerada como uma forma efetiva de conservação de germoplasma, desde que a manutenção do germoplasma in vitro seja viável economicamente em relação às demais alternativas.

Propagação clonal (micropropagação)

O uso da cultura de tecidos para propagação vegetativa de plantas é a mais largamente utilizada aplicação dessa tecnologia. Ademais, tem sido bem sucedida em todas as classes de plantas (GEORGE et al., 2008). Há três formas por meio das quais a micropropagação pode ser realizada. Essas são: (i) a intensificação da quebra de dormência de gemas axilares; (ii) produção de gemas adventícias diretamente ou indiretamente sobre calos; e (iii) embriogênese somática direta ou indireta sobre explantes (MURASHIGE, 1974, 1978). O princípio da técnica usada para propagação in vitro é baseada na multiproliferação e crescimento de gemas axilares, que normalmente permanecem dormentes na presença da gema terminal por causa da dominância apical. O uso exógeno de citocininas no meio de cultura libera as gemas da dominância apical tanto no ramo original, como nos subsequentes ramos laterais que são formados. Consequentemente numerosas brotações são formadas (Figura 7).

Foto: Sebastião Pedro da Silva Neto

Figura 7. Micropropagação de bananeira .

Após sucessivos subcultivos sob efeito do adequado balanço de reguladores de crescimento para multiplicação in vitro, os explantes

são enraizados e aclimatados, dando origem a plantas completas que são utilizadas como material propagativo de qualidade superior por serem livres de patógenos, serem geneticamente uniformes e fisiologimente mais ativas (Figura 8).

Foto: Sebastião Pedro da Silva Neto

Figura 8. Mudas micropropagadas de abacaxi em aclimatação .

Esse método de propagação é explorado intensivamente na horticultura e na indústria de mudas para a propagação clonal de muitas espécies dicotiledôneas, monocotiledôneas e gimnospermas. A micropropagação tem sido crescentemente utilizada na produção de material propagativo de espécies ornamentais (SANTOS, 2009), fruteiras, como a bananeira (MATSUMOTO; SILVA NETO, 2003), e florestais, como eucaliptus e pinus (ARENHART; ZAFFARI, 2008). A limitação de uma aplicação mais ampla da micropropagação reside no custo de produção, que ainda se apresenta alto para algumas espécies. Os itens que mais oneram os custos são a necessidade do uso intensivo de mão-de-obra para as repicagens e as perdas por contaminação, que podem ser muito altas dependendo da espécie e da infraestrutura laboratorial disponível.

Com vistas a superar problemas de custo e a falta de adaptação de algumas espécies, sobretudo as lenhosas, às metodologias de organo-

gênese anteriormente relatadas, a embriogênese somática tem sido utilizada em sistemas direcionados à propagação massal de plantas (NOMURA; KOMAMINE, 1985). A rápida multiplicação de embriões somáticos (Figura 9) é possível em bioreatores automatizados, diminuindo sensivelmente o custo de produção de plantas clonadas in vitro devido ao efeito escala e redução de custo em mão-de-obra (TEIXEIRA, 2002). Esses embriões somáticos podem, ainda, ser encapsulados individualmente para uso como "sementes sintéticas" (TEIXEIRA; TORRES, 1999). Diferentes tipos de bioreatores têm sido testados e usados com sucesso para aumentar a escala da embriogênese (GEORGE et al., 2008).

Foto: João Batista Teixeira

Figura 9. Embriões somáticos de café (*Coffea arábica*).

Por meio de gemas axilares, alcança-se o menor número de plântulas, mas elas são geralmente geneticamente mais padronizadas, enquanto a embriogênese somática tem o potencial para produzir quantidade infinitamente superior de plântulas, mas comparativamente é viável em menor número de espécies. Comercialmente, numerosas espécies são produzidas, principalmente via cultivo de gemas axilares (MURASHIGE, 1990; MATSUMOTO; SILVA NETO, 2003). Existem protocolos de larga escala para outras clas-

ses de plantas, incluindo culturas agrícolas e florestais, mas o custo de produção é o fator limitante para a ampliação do seu uso comercial (ZIMMERMAN, 1986). A evolução dos estudos de embriogênese somática associados e seu cultivo em bioreatores para um maior número de espécies tenderá a viabilizar comercialmente a micropropagação em larga escala (Figura 10).

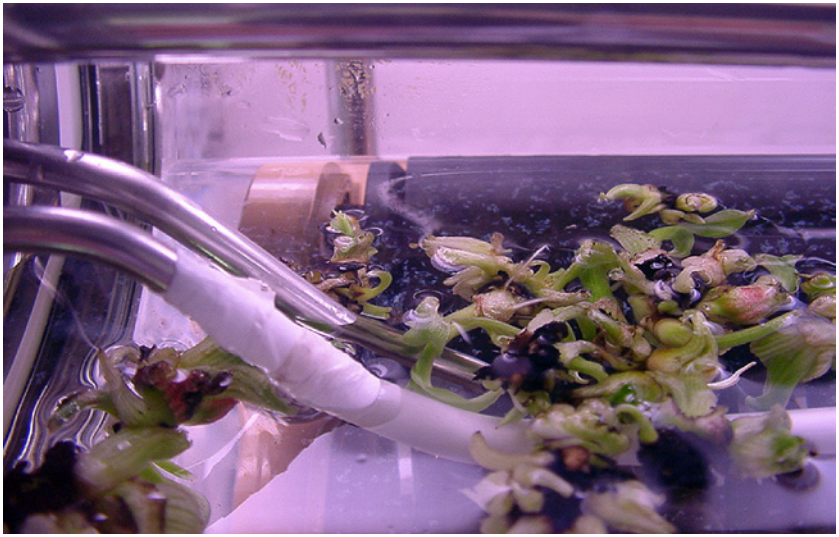


Foto: Sebastião Pedro da Silva Neto

Figura 10. Explantes de bananeira (*Musa* spp.) sendo cultivados em bioreator.

Produção de metabólitos secundários

As plantas superiores produzem uma grande quantidade de substâncias químicas, as quais podem ser de interesse farmacêutico e industrial. A primeira tentativa de cultivar células em larga escala para a produção de fármacos foi na década de 1950 na companhia Pfizer, com pouco sucesso inicialmente. Entretanto as pesquisas permitiram que a partir de 1978 a técnica fosse considerada viável, com base em pesquisas feitas na Alemanha e Japão, principalmente (ZENK, 1978). Em 1987 havia 30 sistemas de cultura estabelecidos que foram considerados melhores produtores de metabolitos secundários que as respectivas plantas (SMITH, 2000).

Muitos dos produtos químicos vegetais considerados importantes têm possibilidade de serem formados em cultura de células vegetais. Diferentes metodologias têm sido desenvolvidas para melhorar a produtividade de metabolitos secundários. Estes incluem a clonagem de células e seleção repetida de linhagens altamente produtivas a partir de populações de células heterogêneas (ZENK, 1978; DOUGALL, 1987) e pelo uso de Elisa e técnicas de radioimunoensaio (KEMP; MORGAN, 1987). Outra metodologia envolve a seleção de linhas mutantes de células superprodutoras do produto desejável (WIDHOLM, 1987). Da mesma forma que fatores abióticos, como radiação UV, exposição ao calor ou frio, e sais de metais pesados e estimulantes de natureza vegetal ou microbiológica têm sido utilizados para melhorar a produtividade de produtos secundários (EILERT, 1987; KURZ, 1988).

O fator principal para o sucesso da produção em escala comercial de substâncias biologicamente ativas é a capacidade de crescer células em larga escala. Isso tem sido conseguido com o uso de bioreatores sob agitação e vários tipos de bioreatores com sistemas de ar forçado (FOWLER, 1987). Para muitos sistemas, o processo de cultivo em dois estágios (ou duas fases) tem sido testado (BEIDERBECK; KNOOP, 1987; FOWLER, 1987). No primeiro estágio, rápido crescimento de células e acumulação de biomassa é enfatizado, enquanto, no segundo estágio, focaliza-se a síntese de produto com mínima divisão celular. Fujita e Tabata (1987) relataram a produção comercial em larga escala do metabólito secundário shikonina, que é um derivado da naftoquinona com ação similar à da insulina, por cultura de células. As pesquisas continuam sendo realizadas com novas espécies vegetais e outras tecnologias, e podem ser viabilizadas à medida que as pesquisas avancem.

Considerações finais

A ferramenta biotecnológica da cultura de tecidos vegetais tem papel relevante em várias linhas de pesquisa de natureza básica e aplicada, e seu uso tem sido largamente empregado na indústria da

propagação de plantas. Isso confere ao sistema produtivo de muitas espécies agrícolas e florestais vantagens qualitativas do ponto de vista genético e fitopatológico, resultando em maior produtividade com menor demanda por defensivos, refletindo nos custos e na sustentabilidade econômica e ambiental do sistema produtivo. As técnicas de melhoramento genético por transgenia têm na cultura de tecidos uma ferramenta básica, sem a qual não se alcança a regeneração da planta transgênica completa e funcional a partir da célula geneticamente modificada. Muitas outras metodologias importantes no campo da cultura de tecidos vegetais têm sido diariamente implementadas e tem trazido novas possibilidades para o desenvolvimento e aplicação da biotecnologia na agropecuária. A intensificação das pesquisas no campo da cultura de tecidos possibilitará a aplicação dos benefícios acima mencionados em um maior número de espécies vegetais, incluindo muitas das espécies nativas brasileiras, que até o momento foram pouco estudadas.

Referências

AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMillan. 1983. v.1. p. 82-123.

ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2002. 16 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 58).

ARENHART, R. A.; ZAFFARI, G. R. Otimização do protocolo de micropropagação por organogênese indireta de *Eucalyptus grandis*. **Revista de Ciências Agroveterinárias**,, v. 7, n. 1, 2008.

BEIDERBECK, R.; KNOOP, B. Two-phase culture. In: CONSTABEL, F.; VASIL, I. K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants.** New York: Academic Press 1987. v. 4. p. 255-266.

BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. **Plant tissue culture**: theory and practice - Developments in crop science. Amsterdam: Elsevier, 1983.

BINDING, H. Regeneration from protoplasts. In: VASIL, I. K. **Cell culture and somatic genetics of plants.** New York: Academic Press, 1986. v.1. p. 259-274.

BOURGIN, J. P.; NITCH, J. P. Obtention de n*icotiana* haploides a partir de'étamines cultivées *in vitro*. Annales de Physialagie Végétale, v. 9. p. 377-382, 1967.

CARLSON, P. S.; SMITH, H. H.; DEARING, R. D. Parasexual interspecific plant hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v. 69. p. 2292-2294, 1972.

CHETRIT, P.; MATHIEU, C.; VEDEL, E.; PELLETIER, G.; PRIMARD, C.; PELLETIER, G. Mitochondrial DNA polymorphism induced by protoplast fusion in *Cruciferae*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 69, p. 361-366, 1985.

COLLINS, G. B.; GROSSER, J. W. Culture of embryos. In: VASIL, I. K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants.** New York: Academic Press, 1984. v. 1, p. 241-257.

CONSTABEL, E.; VASIL, I. K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. New York: Academic Press. 1988. v. 5.

CROSSWAY, A.; OAKES, J. V.; IRVINE, J. M.; WARD, B.; KNAUF, V. C.; SHOEMAKER, C. R. Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. **Molecular and General Genetics** n. , 202, p. 179-185. 1986.

D' AMATO, E. Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants. In: THORPE, A. **Frontiers of plant tissue culture.** Univ. of Calgary: International Association of Plant Tissue Culture. 1978. p. 287-295.

DAUGALL, D. K. Primary metabolism and its regulation. In: GREEN, E.; SOMERS, D. A.; HACKETT, W. P.; BIESBOER, D. D. **Plant tissue and cell culture.** New York: A R Liss, 1987. p. 97-117.

DAUGALL, D. K. Primary metabolism and its regulation. In: GRENN, E.; SOMERS, D. A.; HACKET, W. P.; BIESBOER, D. D. (Ed.). **Plant tissue and cell culture**. New York: A R Liss, 1987. p. 97-117.

DEBLOCK, M.; HERRERA-ESTRELLA, L.; VAN MONTAGUE, M.; SCHELL, J.; ZAMBRYSKI, P. Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. **EMBO Journal**, v. 3, p. 1681-1689. 1984.

DESHAYES, A.; HERRERA-ESTRELLA, L.; CABOCHE, M. Líposomemediated transfarmation of tobacco mesophyll protoplasts by an *Escherichia coli* plasmid. EMBO Journal, *v.* 4, p. 2731-2739. 1985

DODDS, J. Tissue culture for germplasm management and distribution. In: COHEN, J. I. **Strengthening collaboration in biotechnology**: International agricultural research and the private sector. Washington, D.c.: Bureau of Science and Technology, AID. 1989. p. 109-128.

EILERT, U. Elicitation: methodology and aspects of application. In: CONSTABEL, F.; VASIL, I. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. New York: Academic Press. 1987. p. 153-196. v. 4.

EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; BRAVO, J. E. **Cell culture** methods for crop improvement. In: SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y., Handbook of plant cell culture. New York: Macmillan. 1984 v. 2. p. 47-68.

FLICH, C. E. Isolation of mutants from cell culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture.** New York: Macmillan. p. 393-444. 1983. v. 1.

FOWLER, M. W. Process systems and approaches for large scale plant cell culture. In: GREEN, C. E.; SOMERS, D. A.; HACKETT, W. P.; BIESBOER, D. D. (Ed.). **Plant tissue and cell culture**. New York: A R. Liss. 1987. p. 459-471.

GAHAN, P. B.; GEORGE, E. F. Adventitious regeneration. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. -J. **Plant propagation by tissue culture**. Dordrech, The Netherlands: Springer , 2008. p. 355-402. v. 1.

GEORGE, E. F. Plant tissue culture procedure: background. In: GEORGE, E. V.; HALL, M. A.; DE KLERK, G -J. **Plant propagation by tissue culture**. Springer, Dordrech, The Netherlands. 2008. p. 1-28. v. 1.

GUHA, S.; MAHESWARI, S. C. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of datura in vitro. **Nature,** v. 212, p. 97-98, 1996.

HABERLANDT, G. Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien., Math.-Naturwiss. **K. L. Abt**, v. 1, 111. p. 69-92, 1902.

HU, H.; GUO, X. In vitro induced haploids in plant genetics and breeding. In: SOH, W. Y.; BHOJWANI, S. S, (Ed.). **Morphogenesis in plant tissue cultures**. Dordrecht: Kluwer, 1999 p. 329-361.

JACOBS, M.; NEGRUITIU, L.; DIRKS, R.; CAMMAERTS, D. Selection programmes for isolation and analysis of mutants in plant cell cultures. In: GREE, C. E.; SOMERS, D. A. HACKETT, W. P.; BIESBOER, D. D. Biesboer (Ed.), **Plant tissue and cell culture.** New York: A R Liss. 1987. p. 243-264.

KANTA, K.; RANGASWAMY, N. S.; MAHESHWARI, P. Test-tube fertilization in flowering plants. **Nature,** 194. 1962. p. 1214-1217.

KARTHA, K. K. Meristem culture and cryopreservation methods and applications. In: THORPE, T. A. (Ed.). **Plant tissue culture**: methods and applications in agriculture. New York: Academic Press. 1981. p. 181-211.

KEMP, H. A.; MORGAN, M. R A. Use of immunoassays in the detection of pIant cell products. In: CONSTABEL, F.; VASIL, K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. New York: Academic Press. 1987. p. 287-302. v. 4.

KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas *in vitro*: uma realidade. **Biotecnologia. Ciência e Desenvolvimento**, v. 1. 1997. p. 30-33.

KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; WU, R.; SANFORD, J. C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature,** 327. 1987. p. 70-73.

KURZ, W, G. W. Semicontinuous metabolite production through repeated elicitation of plant cell cultures: A novel process. In: MABRY, T. J. (Ed.). **Plant biotechnology**. Austin, TX: IC2 Institute. 1988. p. 93-103.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation-a novel source of variability from cell culture for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 60. p. 197-214. 1981.

LARKIN, P. J.; BRETTELL, R. L S.; RYAN, S. A.; DAVIES, P. A.; PALLOTTA, M. A.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation: Impact on plant biology and breeding strategies. In: DAY, P.; ZAITLIN, M.; HOLLAENDER, A. (Ed.). **Biotechnology in plant science**. New York: Academic Press. p. 83-100. 1987.

MATSUMOTO, K. ; LIMA, F. A. ; MORAIS, L. S. ; SILVA NETO, S. P. ; SOUZA, A. S. Na casa de vegetação e em campo: estudo preliminar dos híbridos somaticos de bananeria obtidos da fusao de protoplastos, em respeito ao comportamento. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA, 4., 2001, Goiânia, GO. **Anais**... Goiânia, GO : REDBIOA/FAO, 2001.

MATSUMOTO, K.; SILVA NETO, S. P. Micropropagation of bananas. In: JAIN, S. M.; Ishii, K. (Org.). Micropropagation of woody trees and fruits. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003, p. 353-380.

MURASHIGE, T. Plant propagation by tissue culture: practice with unrealized potentiaI. In: AMMIRATO, P. V.; EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; BAJAJ, Y. P. S. **Handbook of plant cell culture.** New York: McGraw-HilI. 1990. v. 5, p. 3-9.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 25, p. 135-166, 1974.

MURASHIGE, T. The impact of plant tissue culture on agriculture. In: THORPE, T. A. **Frontiers of plant tissue culture 1978.** Calgary: International Association of Plant Tissue Culture. 1978. p. 15-26, 518-524.

NAGATA, T.; TAKEBE, I. Planting of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. **Planta**, v. 99, 1971. p. 12-20.

NOMURA, K.; KOMAMINE, A. Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. **Plant Physiology**, *v.* 79, p. 988-991. 1985.

NOMURA, K.; KOMAMINE, A. Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. **In vitro embryogenesis in plants Oordrecht**. The Netherlands: Kluwer. 1995. p. 249-265.

POTRYKUS, L.; SHILLITO, R.O.; SAUL, M.; PASZKOWSKI, J. Direct gene transfer: State of the art and future potential. **Plant Molecular Biology Report**, v. 3, p. 117-128, 1985.

RAGHAVAN, V. Embryo culture. **International Review of Cytology**, Supplement,11B, p. 209-240. 1980.

RANCH, J. R.; RICH, S.; BROTHERTON, J.E.; WIDHOM, J. Expression of 5-methyltryptophan resistance in plants regenerated from resistant cell lines of *Datura innoxia*. **Plant Physiology**, v. 71, p. 136-140, 1983.

RAZDAN, M. K. **Introduction to plant tissue culture**. Science Publishers, Inc. Enfield, NH, USA, 2003. 375 p.

SAN, L. H.; GELEBART, P. Production of gynogenetichaploids. In: VASIL, I. K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants.** New York: Academic Press. 1986. p. 305-322. v. 3.

SANTOS, D. S. **Micropropagação da bromelia ornamental acanthostachys strobilacea (Schultz F.) klotzsch e a influencia do etileno**. 2009. 121 f. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. Instituto de Botânica.

SCHELL, J. S. Progress in plant sciences is our best hope to achieve an economically rewarding, sustainable and environmentally stable agriculture. **Plant Tissue Culture Biotechnology**, v. 1,p. 10-12, 1995.

SCHIEDER, O.; KOHN, H. Protoplast fusion and generation of somatic hybrids. In: VASIL, I. K., **Cell culture and somatic cell genetics of plants.** New York: Academic Press. 1986, p. 569-588. v. 3.

SCOWCROFT, W. R.; BRETTELL, R. I. S.; RYAN, S. A.; DAVIES, P. A.; PALLOTTA, M. A. Somaclonal variation and genomic flux. In: GREEN, C. E.; SOMERS, D. A.; HACKETT, W. P.; BIESBOER, D. D. **Plant tissue and cell culture.** New York: A. R. Liss. 1987. p. 275-286.

SILVA NETO, S. P. Propagação por biotecnologia. In: RUGGIERO, C.(Org.). **Bananicultura.** Jaboticabal SP: FUNEP, 2001, p. 128-149.

SKOOG, E.; MILLER, C. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. **Symposium of the Society of Experimental Biology**, v. 11, p. 118-131, 1957.

SMITH, R. H. **Plant tissue culture**: techniques and experiments. San Diego, California: Academic Press, 2000. 231 p.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 4, n. 24, p. 36-41, 2002.

TEIXEIRA, J. B.; TORRES, A. C. Embriogênese Somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Org.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1999, p. 568-568. v. 2.

THOMAS, D.; BHATNAGAR, A. K.; RAZDAN, M. K.; BHOJWANI, S. S. A reproducible protocol for the production of gynogenic haploids of mulberry, Morus Alba L. **Euphytica**, v. 110, p.169-173, 1999.

THORPE, T. A. *In vitro* somatic embryogenesis. **ISI Atlas of Science: animal and plant science**, p. 81-88, 1988.

THORPE, T. A. **The current status of plant tissue culture**. In: BHOJWANI, S. S., **Plant tissue culture**: applications and limitations. Amsterdam: Elsevier, 1990. p. 1-33.

WHITE, P. R. Multiplication of the viruses of tobacco and Aucuba mosaics in growing excised tomato root tips. **Phytopathology,** v. 24, p. 1003-1011, 1934.

WITHERS, L. A. Cryopreservation of cultured cells and meristems. In: VASIL, I. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants.** New York: Academie Press, 1985. p. 253-316.

WIDHOLM, J. M. Selection of mutants which accumulate desirable secondary products. In: CONSTABEL, F.; VASIL, I. K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants.** New York: Academic Press. 1987. p. 125-137. v. 4.

WINK, M. Physiology of the accumulation of secondary metabolites with special reference to alkaloids. In: CONSTABEL, F.; VASIL, I.K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants.** New York: Academic Press. 1987. v. 4, p. 17-42.

WITHERS, L. A. Cryopreservation of cultured cells and meristems. In: VASIL, I. K., **Cell culture and somatic cell genetics of plants.** New York: Academie Press, 1985, p. 253-316. v. 2.

YEUNG, E. C.; THORPE, T. A.; JENSEN, C. J. In vitro fertilization and embryo culture. In: THORPE, T. A. **Plant tissue culture: methods and applications in agricuIture.** New York: Academic Press. 1981. p. 253-271.

ZENK, M. H. The impact of plant cell culture on industry. In: THORPE, T. **A. Frontiers of plant tissue culture.** Univ. of Calgary: International Association of Plant Tissue Culture, 1978. p. 1-13.

ZENKTELER, M. In vitro pollination and fertilization. In: VASIL, I. K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants.** New York: Academic Press. 1984. p. 269- 275. v. 1.

ZIMMERMAN, R. H. **Regeneration in woody ornamentals and fruit trees**. In: VASIL, I. K., Cell culture and somatic cell genetics of plants. New York: Academic Press. 1986. p. 243-258. v. 3.

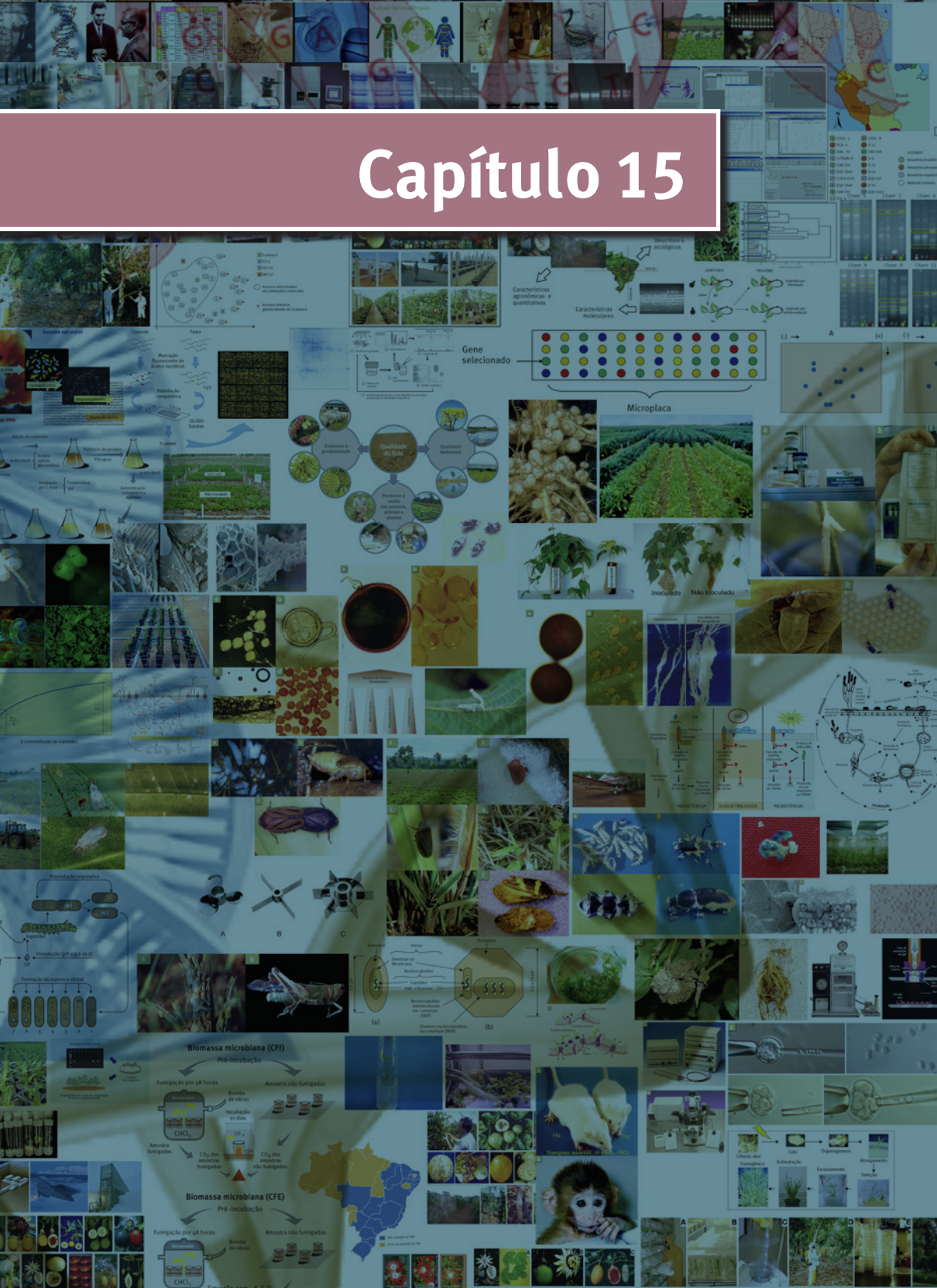
Bibliografia complementar

ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002. 16 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 58).

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa SPI: Embrapa CNPH, 1998. 864 p. 2 v.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. -J. **Plant propagation by tissue culture**. Dordrech, The Netherlands: Springer, 2008. 501 p.

Capítulo 15


Gene selecionado
Microplaca
Inoculado
Não inoculado
Biomassa microbiana (CFI)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas
Biomassa microbiana (CFE)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas

Engenharia genética: princípios científicos e aplicações

Solange Rocha Monteiro de Andrade
Fábio Gelape Faleiro

Introdução

O melhoramento genético iniciou entre 8 e 10 mil anos atrás, basicamente com a mudança de comportamento do homem, que deixou de ser nômade e se fixou em locais mais protegidos e com maior facilidade de coleta de alimentos. Esse comportamento gerou a necessidade de plantar espécies vegetais a partir da identificação e seleção de indivíduos mais saborosos, saudáveis, produtivos, resistentes e úteis. Durante esse processo, domesticamos grande parte das espécies, selecionando empiricamente os indivíduos que apresentavam características agronômicas reproduzíveis, maior uniformidade e produtividade (ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, 1993). Entretanto, no início do século XX, após a redescoberta das leis de Mendel, do desenvolvimento dos estudos básicos da hereditariedade e do uso de estatística para seleção e cruzamento de indivíduos, esses estudos passaram a ser realizados com base científica, aumentando-se a eficiência do melhoramento genético (ANDRADE; FALEIRO, 2009; ARAGÃO, 2009).

O melhoramento genético vegetal visa à obtenção de plantas mais produtivas, adaptadas a diferentes agroecossistemas, resistentes a doenças e pragas e com maior qualidade nutricional. O grande desafio atual é produzir alimentos em quantidade e qualidade e ao mesmo tempo minimizar o impacto ambiental e reduzir o uso de defensivos agrícolas. Grandes avanços foram obtidos pelo melhoramento genético no sentido de aumentar a produtividade das culturas e consequentemente diminuir o preço dos alimentos.

Esses resultados de produtividade foram obtidos devido à pesquisa agrícola, nas áreas de melhoramento genético vegetal e também melhoramento ambiental com o desenvolvimento de técnicas de manejo das culturas. No entanto, apesar dos grandes avanços

obtidos, o melhoramento convencional apresenta algumas limitações, como, por exemplo, a ligação gênica entre genes de interesse e genes indesejáveis e a incompatibilidade interespecífica. Para eliminar essas limitações, a engenharia genética surgiu como uma ferramenta extremamente útil, pois permite a identificação de genes de interesse, manipulação desses genes, a construção e introdução de um único gene de interesse diretamente em cultivares elite e a seleção das plantas que possuem esse gene. O gene a ser introduzido pode ser oriundo da mesma espécie ou de outras espécies, permitindo assim a quebra das barreiras impostas pela incompatibilidade sexual entre as diferentes espécies, além de eliminar o efeito das ligações gênicas indesejadas (ANDRADE, 2003).

Neste capítulo, são apresentados os princípios científicos da engenharia genética como aspectos conceituais e históricos, enfocando a transformação genética e suas diferentes etapas. Aspectos tecnológicos e aplicados da engenharia genética envolvendo a obtenção de organismos geneticamente modificados também são discutidos e exemplificados neste capítulo.

Conceito de engenharia genética

Para entender melhor o assunto discutido neste capítulo, é preciso diferenciar a engenharia genética da biotecnologia. É muito comum tratar biotecnologia como sinônimo de engenharia genética. Os conceitos relatados abaixo ajudam a entender que a engenharia genética é um conjunto de técnicas ligado à biotecnologia.

1) *Engenharia genética* refere-se ao conjunto de técnicas de biologia e genética molecular que resulta na construção de moléculas de DNA quiméricas ou recombinantes.
2) O *DNA recombinante* é o resultado da ligação, em laboratório, de fragmentos de DNA oriundos de diferentes vetores, células, organismos ou espécies.
3) *Transformação genética* é a introdução e integração de DNA em uma célula hospedeira; processo usual em laboratórios após o desenvolvimento da engenharia genética.
4) *Biotecnologia* é um conjunto de técnicas que gera produtos e processos de origem biológica sendo a engenharia genética

um exemplo dessas técnicas (Conselho de Informações sobre Biotecnologia, 2009). Existe também o conceito de biotecnologia moderna, a qual está mais relacionada à engenharia genética (confira Cap. 1, desta obra).

A história da engenharia genética

A engenharia genética surgiu em 1972 com a associação de Stanley Cohen da Universidade de Stanford e Hebert Boyer da Universidade da Califórnia. Cohen e colaboradores (1972) haviam obtido a transferência e clonagem de plasmídios contendo genes de resistência múltipla a antibióticos para a bactéria *Escherichia coli*. Boyer havia descoberto enzimas de restrição que cortavam DNA em regiões específicas produzindo "finais coesivos" que permitiam a ligação com outras sequências de DNA. Jackson e colaboradores (1972) criaram uma molécula híbrida de DNA contendo o genoma completo do *Vírus Simian 40* e um segmento de DNA responsável pelo metabolismo da galactose em *Escherichia coli* C600 (ANDRADE; FALEIRO, 2009; ARAGÃO, 2009). Esse trabalho foi o pioneiro da tecnologia do DNA recombinante, surgindo como importante ferramenta para analisar a estrutura e função de genes de mamíferos, sendo a base para o recebimento do prêmio Nobel em Química de 1980 (BERG, 2004), juntamente com Walter Gilbert (EUA) e Frederick Sanger (Inglaterra) (Figura 1).

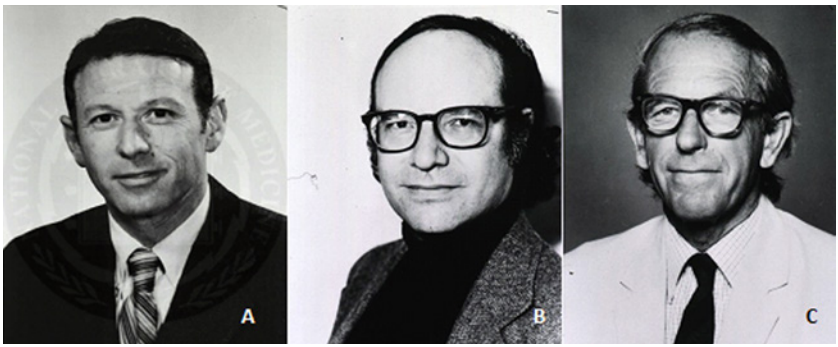


Figura 1. Ganhadores do Prêmio Nobel de Química em 1980: (A) Paul Berg; (B) Walter Gilbert; (C) Frederick Sanger.

Fonte: Wikipedia, 2009.

Com base nesses trabalhos pioneiros, foram desenvolvidos e otimizados protocolos para extração, restrição, ligação, clonagem e recombinação de fragmentos de DNA. Essa "engenharia genética" resultou no desenvolvimento de uma importante ferramenta científica e tecnologia: a transformação genética. Por meio da transformação genética, está sendo possível a obtenção dos chamados organismos geneticamente modificados ou organismos transgênicos. O primeiro organismo transgênico foi a bactéria *Escherichia coli* contendo sequência do anfíbio *Xenopus laevis* e o primeiro organismo comercial geneticamente modificado foi uma bactéria expressando gene da insulina humana (ARAGÃO, 2009).

Transformação genética

A transformação genética é a introdução controlada de ácidos nucleicos utilizando ferramentas de engenharia genética. Um dos objetivos da transformação genética é a obtenção dos organismos geneticamente modificados. Para efeito didático, podemos dividir a transformação genética em cinco etapas:

1) Identificação, isolamento e caracterização do gene de interesse.
2) Construção de um cassete de expressão e clonagem.
3) Transformação propriamente dita.
4) Regeneração e seleção das células transformadas.
5) Testes dos organismos transformados.

Na Figura 2, ilustram-se as principais etapas envolvidas na obtenção de organismos geneticamente modificados. Essas etapas são discutidas a seguir.

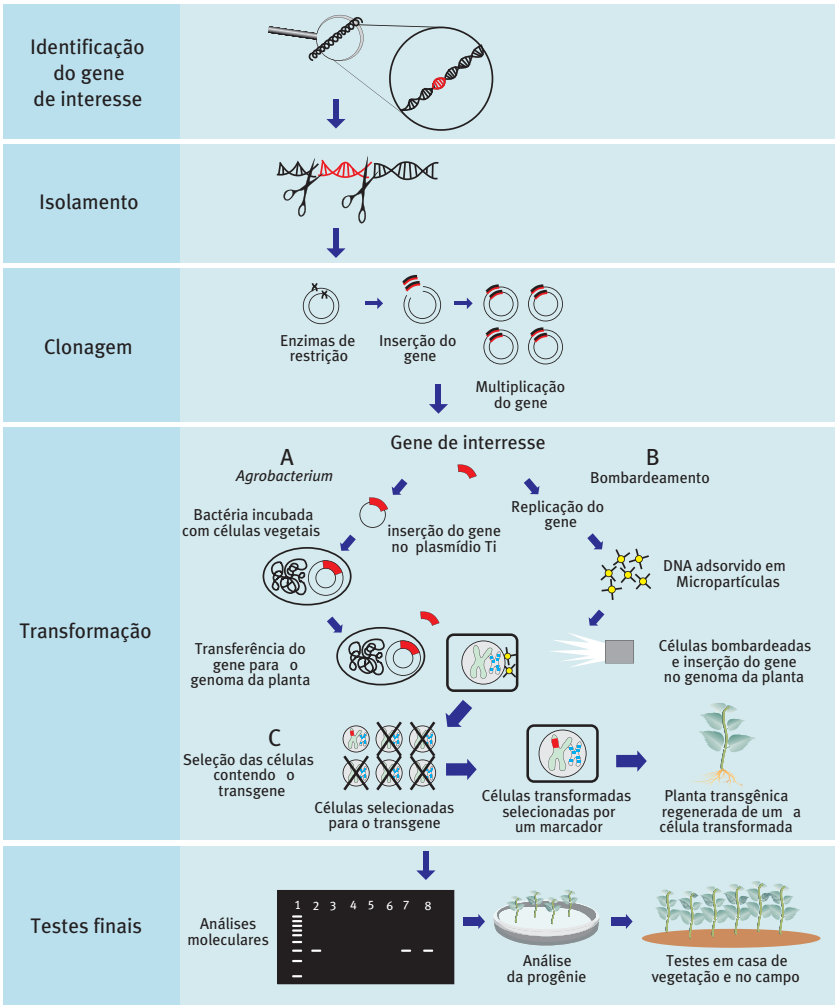


Figura 2. Etapas da transformação: identificação dos genes, isolamento, clonagem, transformação genética e avaliação da transformação.

Fonte: Andrade, 2003.

Identificação, isolamento e caracterização do gene de interesse

A identificação (prospecção), localização e isolamento dos genes de interesse são os procedimentos iniciais do processo de transformação genética. Os genes podem ser prospectados em microrganismos, plantas e animais. Existem diversos processos para identificação de genes, sendo a extração de RNA mensageiro (mRNA) e formação de bibliotecas de DNA complementar (cDNA) o método mais utilizado. No entanto, também pode-se prospectar genes em Bibliotecas constituídas com o genoma completo (bibliotecas de DNA) e por diagnóstico utilizando sondas de proteínas (CORDEIRO, 2003). Após o sequenciamento dos ácidos nucleicos ou proteínas, procuram-se homologias em bancos na Internet (ARAGÃO, 2009). Informações mais aprofundadas sobres os métodos podem ser obtidas nos capítulos Prospecção Gênica e Bioinformática (confira Cap. 4, desta obra) e Biotecnologia e Diagnósticos Moleculares (confira Cap. 7, desta obra).

Os principais genes procurados para transformação genética são aqueles associados a características de produtividade, resistência a estresses bióticos e abióticos e qualidade nutricional. A identificação, isolamento e caracterização desses genes ainda são grandes gargalos da engenharia genética, pois, além do longo tempo necessário para essa etapa, também existem questões relacionadas à propriedade intelectual de vetores, promotores, método de transformação e do próprio gene. Programas de sequenciamento de genomas de diversas espécies vegetais, animais e microorganismos têm sido realizados em todo o mundo com o intuito de identificá-los. No entanto, notamos a dificuldade desse processo pela baixa disponibilidade de genes característicos de interesse econômico, como os citados acima nos bancos de genes mundiais (ANDRADE, 2003; FERREIRA; FALEIRO; 2008).

Construção do cassete de expressão e clonagem

Nessa fase, após a identificação e caracterização do gene de interesse, ele passa por uma série de modificações antes que seja utilizado

na transformação propriamente dita. Nesse processo, empregam-se enzimas de restrições e DNA ligases para manipular o DNA e construir o cassete de expressão (ANDRADE, 2003).

Enzimas de restrição são endonucleases que cortam o DNA originando fragmentos de tamanho idêntico e formando pontas adesivas (Figura 3). Esses cortes geralmente ocorrem em regiões palindrômicas, ou seja, mesma sequência em ambos os sentidos. Existe uma especificidade das enzimas de restrição, pois o DNA sempre é cortado em locais precisos, em uma determinada sequência com 4 a 6 pares de bases nitrogenadas, chamados sítios de restrição (Tabela 1). Essas enzimas existem naturalmente em bactérias e estão relacionadas ao sistema de proteção, no entanto podem reconhecer o sítio de corte no DNA de qualquer espécie, tanto vírus, bactérias, plantas ou animais. A descoberta dessas enzimas foi crucial para o desenvolvimento da engenharia genética.

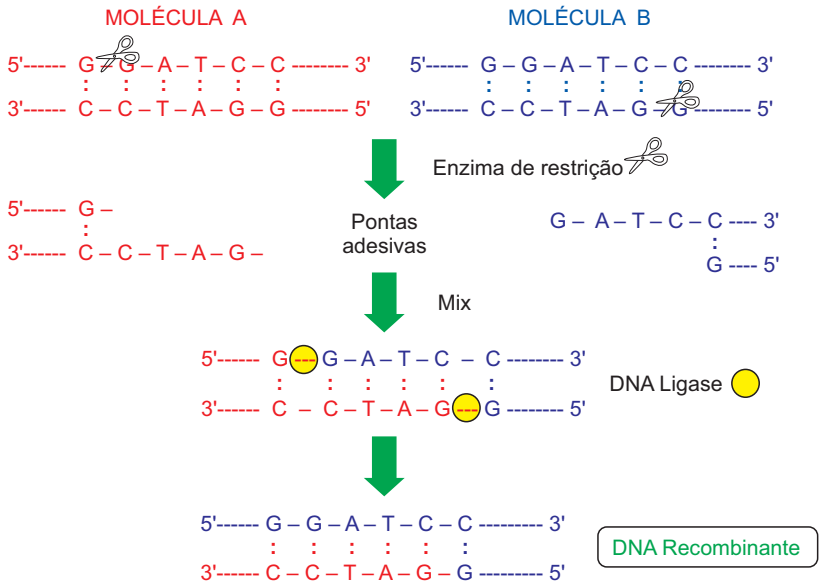


Figura 3. Esquema da síntese de uma molécula de DNA recombinante demonstrando a atuação da enzima de restrição cortando o DNA nas regiões palindrômicas e formando as pontas adesivas seguida da atuação da DNA ligase colando uma ponta à outra.

Tabela 1. Principais enzimas de restrição utilizadas na Engenharia Genética. As setas vermelhas indicam os sítios de restrição, e as regiões sublinhas indicam as pontas adesivas.

Enzimas	Organismo fonte	Sítio de restrição
EcoRI	*Escherichia coli*	↓ 5'-G-A-A-T-T-C- -C-T-T-A-A-G-5' ↑
PstI	*Providencia stuartii*	↓ 5'-C-T-G-C-A-G- -G-A-C-G-T-C-5' ↑
SmaI	*Serratia marcescens*	↓ 5'-C-C-C-G-G-G- -G-G-G-C-C-C 5' ↑
HaeIII	*Haemophilus aegyptius*	↓ 5'-G-G-C-C -C-C-G-G- 5' ↑
HpaII	*Haemophilus parainfluenzae*	↓ 5'-C-C-G-G- -G-G-C-C-5' ↑

Outro grupo de enzimas importantes para a engenharia genética são as DNAs ligases. Essas enzimas promovem a união de moléculas de DNA pela formação de pontes de hidrogênio entre os pares de base e de uma ligação covalente (fosfodiéster) entre a extremidade 3'-OH e outra 5'-PO (Figura 3). Esse processo ocorre facilmente quando existem fragmentos coesivos (pontas adesivas). Na ausência desses fragmentos, a eficiência dessa ligação é diminuída. Nesses casos, pode-se utilizar um dos seguintes métodos:

a) Adição de polidesoxi (A) na extremidade 3' do fragmento de DNA e polidesoxi (T) na extremidade 3' do outro fragmento de

DNA, utilizando a DNA transferase, uma enzima incomum que adiciona nucleotídeos à extremidade de fragmentos fita simples proeminente de uma cadeia de DNA.

b) Adição de oligonucleotídeos sintéticos e complementares que contêm sítios de clivagem para uma ou mais enzimas de restrição. Eles são unidos ao DNA com o auxílio da DNA ligase.

O cassete de DNA obtido deve conter pelo menos uma sequência promotora, o gene de interesse, uma sequência terminadora e um gene marcador de seleção ou repórter (Figura 4). A sequência promotora é necessária para a correta expressão do gene, pois as enzimas responsáveis pela transcrição do gene reconhecem essa região e se acoplam a ela para que ocorra o processo. A sequência terminadora é necessária para finalizar o processo de transcrição do gene. Por fim, para seleção das células transformadas, é necessário um gene repórter como o GUS (β- glucoronidase) ou o Green Fluorescent Protein (GFP), ou um gene de seleção como resistência a antibióticos, herbicidas (ANDRADE, 2003; SOUZA JÚNIOR et al., 2001).

Figura 4. Cassete de expressão contendo o gene de interesse, contendo regiões promotoras, terminadoras e genes de seleção .

Antes de ser utilizado para a transformação genética propriamente dita, o cassete de expressão precisa ser multiplicado, assim, são utilizados vetores para a clonagem. O vetor é uma pequena molécula de DNA que pode ser usada para introduzir o cassete de expressão em uma célula hospedeira (CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA, 2009). Esses vetores precisam ter algumas características: (i) devem ter origem de replicação; (ii) conter sítios de clo-

nagem para a inserção do DNA exógeno; (iii) habilidade de se duplicar na célula hospedeira; (iv) marca genética para selecionar a célula contendo o vetor (resistência a drogas ou marcas auxotróficas). Os vetores mais utilizados são: plasmídios, bacteriófagos (fagos), cosmídios, cromossomos artificiais de levedura (YAC), vetores especiais para plantas, células de insetos e mamíferos. Uma vez multiplicados pelas células hospedeiras, o DNA clonado pode ser utilizado para a transformação genética.

Transformação genética propriamente dita

A transformação genética ocorre em dois estágios: (i) a transferência do DNA e (ii) a integração do DNA no genoma. A integração é um processo com menor eficiência que a transferência, assim, somente uma parte das células que receberam o DNA obtém uma transformação estável (ALTPETER et al., 2005). As demais células apresentam somente uma expressão transiente, ou seja, o DNA é transferido, mas não é integrado e finalmente é degradado por nucleases. Embora não ocorra a integração do DNA nem transformação estável, células com expressão transiente são estudadas para avaliar a eficiência da transformação e a funcionalidade do cassete de expressão (SANTARÉM, 2000; ALTPETER et al., 2005).

Existem diversos métodos de transformação, sendo que a escolha depende da espécie a ser transformada, do tipo de explante utilizado (célula, tecido, protoplastos), da capacidade de regeneração do explante e da disponibilidade de materiais. Os métodos de transformação podem ser agrupados em duas categorias (Figura 5): (i) transferência indireta, que tem como principal metodologia a transformação mediada por *Agrobacterium*; e (ii) transferência direta, que pode utilizar a transformação por biobalística (bombardeamento de micropartículas), eletroporação ou microinjeção (ANDRADE, 2003). Embora todos os métodos tenham suas vantagens e desvantagens, atualmente a biobalística e o *Agrobacterium* são os mais conhecidos e utilizados para a transformação genética de plantas (RAO et al., 2009).

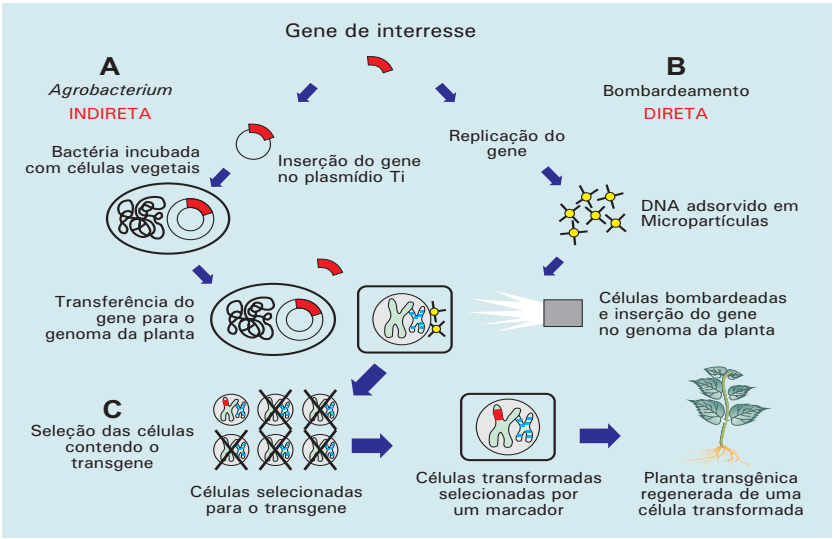


Figura 5. Modelo esquemático de transformação direta (bombardeamento) e indireta (*Agrobacterium*).

Adaptado de: http://www.kicsforum.net/docsweb/images/Basics-Genetic-Modification-2.jpg

Transformação indireta

É a transformação por meio de um vetor biológico para intermediar a transferência do DNA. O método mais eficiente é a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, mas também se pode utilizar *A. rhizogenes* e vírus vegetais com capacidade de transferência de DNA (SANTARÉM, 2000; RAO et al., 2009).

As bactérias do gênero *Agrobacterium* são fitopatógenos e possuem a capacidade natural de transferir DNA para algumas espécies de dicotiledôneas, induzindo a formação de um tumor conhecido como galha-da-coroa (crown gall) ou a síndrome-da-raiz-em-cabeleira (hairy root) (Figura 6). A infecção ocorre em algum tipo de ferimento da planta, onde a agrobactéria reconhece o mesmo, acopla-se a planta e inicia a transferência do DNA (Figura 7). Estudos demonstraram que, mesmo após a desinfecção das plantas, os sintomas permaneciam, sugerindo a presença de um fator determinante nas plantas infectadas. Mais tarde, foi identificado que a agrobactéria transferia um frag-

mento do DNA, denominado T-DNA ou DNA de transferência. Esse fragmento era integrado ao genoma vegetal e se expressava de maneira estável. Assim, através de manipulação genética do T-DNA, foi desenvolvido o primeiro método de transformação genética de plantas (PERMYOKOVA et al., 2009; ANDRADE, 2003; BRASILEIRO, 1993).

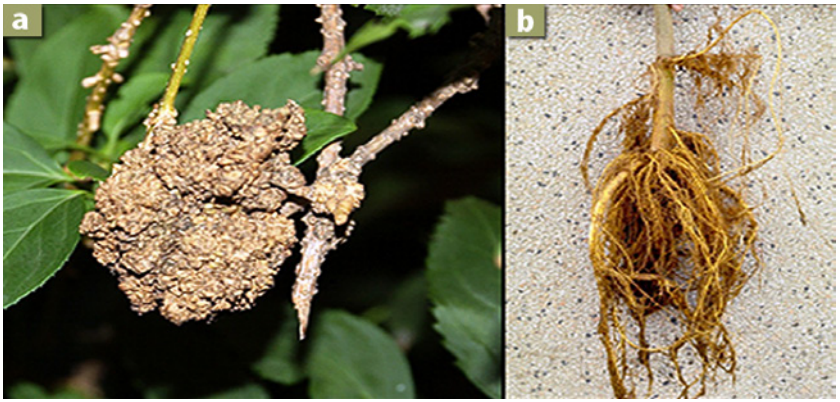


Figura 6. Evidências de infecção por *Agrobacterium*: (A) galha-da-coroa; (B) síndrome-da-raiz-em-cabeleira.
Fonte: Wikipedia, 2009.

Foto: Solange Andrade

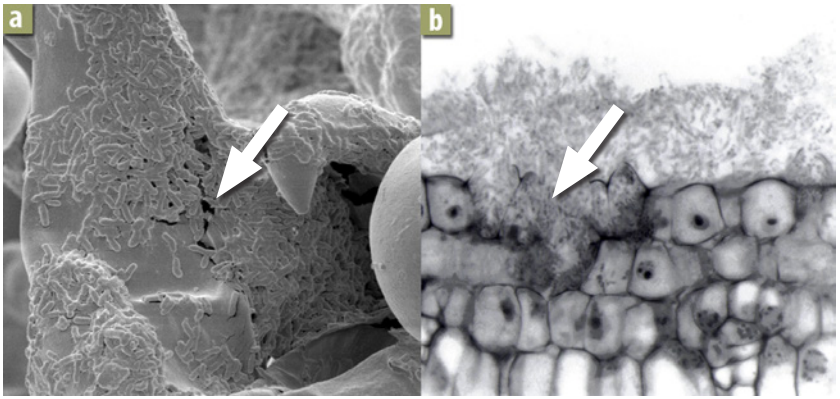


Figura 7. Infecção por *Agrobacterium*: (A) *Agrobacterium* em fissura de folha de feijão (M.E.); (B) Detalhe da infecção por *Agrobacterium* em folha de feijão (M.O.). Seta indica local da fissura.

O método possui as vantagens de ser natural, apresentar alta probabilidade de integração do gene e a transferência de um pequeno número de transgenes. Por ser um método muito conveniente, tem sido bastante estudado e aprimorado. Foi demonstrado que o T-DNA é coberto por proteínas Vir antes de ser transferido, para evitar a degradação do DNA por endonucleases da planta (CYTOVSKY et al., 2007). Pesquisas recentes têm demonstrado que ocorre transferência não somente do T-DNA, mas também das regiões limites da esquerda e direita deste T-DNA. Segundo Permyiakova e colaboradores (2009), esse cuidado estaria ligado ao reconhecimento da área de replicação do T-DNA, à proteção deste T-DNA contra endonucleases da planta e ao processo integração do T-DNA ao genoma da planta.

A desvantagem da transformação indireta é que ela é dependente da suscetibilidade do vegetal à infecção por *Agrobacterium*. No entanto, com o avanço no conhecimento dos mecanismos de transferência, já é possível obter em laboratório a transferência de genes para várias espécies de dicotiledôneas, fungos e até para células humanas (CYTOVSKY et al., 2007; PERMYAKOVA et al., 2009). Segundo Permyakova e colaboradores (2009), atualmente a integração do T-DNA em monocotiledôneas varia de 26% a 62%.

Transformação direta

É a transformação por métodos que não utilizam bactérias como mediadoras. Esses métodos foram desenvolvidos com o intuito de obter a introdução de DNA em células de qualquer espécie ou reino (vegetal, animal ou microrganismo), utilizando meios químicos ou físicos. Nesse caso, o cassete de expressão é introduzido nas células-alvo através de modificações nas paredes e membranas celulares. Atualmente, as principais metodologias utilizadas são a biobalística (bombardeamento ou aceleração de micropartículas), eletroporação de protoplastos (choques elétricos), politileneglicol – PEG ou fosfato de cálcio (agentes permeabilizantes) e microfibras de carboneto de silício (processos físicos) (ANDRADE, 2003; SANTARÉM, 2000; RAO et al., 2009; ALTPETER et al., 2005). Entre esses métodos, a transformação por bombardeamento de micropartículas é a mais eficiente e de maior sucesso. Os demais métodos apresentam baixa eficiência ou

não são reproduzíveis em várias espécies e situações (SANTARÉM, 2000; ALTPETER et al., 2005).

Biobalística ou bombardeamento de micropartículas

O método foi desenvolvido por Sanford e colaboradores (SANFORD et al., 1987) e consiste em bombardear células ou tecidos com micropartículas de tungstênio ou ouro carregando o DNA exógeno, lançadas a partir de um acelerador que produz uma onda de choque através de uma câmara especial em condição de vácuo (Figura 8). Os sistemas que utilizam gás hélio sob alta pressão e descarga elétrica têm demonstrado maior eficiência na obtenção dos transformantes (RECH; ARAGÃO, 1998; LACORTE et al., 1999).

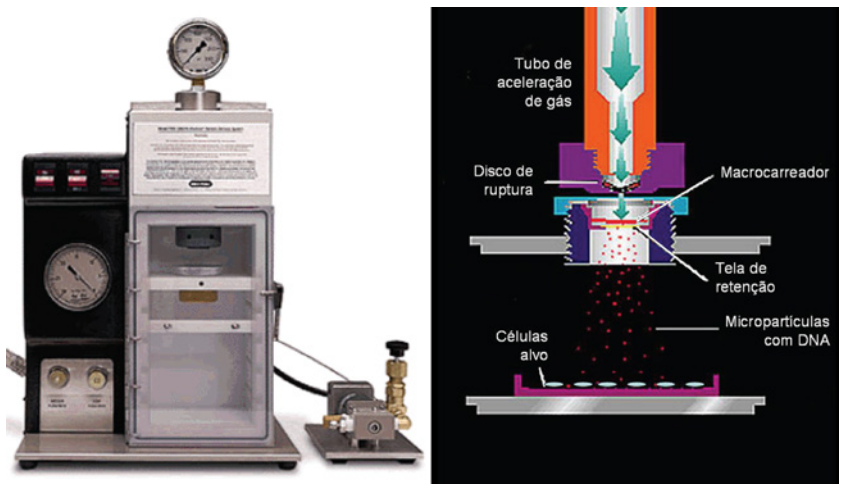


Figura 8. Transformação por bombardeamento de micropartículas. (A) Aparelho de bombardeamento de micropartículas por pressão de gás (BioRad); (B) Desenho esquemático do processo de interno do aparelho de bombardeamento por pressão de gás.
Fonte: http://depts.washington.edu/genomelb/BiolisticBombardment&MiscV3.html

A grande vantagem da biobalística é que permite a transformação de células, tecidos e espécies de forma direta, simples e rápida, sendo aplicável para transferência de genes a espécies nas quais os outros métodos são falhos. É a única técnica que permite a transformação de

plastídios e mitocôndrias, embora os métodos ainda estejam sendo aprimorados. É, também, uma técnica útil na introdução e expressão de genes em animais in vivo, e na indução da resposta imune utilizando DNA, através do processo denominado imunização genética (ANDRADE, 2003; ALTPETER et al., 2005; RECH; ARAGÃO, 1998; LACORTE et al., 1999).

Outra vantagem do bombardeamento de micropartículas é que ele facilita a transferência múltipla de genes, pois permite a cotransformação pela mistura de diferentes construções de DNA, o que evita estratégias complexas de clonagem (ALTPETER et al., 2005). No entanto, apresenta a desvantagem de haver integração de múltiplas cópias, que, em geral, estão fortemente ligadas. Além disso, as cópias podem estar fragmentadas com os genes e vetores em diferentes posições no genoma, podendo alterar ou silenciar a expressão dos genes exógenos (ANDRADE, 2003; SANFORD, 1990; De BLOCK, 1993).

Inicialmente, a eficiência de obtenção de transformantes estáveis é cerca de 1% a 5%, com o aprimoramento da técnica foram obtidos até 18% de eficiência em arroz (DANILOVA, 2007; SANFORD, 1990; POTRYKUS, 1990). O explante bombardeado tem que ser criteriosamente selecionado. Para isso, utiliza-se um gene repórter que possa ser facilmente detectado. Esse cuidado deve ser tomado, pois, em geral, são obtidas quimeras dos genes introduzidos por causa do bombardeamento randômico de um pequeno número de células num sistema múltiplo (SANFORD, 1990).

Eletroporação

A técnica foi desenvolvida inicialmente para transformação de protoplastos, posteriormente foi aprimorada para tecidos organizados como pólen, micrósporos, fragmentos de folhas, embriões somáticos, callus, sementes e gemas (RAO et al., 2009). O objetivo inicial era obter a transformação de cereais, como alternativa à transformação via *Agrobacterium*, entretanto, posteriormente, a metodologia foi estendida às outras espécies vegetais.

A técnica consiste no emprego de pulsos elétricos curtos de alta voltagem para uma alteração reversível da estrutura da membrana plasmática, induzindo a formação de poros ao longo de sua superfície.

Dessa maneira, é possível aumentar a permeabilidade da membrana, possibilitando a entrada macromoléculas (Figura 9). Na eletroporação, pode-se introduzir moléculas de vários tamanhos em protoplastos ou células intactas, como, por exemplo, DNA e RNA. Além disso, essa técnica, pode ser utilizada para a extração de metabólitos secundários de uma suspensão celular (ANDRADE, 2002; SANTARÉM, 2000; RAO et al., 2009; POTRYKUS, 1990).

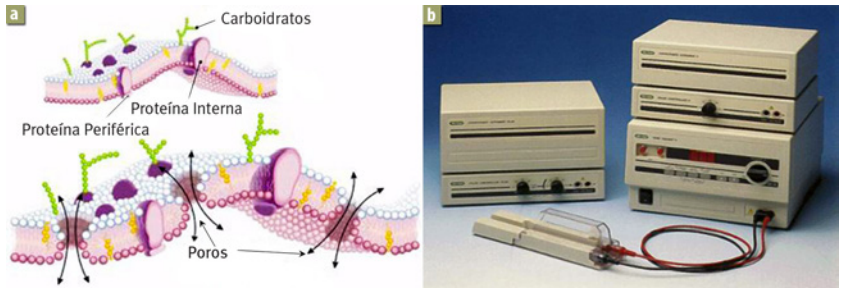


Figura 9. Transformação por Eletroporação. (A) Desenho esquemático da formação dos poros na membrana plasmática; (B) Aparelho de eletroporação.

A principal limitação da técnica é a regeneração do protoplasto, e mesmo quando obtida a regeneração, as plântulas apresentam problemas (ALTPETER et al., 2005; SANTARÉM, 2000). Além disso, a eficiência da técnica pode ser afetada pelo tampão de transferência, pH do meio, pressão osmótica, digestão da parede celular e a sobrevivência do protoplasto (ALTPETER et al., 2005; SANTARÉM, 2000; ANDRADE, 2002). A parede celular, embora não impeça a permeabilidade da membrana, é uma barreira para moléculas maiores que 5 kb (LINDSEY; JONES, 1990). No entanto, os métodos estão sendo aprimorados para transformação de células intactas, ou digeridas parcialmente. Com isso, tem sido reportado a transformação de tabaco, trigo e milho. Entretanto, apesar de ser simples e eficiente, não tem sido largamente utilizada para transformação genética (ALTPETER et al., 2005; SANTARÉM, 2000).

Microinjeção

É um processo preciso e específico para a introdução de macromoléculas no citoplasma, núcleo ou outro compartimento-alvo da célula.

A operação utiliza um micromanipulador acoplado a um microscocópio e, por meio de uma micropipeta de vidro, dentro de uma câmara asséptica que não sofra vibrações e com temperatura e umidade relativa controlada, pode-se inserir macromoléculas na célula de maneira não letal (Figura 10). As células podem estar intactas, ou desprovidas parcial ou totalmente de suas paredes celulares (ANDRADE, 2003; ALTPETER et al., 2005).

As principais vantagens da técnica são: a introdução de macromoléculas dentro da célula ou de um compartimento celular de maneira precisa; a possibilidade de controlar o volume introduzido na célula e a alta frequência de transformação (15% a 26%). A desvantagem do método é ser trabalhoso, requerer instrumentos caros e grande habilidade de manuseio. É um método que consome muito tempo, não sendo indicado quando é desejado um grande número de transformantes. Em razão disso, a microinjeção é pouco utilizada para transformação vegetal, porém é uma importante metodologia para a transformação de células animais (ANDRADE, 2003; ALTPETER et al., 2005).

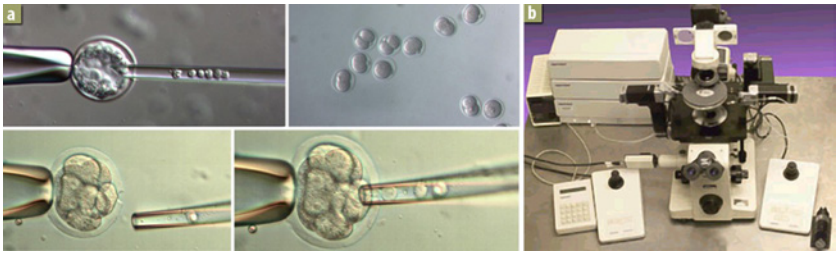


Figura 10. Microinjeção de células. (A) Etapas da microinjeção de macromoléculas em células; (B) Aparelho de microinjeção.
fonte: http://sols.asu.edu/labs/bioimaging_facility/keck_lab/equip.php

Microfibras de carboneto de silício (SCMT)

É a metodologia de transformação mais simples desenvolvida. Consiste da adição de microfibras de carboneto de silício a uma suspensão de tecidos vegetais (células, embriões imaturos, callus) e DNA, seguida da agitação por vortex ou agitadores. Com isso, são criadas pequenas fissuras na parede celular e membranas permitindo

a entrada do DNA. Embora a metodologia seja simples e barata, a eficiência de transformação ainda é baixa e os danos causados às células diminuem a viabilidade das mesmas e consequentemente a regeneração da planta. No entanto, existem relatos de obtenção de várias espécies transformadas por essa metodologia, que pode ser uma boa alternativa para espécies recalcitrantes ao *Agrobacterium* e na ausência de um aparato de bombardeamento de partículas (ALTPETER et al., 2005).

Seleção e regeneração das células transformadas

Essa etapa é fundamental para a obtenção de organismos transgênicos, sendo a regeneração das células transgênicas uma das principais etapas limitantes para a transformação de protoplastos e de alguns cultivares comerciais (LAMB et al., 2001). Estudos demonstraram que, embora em muitos casos seja possível a transformação estável das células-alvo, se não houver um método criterioso de seleção e um protocolo completo de regeneração dessas células, não será possível obter uma planta transgênica (SANTARÉM, 2000). O processo de seleção dependerá do gene repórter ou de seleção utilizado no cassete de expressão.

O gene de seleção, em geral, induz uma vantagem seletiva, que permitirá às células transgênicas crescerem de forma rápida, eliminando as células não transgênicas. O método de seleção dos transgenes pode utilizar estratégias diferenciadas que são conhecidas como seleção positiva ou negativa. A seleção positiva permite a identificação e o desenvolvimento das células transgênicas sem eliminar as células não transgênicas, pela introdução de um gene que permite o metabolismo de substâncias que são inseridas no meio de crescimento. Como exemplo, podemos citar o sistema *manA*/manose, que confere às plantas a capacidade de metabolizar manose como fonte de açúcar. Um sistema similar utiliza *xylA*/xylose. Por fim, o uso do gene *gus*, que é mais utilizado como gene repórter, mas que também confere à célula transgênica capacidade de produzir citocinina e se desenvolver mais rapidamente que as não transgênicas. Embora não sejam os sistemas mais comuns, existem relatos de sucesso na obtenção de transgênicos utilizando essas estratégias (ARAGÃO; BRASILEIRO, 2002).

A seleção negativa é realizada com a utilização genes que conferem resistência a algum produto, como herbicidas ou antibióticos, permitindo a regeneração da célula transgênica e eliminando a não-transgênica. Essa é a principal estratégia utilizada para a seleção de transgenes, sendo os métodos mais comuns o *nptII*/canamicina ou geneticina e o *bar*/herbicida imidazolinona. Existe muita controvérsia quanto ao uso de antibióticos para selecionar células transgênicas, assim, o uso de herbicidas tem sido o método mais utilizado. Importante salientar que, para cada protocolo de regeneração de transgênicos, é necessário determinar a dose adequada do agente seletivo que seja mais adaptada para a espécie e tipo celular usados (Figura 11). Uma dosagem muito alta pode provocar a morte de todas as células, inclusive as transgênicas, e uma subdosagem pode levar ao aparecimento de escapes, isto é, o desenvolvimento de plantas não transformadas.

Foto: Solange Rocha Monteiro de Andrade

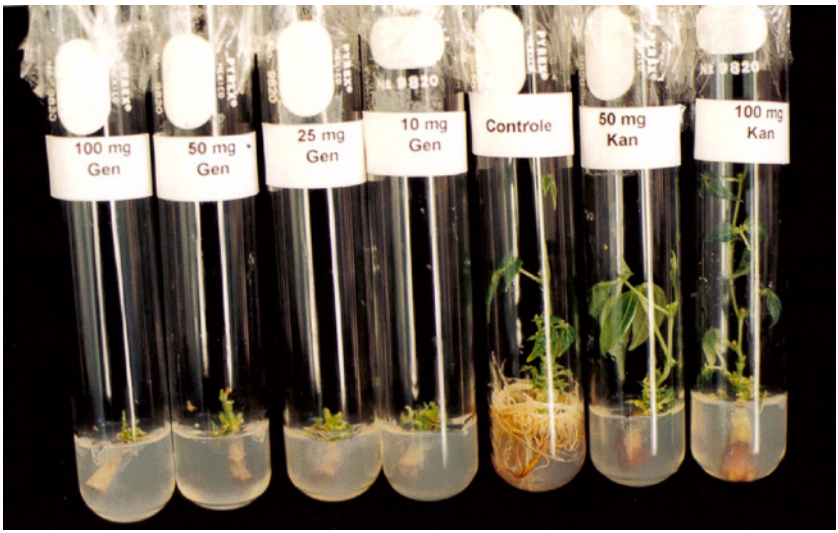


Figura 11. Explantes de feijão cv. Olathe Pinto submetidos ao teste de sobrevivência à geneticina (Gen) ou à canamicina (Kan), após 30 dias de exposição ao agente seletivo.

O domínio das técnicas de regeneração de plantas inteiras a partir de uma única célula é condição *sine qua non* para o sucesso na obtenção de plantas transgênicas. Como cada espécie de planta tem

diferentes exigências hormonais, nutricionais e ambientais para a regeneração, essa etapa ainda representa o maior gargalo na criação de plantas transgênicas, embora essa técnica já esteja estabelecida para inúmeras plantas de interesse (ANDRADE, 2002; GANDER; MARCELLINO, 1997).

Conforme visto no Capítulo 14, *Cultura de Tecidos Vegetais: princípios e aplicações*, deste livro, o processo de regeneração e desenvolvimento de uma nova plântula pode ocorrer via organogênese ou embriogênese somática. Os fatores que influenciam na determinação da rota morfogenética são: o tipo de explante escolhido, estádio fisiológico da planta e o ambiente do meio de cultura (reguladores de crescimento, nutrientes, luz, etc). A regeneração de plantas transgênicas inclui a integração da técnica de transformação com um sistema funcional de regeneração para uma dada espécie ou cultivar, e um sistema de seleção (Figura 12). Porém, nem todas as técnicas de transformação são compatíveis com os sistemas de regeneração, pois o processo de regeneração é geralmente espécie-específico e frequentemente cultivar específico. Então, ter o sistema de regeneração estabelecido para a espécie, mas não para a cultivar a ser transformada, ou uma técnica de transformação para um tipo de explante, mas que não tem processo de regeneração estabelecido, não garantirá o sucesso da regeneração e da obtenção da planta transgênica (RITCHIE; HODGES, 1993).

Assim, antes de iniciar um processo de transformação de uma espécie, é necessário o entendimento de muitos mecanismos básicos inerentes aos processos de desenvolvimento da planta a ser transformada. O correto entendimento desses mecanismos é essencial para o desenvolvimento de uma metodologia de regeneração do transgênico, e para o sucesso de obtenção da planta transgênica, uma vez que a maioria das metodologias de transformação necessita de uma fase de cultura in vitro (ANDRADE, 2002).

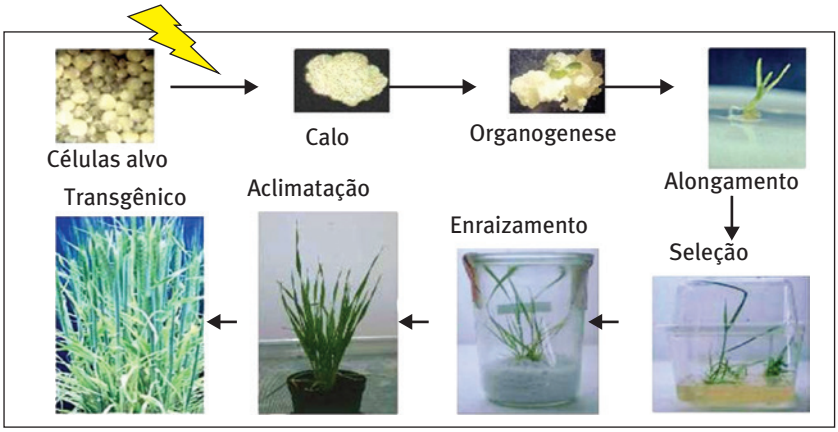


Figura 12. Esquema das etapas de seleção e regeneração de plantas transgênicas. A seta amarela indica o momento da transformação.

Testes dos organismos transformados

Trata-se da última etapa do processo de transformação genética. Após o processo de seleção e regeneração in vitro, as plantas obtidas são transferidas para casa de vegetação. Em seguida, são submetidas à avaliação molecular para confirmação da transformação, por meio de amplificação por "Polymerase Chain Reaction" (PCR), para isso utilizam-se primers específicos para o cassete de expressão utilizado (Figura 13). Uma vez confirmada a presença do transgene nas plantas regeneradas, essas são multiplicadas, e a progenie é submetida a diversas análises agronômicas e de biossegurança alimentar e ambiental. Antes da liberação e utilização comercial do organismo geneticamente modificado, é importante conhecer e certificar a sua biossegurança. No Capítulo 16, deste livro, discute-se a biossegurança e os diferentes testes aos quais são submetidos os organismos geneticamente modificados.

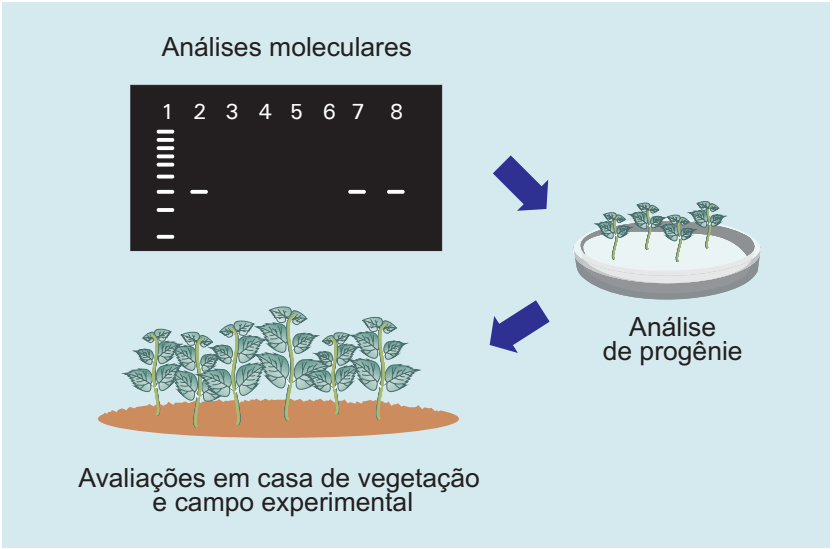


Figura 13. Etapas da seleção e identificação das plantas regeneradas.

Aplicações de plantas transgênicas

A transformação genética abriu inúmeras possibilidades tanto para a pesquisa básica como aplicada. Os transgênicos podem ser utilizados para o melhoramento genético vegetal, melhoria da qualidade nutricional dos alimentos, desenvolvimento e produção de medicamentos e vacinas comestíveis, produção em larga escala de moléculas secundárias, estudos da função e expressão de genes e promotores e outros (ANDRADE, 2003; FALEIRO; ANDRADE, 2007). Acreditava-se que, com o desenvolvimento e com os avanços do uso da tecnologia do DNA recombinante, a disponibilização de organismos transgênicos ocorreria em ondas – primeiro transgênicos com características de interesse agronômico, seguido modificações na qualidade de alimentos, produção de fármacos e outros (Figura 14). A engenharia genética tem tido muito sucesso na obtenção de plantas expressando características qualitativas controladas por apenas um gene. Entre essas, as características de interesse agronômico, como resistência a herbicidas e tolerância a insetos, dominam o mercado de transgêni-

cos desde o início de sua produção. Considera-se que a grande adoção dessas tecnologias pelos produtores ocorreu principalmente porque os produtos tecnológicos lançados facilitam sobremaneira o manejo das culturas, diminuindo os custos de produção (ANDRADE, 2003; FERREIRA; FALEIRO, 2008).

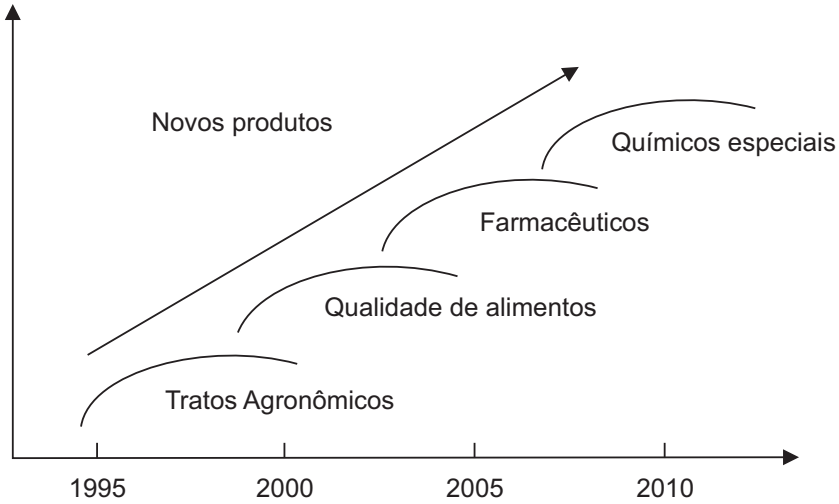


Figura 14. Probabilidade de liberação de organismos transgênicos com o passar dos anos.

O desenvolvimento de transgênicos expressando outras características, além de agronômicas, está um pouco atrasado em relação ao previsto. Os motivos para isso são diversos, entre eles o pequeno pool de genes disponível, questões de regulamentação e biossegurança, bem como de propriedade intelectual de vetores, promotores (FERREIRA; FALEIRO, 2008). No entanto, espera-se para 2012 o lançamento comercial do arroz dourado, com maior quantidade de β-caroteno, e do milho tolerante à seca. Existem estudos para o desenvolvimento de vacinas comestíveis e outros tipos de fármacos, mas ainda precisa avançar nos estudos de biossegurança e regulamentação da liberação comercial desses produtos (FERREIRA; FALEIRO, 2008; JAMES, 2008).

Os principais países produtores dos produtos biotecnológicos e culturas plantadas estão descritos na Tabela 2 e na Figura 15.

Tabela 2. Área global das culturas biotecnológicas em 2008: por país (milhões de hectares)

Posição	País	Área (milhões/ha	Culturas biotecnológicas
1	EUA*	62,5	Soja, milho, algodão, canola, abóbora, papaia, alfafa, beterraba
2	Argentina*	21,0	Soja, milho, algodão
3	Brasil*	15,8	Soja, milho, algodão
4	Índia*	7,6	Algodão
5	Canadá*	7,6	Canola, milho, soja, beterraba
6	China*	3,8	Algodão, tomate, álamo, petúnia, papaia, pimentão
7	Paraguai*	2,7	Soja
8	África do Sul *	1,8	Milho, soja, algodão
9	Uruguai*	0,7	Soja, milho
10*	Bolívia*	0,6	Soja
11*	Filipinas*	0,4	Milho
12*	Austrália*	0,2	Algodão, canola, cravo
13*	México*	0,1	Algodão, soja
14**	Espanha*	0,1	Milho
15*	Chile	<0,1	Milho, soja, canola
16*	Colômbia	<0,1	Algodão, cravo
17*	Honduras	<0,1	Milho
18*	Burkina Faso	<0,1	Algodão
19*	República Tcheca	<0,1	Milho
20*	Romênia	<0,1	Milho
21*	Portugal	<0,1	Milho
22*	Alemanha	<0,1	Milho
23*	Polônia	<0,1	Milho
24*	Eslováquia	<0,1	Milho
25*	Egito	<0,1	Milho

* 14 mega-países biotecnológicos produzindo 50.000 hectares, ou mais de culturas biotecnológicas

Fonte: James (2008).

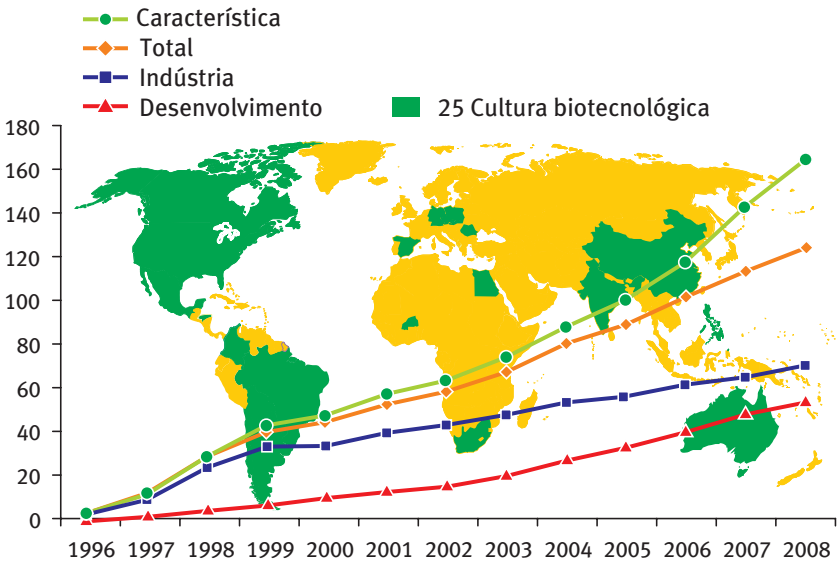


Figura 15. Crescimento da área global de plantio das culturas biotecnológicas, de 1996 a 2008 (Milhões de hectares).

Fonte: James (2008).

Transformação genética de animais

O processo de transformação genética de animais ocorreu de forma mais lenta que a transformação de plantas. A técnica foi desenvolvida no final da década de 1970, para estudos sobre câncer que utilizavam camundongos, mas os primeiros resultados pareceram no início da década de 1980, com o desenvolvimento da microinjeção pronuclear de zigotos (BRESSAN et al., 2008).

Existem diversos métodos para a transformação de animais: bombardeamento de óvulos micropartículas contendo DNA, microinjeção pronuclear de DNA exógeno em zigotos, fertilização in vitro por espermatozoide modificados, transferência de DNA para células ou embriões mediada por lipossomos, eletroporação de DNA em espermatozoides, zigotos ou embriões, injeção de células embrionárias previamente modificadas em blastoceles e a transferência nuclear de células somáticas ou embrionárias também previamente genetica-

mente modificadas. Os principais métodos utilizados são: (i) microinjeção pronuclear de genes em óvulos fertilizados; (ii) injeção de células embrionárias previamente modificadas em blastoceles (Figura 16) (PEREIRA, 2008).

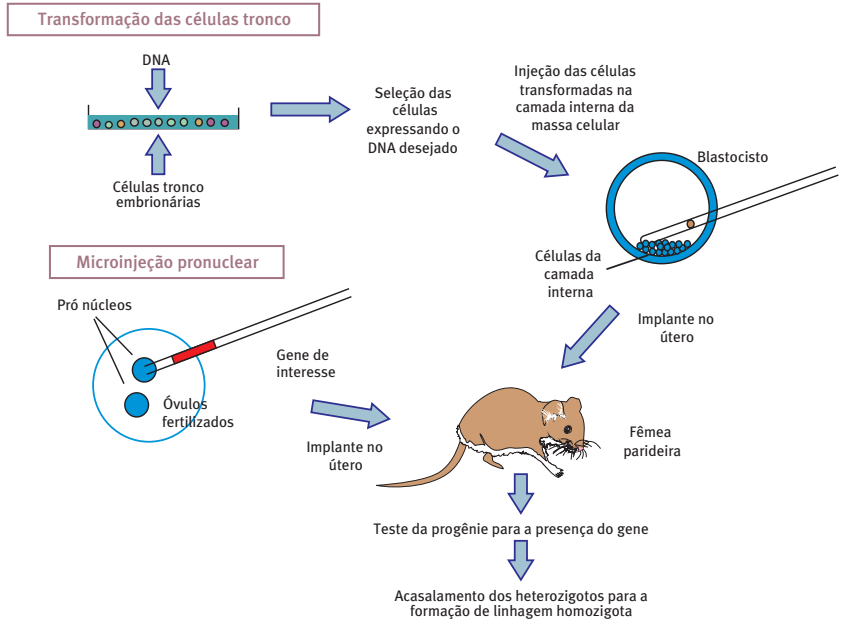


Figura 16. Desenho esquemático dos métodos de transformação de animais.

O primeiro animal transgênico foi obtido em 1982, pela microinjeção do gene do promotor de crescimento de ratos em óvulos fecundados de camundongo, produzindo o supercamundongo (PALMITER et al., 1982). Esse trabalho foi um marco para a transgenia animal, por demonstrar a possibilidade de produção de grandes quantidades de proteínas por um animal, e um futuro uso dos mesmos como bioreatores (Figura 17). Em 2001, o segundo marco foi obtido pelo Oregon Regional Primate Ressearch Center, que desenvolveram o primeiro primata transgênico. Nomeado como ANDi, o macaco Rhesus foi obtido pela injeção de um gene fluorescente de medusa em óvulo maduros, posteriormente fecundados e implantados em úteros de uma receptora (CHAN et al., 2001). Esse estudo abriu espaço para o

uso da transformação genética para estudos e, talvez, a cura de doenças humanas, como, por exemplo, Alzeimer.

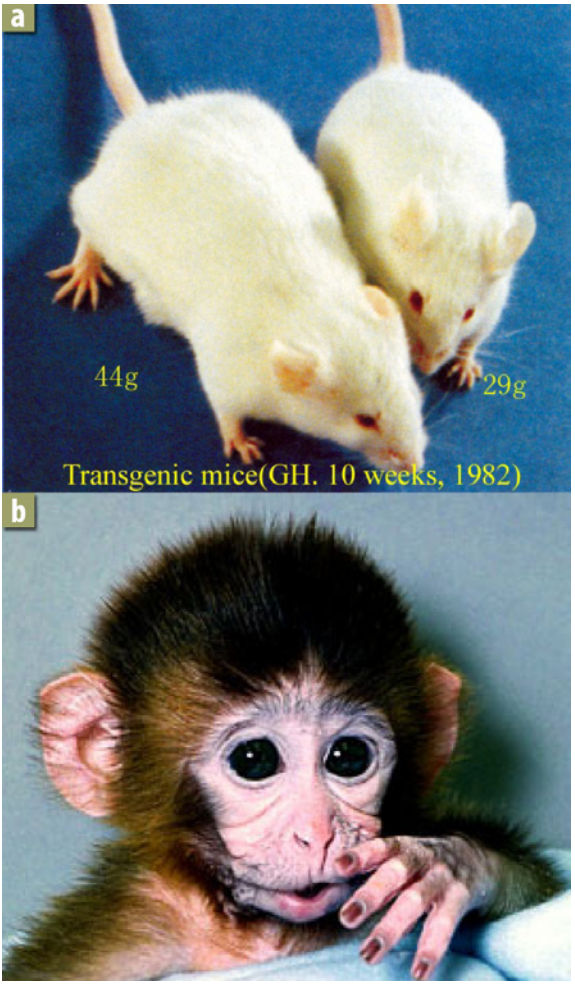


Figura 17. (A) Supercamundongo obtido 1982 pela expressão do gene de crescimento de ratos; (B) ANDi, macaco Rhesus contendo gene de medusa.

Fonte: (A) Palmiter et al., 1982; (B) Chan et al., 2001.

No Brasil, em 2001, nasceu Christian, o primeiro camundongo transgênico, desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Biociência da USP. O projeto liderado pela Dra. Lygia Pereira tinha objetivo de obter animais mutantes para estudo da Síndrome de Marfan a partir de linhagens de células tronco utilizando a técnica de nocaute. No mesmo ano, também nasceu Vitor, obtido por microinjeção pronuclear, em projeto liderado pelo Dr. João Bosco Pesquero, no Laboratório de Animais Transgênicos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais em Medicina e Biologia (Cedeme) da Unifesp (PESQUERO et al., 2002; PESQUERO, 2007; PEREIRA, 2008).

As principais aplicações de animais transgênicos são: (i) estudo de doenças; (ii) desenvolvimento de órgão para transplante (xenotransplantes); (iii) produção de proteínas e hormônios de interesse humano; (iv) animais ornamentais; (v) melhoria da qualidade nutricional; (vi) alterações fisiológicas diversas.

Considerações finais

O vasto conhecimento sobre as tecnologias de engenharia genética adquirido durante as quatro últimas décadas trouxe grandes avanços para a medicina, e agropecuária, além significativos impactos econômicos e sociais para diferentes setores da sociedade. Ainda existe um amplo campo a ser estudado, considerando todas as potencialidades que a engenharia genética pode oferecer. Nesse sentido, é estratégico o investimento em ciência e tecnologia e na formação de recursos humanos para atender à crescente demanda do mercado.

Referências

Altpeter, F.; Baisakh, N.; Beachy, R.; Bock, R.; Capell, T.; Christou, P.; Daniell, H.; Datta, K.; Datta, S.; Dix, P. J.; Fauquet, C.; Huang, N.; Kohli, A.; Mooibroek, H.; Nicholson, L.; Nguyen, T. T.; Nugent, G.; Raemakers, C. J. J. M.; Romano, A.; Somers, D. A.; Stoger, E.; Taylor, N.; Visser, R. G. F. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. **Molecular Breeding**, v. 15, p. 305 – 327, 2005.

ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002. 16 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 58).

ANDRADE, S. R. M. **Transformação de plantas.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2003. 28 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 102).

ANDRADE, S. R. M.; FALEIRO, F. G. Breve histórico da Biossegurança de Transgênicos. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. (Ed.). **Biotecnologia, transgênicos e biossegurança**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. p. 49-59.

ARAGAO, F. J. L.; BRASILEIRO, A. C. M. Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant selection. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 14, p. 01-10, 2002.

ARAGÃO, F. J. L. Engenharia genética: estado da arte. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. (Ed.). **Biotecnologia, transgênicos e biossegurança**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. p 31-48.

BERG, P. **Paul Berg, The Nobel Prize in Chemistry 1980**. Autobiography. 2004. Disponível em: <http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1980/berg-autobio.html>. Acesso em: 10 ago. 2009.

BRASILEIRO, A. C. M. Biologia de *Agrobacterium* sp. **ABCP Notícias**, Brasília, v. 20, p. 2-6. 1993.

BRESSAN, F. F.; MIRANDA, M. S.; DE BEM, T. H. C.; PEREIRA, F. T. V.; BINELLI, M.; MEIRELLES, F. V. Produção de animais transgênicos por transferência nuclear como modelo de estudo biológico. **Revista Brasileria de Reprodução Animal**, v. 32, p. 240-250, 2008.

CHAN, A. W. S.; CHONG, K. Y.; MARTINOVICH, C.; SIMERLY, C.; SCHATTEN, G. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. **Science**, v. 291, p. 309-321, 2001.

Citovsky, V.; Kozlovsky, S. V.; Lacroix, B.; Zaltsman, A.; Dafni, M.; Vyas, S.; Tovkach, A.; Tzfira, T. Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. **Cellular Microbiology,** v. 9, p. 9–20, 2007.

COHEN, S. N.; CHANG, A. C. Y.; HSU, L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria. Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. **Proceedings of the National Academic Science USA,** v. 69, p. 2110-2114, 1972.

CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA. **Glossário**. 2009. Disponível em: <http://www.cib.org.br/glossario.php>. Acesso em: 10 ago. 2009.

CORDEIRO, M. C. R. **Engenharia Genética:** conceitos básicos, ferramentas e aplicações. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2003. 43 p. (Embrapa Cerrados, Documentos, 86).

DANILOVA, S. A. The Technologies for Genetic Transformation of Cereals. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 54, p. 569-581, 2007.

DE BLOCK, M. The cell biology of plant transformation: Current state, problems, prospects and the implications for the plant breeding. **Euphytica**, Wagnigen, v. 17, p. 1-14, 1993.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. Biotecnologia, transgênicos e biossegurança. In: FALEIRO, F. G.; SOUZA, E. S. **Pesquisa, desenvolvimento e inovação para o cerrado.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. p. 123-127.

FERREIRA, M. E.; FALEIRO, F. G. Biotecnologia: avanços e aplicações no melhoramento genético vegetal. In: FALEIRO, F.; FARIAS NETO, A. (Ed.). **Savanas:** desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. p. 765-792.

GANDER, E. S.; MARCELLINO, L.H. Plantas Transgênicas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 1, p. 34-37, 1997.

JACKSON, D. A.; SYMONS, R. H.; BERG, P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: cirular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and galactose operon of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 69, p. 2904-2909, 1972.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2008. Ithaca, NY: ISAAA, 2008. (ISAAA Brief, No. 39).

LACORTE, C.; ARAGÃO, F. J. L.; VAINSTEIN, M. H.; RECH, E. L. Biobalística. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPH, 1999. v. 2. p. 761-781.

LAMB, C. R. C.; MILACH, S. C. K.; PASQUALI, G.; BARRO, R. S. Regeneração de plantas a partir de segmentos de base de folhas em aveia. **Ciência Rural**, v. 31, p. 751-755, 2001.

LINDSEY, K.; JONES, M. G. K. Electroporation of cells. **Physiologia Plantarum**, v. 79, p. 168-172, 1990.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Safety evaluation of foods produced by modern biotechnology:** Concepts and principles. 1993. Disponível em: <http://www.oecd.org/dataoecd/57/3/1946129.pdf>. Acesso em: 30 maio 2005.

PALMITER, R. D.; BRINSTER, R. L.; HAMMER, R. E; TRUMBAUER, M. E.; ROSENFELD, M. G.; BINBERG, N. C.; EVANS, R. M. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. **Nature**, v. 300, p. 611-615, 1982.

PEREIRA, L. V. Animais transgênicos: nova fronteira do saber. **Ciência e Cultura**. São Paulo, v. 60, n. 2, 2008 . Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252008000200017&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 25 jan. 2010.

Permyakova, N.; Shumnyi, V.; Deineko, E. *Agrobacterium* - mediated transformation of plants: Transfer of vector DNA fragments in the plant genome. **Russian Journal of Genetics**, v. 45, p. 266-275, 2009.

PESQUERO, J. B.; BAPTISTA, H. A.; MOTTA, F. L. T.; OLIVEIRA, S. M. Aplicação dos animais transgênicos. **Scientific American Brasil**, v. 56, 2007. Disponível em: <http://www2.uol.com.br/sciam/reportagens/aplicacees_dos_animais_transgenicos.html>. Acesso em: 25 jan. 2010.

PESQUERO, J. B.; MAGALHÃES, L. E.; BAPTISTA, H. A.; SABATINI, R. A. Animais transgênicos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 27, p. 52-58, 2002.

POTRYKUS, I. Gene transfer to plants: assessment and perspectives. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 79, p. 125-134, 1990.

Rao, A. Q.; Bakhsh, A.; Kiani, S.; Shahzad, K; Shahid, A. A.; Husnain, T.; Riazuddin, S. The myth of plant transformation. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 753-763, 2009.

RECH, E. L.; ARAGÃO, F. J. L. Biolística. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI, 1998. p. 51-64.

RITCHIE, S. W.; HODGES, T. K. Cell culture and regeneration of transgenic plants. In: KUNG, S.; WU, R. (Ed.). **Transgenic plants**. San Diego: Academic Press, 1993.

v.1, p. 147-178.

SANFORD, J. C. Biolistic plant transformation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 79, p. 206-209, 1990.

SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. Dellivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. **Particulate Science Technology**, v. 5, p. 27-37, 1987.

SANTARÉM, E. R. Métodos eficientes para transformação genética de plantas. **Revista de Ciência e Tecnologia**, v. 15, p. 81-90, 2000.

SOUZA JÚNIOR, M. T.; VENTUROLLI, M. F.; COELHO, M. C. F.; RECH FILHO, E. L. Análise de sistemas gene marcador/agente seletivo alternativos para a seleção positiva de embriões somáticos transgênicos de mamoeiro. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Jaboticabal, v. 13, p. 365-372, 2001.

WIKIPEDIA. 2009. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/P%C3%A1gina_principal>. Acesso em: 19 out. 2009.

Bibliografia complementar

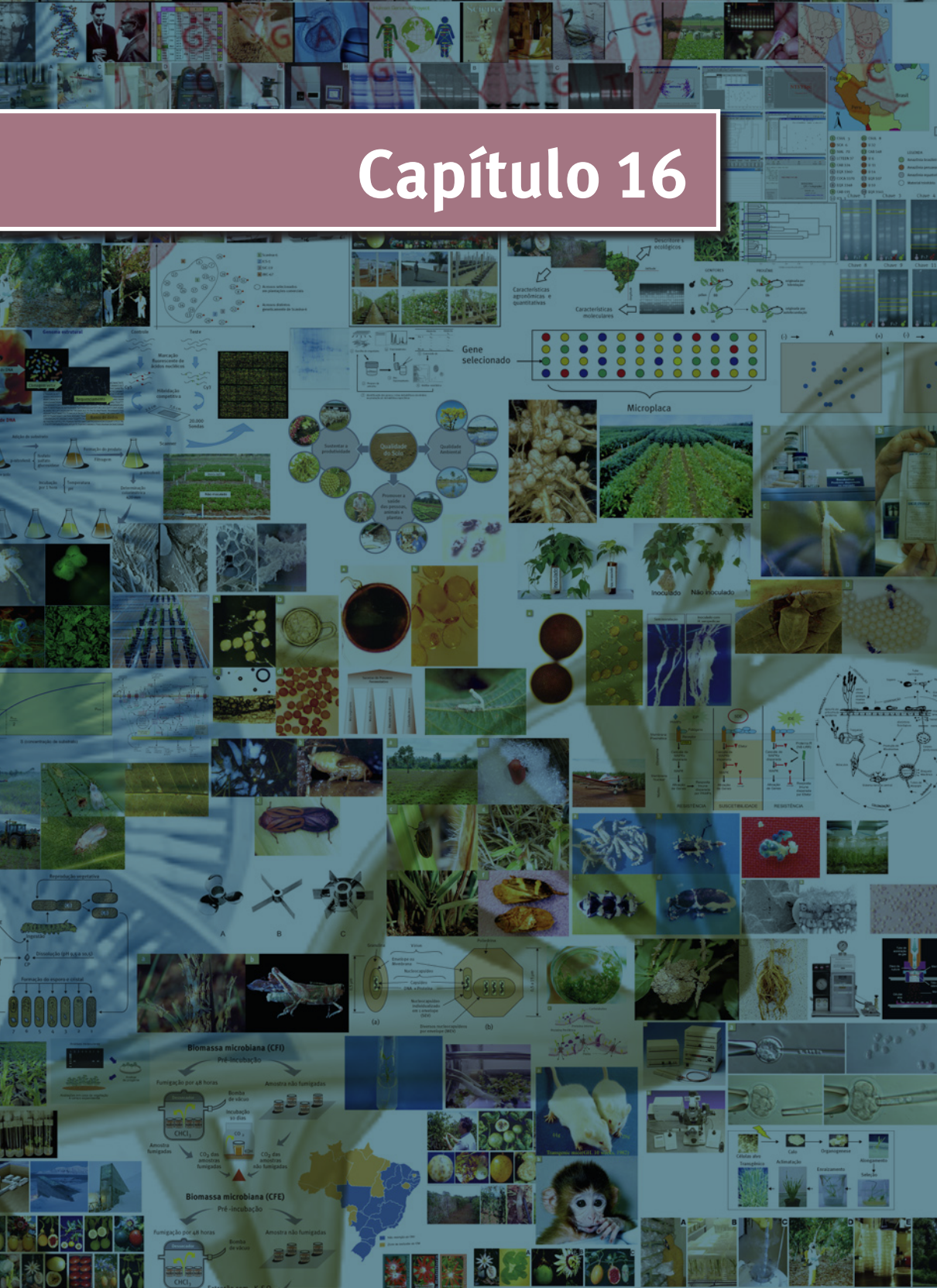
ANDRADE, S. R. M. **Transformação de plantas.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados 2003. 28 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 102).

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa SPI/Embrapa – Cenargen, 1998. 309 p.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. (Ed.). **Biotecnologia, transgênicos e biossegurança.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. 169 p.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília, DF: Embrapa SPI/Embrapa – CNPH, 1999. v. 2. 354 p.

Capítulo 16


Gene selecionado
Microplaca
Inoculado
Não inoculado
Biomassa microbiana (CFI)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas
Biomassa microbiana (CFE)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas

Biossegurança ambiental e alimentar de OGMs

Solange Rocha Monteiro de Andrade
Fábio Gelape Faleiro

Introdução

A preocupação com a biossegurança de organismos geneticamente modificados (OGMs) surgiu na década de 1970, após a divulgação dos primeiros trabalhos sobre a construção de genes (JACKSON et al., 1972) e a transferência de genes entre espécies diferentes via engenharia genética (COHEN et al., 1972). Nesse momento, acendeu o sinal de alerta na comunidade científica em relação às possibilidades ilimitadas que as novas ferramentas estavam trazendo e seus imprevisíveis impactos na saúde humana e ambiental. Assim, de maneira voluntária, houve mobilização da comunidade científica para estabelecer um sistema legal com fundamentação científica para normatizar os assuntos referentes à biossegurança (ANDRADE; FALEIRO; 2009a).

Resumidamente, a biossegurança de OGMs compreende as normas necessárias para minimizar os impactos das tecnologias geradas pela biotecnologia por meio de leis, procedimentos e diretivas discutidas mundialmente, porém aplicadas de modo específico em cada país. Essas normas e regulamentações são importantes para o desenvolvimento e utilização das técnicas de biotecnologia (FALEIRO; ANDRADE, 2009; JESUS et al., 2006).

Neste capítulo, são abordados aspectos históricos, conceituais e técnicos sobre a biossegurança de OGMs. Os principais riscos e análises de OGMs relacionados à biossegurança ambiental e alimentar são discutidos e exemplificados.

Um pouco da história da biossegurança

A biossegurança de OGMs surgiu juntamente com a engenharia genética, considerando as potencialidades da tecnologia na geração de produtos tecnológicos, mais os riscos ambientais e alimentares que

esses produtos poderiam apresentar. Para discutir esses riscos, foi realizado um primeiro encontro da comunidade científica em 1974, chamado de "Conferência de Asilomar sobre as Moléculas de DNA Recombinante". Nessa reunião, foram discutidos os critérios de segurança, principalmente barreiras biológicas e físicas, para os experimentos com OGMs, bem como os critérios éticos para regular esses experimentos, além de recomendações para o controle de descartes de material e padronização da metodologia. Esse foi o início de diversas discussões mundiais a respeito das regras de biossegurança, como fundamento básico para assegurar o avanço dos processos tecnológicos e proteger a saúde humana, animal e ambiental (ANDRADE; FALEIRO, 2009a; BERG, 2004).

Em 1992, na Convenção de Diversidade Biológica (CBD), que ficou conhecida como ECO-92, foi reconhecida a soberania de cada país sobre seus recursos genéticos. Também foi ratificado que deveria haver uma divisão justa e equitativa dos benefícios gerados pelo uso dos recursos genéticos (BRAUN, AMMAN, 2002; ANDRADE, FALEIRO; 2009a; MINARÉ, 2005). Na Carta da Terra, o Princípio 15, também conhecido como Princípio da Precaução, diz o seguinte: *"Com o fim de proteger o meio ambiente, o princípio da precaução deverá ser amplamente observado pelos Estados, de acordo com suas capacidades. Quando houver ameaça de danos graves ou irreversíveis, a ausência de certeza científica absoluta não será utilizada como razão para o adiamento de medidas economicamente viáveis para prevenir a degradação ambiental"*, traduzindo, "é melhor prevenir do que remediar" (UNITED NATIONS, 1992; BORÉM, 2005; ANDRADE; FALEIRO, 2009a).

Assim, a preocupação em manter o risco ambiental dentro de um grau de segurança aceitável levou a comunidade internacional a adotar o Princípio da Precaução como princípio ético orientador e jurídico motivador da ação humana. Nesses casos, os países devem seguir procedimentos para prevenir e evitar esses danos. Isto é, determinar o nível de risco aceitável por meio de avaliações científicas e políticas, caso a caso e por cada país (MINARÉ, 2005; BORÉM 2005; ANDRADE; FALEIRO, 2009a).

Em 2000, na Venezuela, foram estabelecidas as bases para a normatização internacional do desenvolvimento dos OGMs, principalmente no que tange à transferência desses organismos entre países,

bem como a manipulação e utilização dos mesmos. O Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança em Biotecnologia, como ficou conhecido, regulamenta a transferência, manipulação e uso de OGMs que podem ter efeito na biodiversidade e saúde humana e, fazendo referência explicita ao princípio da precaução, considera-o como princípio guia para transferência de OGMs em situações consideradas de potencial risco de redução ou perda da biodiversidade (UNEP, 2003). O protocolo foi ratificado por 103 países e está em vigor desde 11 de setembro de 2003. O Brasil ratificou sua participação em 24 de novembro de 2003, e o Protocolo passou a vigorar no país em 22 de fevereiro de 2004 (JESUS et al., 2006).

Com isso, diversas instituições internacionais discutiram e desenvolveram métodos para avaliação de riscos de Organismos Geneticamente Modificados referentes às avaliações dos possíveis impactos sobre a saúde humana, animal e ambiental (ILSI, 2001; IFT, 2000; FAO/WHO, 1996, 2000, 2001; WHO, 2000). Existem alguns Acordos Internacionais para a Regulamentação da Biossegurança que dão suporte a cada país para desenvolver OGMs, desde que respeitem esses acordos. Além da Carta da Terra e do Protocolo de Cartagena, também existem:

1) Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OECD): os países membros desenvolveram Documentos de Consenso que são utilizados como ferramentas técnicas para a tomada de decisões baseadas na avaliação de inocuidade de maneira científica.
2) Compromisso Internacional sobre Recursos Fitogenéticos da FAO: aprovado em Conferência da FAO, em 1983, é o primeiro documento que se refere à utilização de recursos fitogenéticos para agricultura e alimentação. Como instrumento de harmonização, tem o objetivo de "*garantir que os recursos fitogenéticos de interesse social e/ou econômico, particularmente para a agricultura, sejam explorados, preservados, avaliados e se tornem acessíveis para a criação de novas variedades e para a pesquisa*".
3) Codex Alimentarius: como a maior autoridade internacional em inocuidade alimentar, em 1989 decidiu avaliar as aplicações da biotecnologia ao sistema existente do Codex. O Codex atua em diversas áreas de avaliações, sendo que recentemente

foi criado um Grupo especial em Biotecnologia com o objetivo de estabelecer modelos de segurança de alimentos derivados da biotecnologia, e também regulamentar a rotulagem desses alimentos (JESUS et al., 2006).

Alguns conceitos importantes

Para facilitar a leitura, introduzimos abaixo alguns conceitos importantes que serão citados neste capítulo:

- **Análise de risco**: procedimento realizado para analisar a natureza e os efeitos adversos à saúde humana e animal ou ao ambiente. Consiste de três etapas: avaliação do risco, administração do risco e comunicação do risco.
- **Avaliação de risco**: combinação de procedimentos ou métodos, por meio dos quais se avaliam, caso a caso, os potenciais efeitos da liberação planejada do OGM e seus derivados sobre o ambiente e a saúde humana e animal.
- **Biossegurança**: matéria que estuda os riscos potenciais da biotecnologia para a saúde humana e animal, bem como para o ambiente. Às Comissões de Biossegurança compete regulamentar e monitorar esses riscos.
- **Contenção**: em Biossegurança, conjunto de medidas e protocolos aplicados para minimizar o risco de organismos geneticamente modificados ao ambiente ou à saúde humana e animal.
- **Derivado de OGM de origem vegetal**: produto obtido de OGM de origem vegetal e que não possua capacidade autônoma de replicação ou que não contenha forma viável de OGM.
- **Fluxo gênico horizontal**: quando a troca de informação genética se dá entre indivíduos de espécies diferentes, distantes geneticamente.
- **Fluxo gênico vertical**: quando a passagem da informação genética ocorre entre indivíduos da mesma espécie, produzindo descendentes férteis e viáveis.
- **Liberação controlada**: no contexto da Biotecnologia, a liberação intencional de organismos geneticamente modificados no meio ambiente.

- **Liberação planejada**: liberação no meio ambiente de OGM de origem vegetal ou seus derivados, para avaliações experimentais sob monitoramento, de acordo com as disposições da Resolução Normativa nº 6, de 6 de novembro de 2008.
- **Organismo Geneticamente Modificado de origem vegetal**: vegetal cujo material genético (ADN/ARN) tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética.
- **Perigo:** agente nocivo capaz de causar algum efeito adverso.
- **Poluição genética**: dispersão descontrolada de genes para espécies ou indivíduos nos quais esses genes não estavam presentes. Conceito associado a escape gênico a partir de OGMs.
- **Princípio da precaução**: estratégia pela qual qualquer possível risco associado com a introdução de uma tecnologia nova é evitado, até a completa compreensão do seu efeito à saúde e ao ambiente.
- **Protocolo de biossegurança**: conjunto de procedimentos aceitos internacionalmente para proteger a saúde humana e animal e o ambiente de potenciais riscos do uso da biotecnologia e de seus produtos; Protocolo de Cartagena.
- **Requerente**: qualquer pessoa jurídica com Certificado de Qualidade em Biossegurança – CQB que se proponha a efetuar liberação planejada, de acordo com a Resolução Normativa nº 6, de 6 de novembro de 2008.
- **Responsável Legal**: indivíduo sobre o qual recai a responsabilidade pela condução da liberação planejada, conforme as normas da CTNBio.
- **Risco**: probabilidade de ocorrência de efeito adverso.
- **Segurança alimentar**: significa garantir, a todos, condições de acesso a alimentos básicos de qualidade, em quantidade suficiente, de modo permanente e sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, com base em práticas alimentares saudáveis, contribuindo, assim, para uma existência digna, em um contexto de desenvolvimento integral da pessoa humana (Conselho de Informações Sobre Biotecnologia; Comissão Técnica Nacional de Biossegurança).

Análise de risco

A análise de risco é um processo reproduzível que envolve várias etapas de avaliação prévia visando à obtenção de resultados com um nível aceitável de incerteza, pois a certeza absoluta ou risco zero em uma avaliação de segurança nunca é possível. Assim, a incerteza é um aspecto incontornável de todos os processos de avaliação e gestão de riscos, sendo que o nível de incerteza aceitável depende de fatores sociais, econômicos e políticos. O processo geralmente consiste de um conjunto prescrito e pré-planejado de avaliações de risco de dados e de recursos. Por exemplo, quando certo potencial de efeito adverso é considerado em uma avaliação de risco, é necessário apresentar uma descrição do cenário aceitável dentro de uma cadeia causal de eventos por meio da qual o efeito específico pode ocorrer, bem como uma avaliação do estado de conhecimento sobre a plausibilidade de cada etapa acontecer, e, finalmente, uma decisão sobre a aceitabilidade das consequências (CRAIG et al., 2008).

A análise de risco de OGMs é composta das seguintes etapas: (i) a avaliação do risco; (ii) o gerenciamento do risco; e (iii) a comunicação do risco (LAJOLO; NUTTI, 2003). Essa análise é baseada em metodologias científicas que buscam a sistematização das informações sobre um determinado perigo e auxiliam no processo de avaliação de risco e na adoção de medidas para minimizá-lo ou eliminá-lo (LAJOLO; NUTTI, 2003). Ela é realizada tanto para biossegurança ambiental quanto alimentar.

O processo se inicia com a identificação do possível efeito adverso ou perigo que o OGM possa causar ao ambiente ou à saúde animal e humana, seguido das consequências potenciais e, por fim, da determinação da probabilidade que isso ocorra. O risco dessa característica específica do OGM pode então ser estimado, e, assim, subsidiar a tomada de decisões necessárias para evitá-lo ou minimizá-lo (CRAIG et al., 2008).

Biossegurança ambiental de OGMs

Nos anos 1980, existia um consenso de que, com a liberação de organismos transgênicos, havia um risco potencial ao ambiente.

Considerando que estão sendo produzidos animais, vegetais e microrganismos transgênicos expressando genes com diferentes características, desde agronômicas, passando por ornamentais até medicinais, a liberação desses organismos no ambiente requeria cautela e cuidados de avaliação de risco. As avaliações risco deveriam ser realizadas caso a caso, considerando o transgene, o organismo receptor, a intenção de liberação no ambiente, a frequência e escala da introdução. Essa discussão envolveu ecologistas, biólogos, epidemiologistas, geneticistas e outros (ANDOW; ZWAHLEN, 2006; JESUS et al., 2006; ANDRADE; FALEIRO, 2009b).

Desde 1990, vêm ocorrendo graduais, porém substanciais, alterações no processo de avaliação de risco de liberação de um organismo transgênico no ambiente. As avaliações de risco atualmente seguem quatro etapas: (i) identificação do perigo; (ii) avaliação da exposição ao perigo; (iii) avaliação dos possíveis efeitos da exposição e (iv) caracterização do risco. Essas quatro etapas providenciaram uma estrutura conveniente para relacionar os avanços científicos dos anos 1990 e os possíveis riscos ao ambiente (ANDOW; ZWAHLEN, 2006).

Segundo Craig e colaboradores (2008), dois tipos de riscos podem ocorrer em consequência da liberação de OGMs no ambiente: (1) efeitos inesperados na população-alvo, como, por exemplo, a evolução da resistência em pragas-alvo/populações do patógeno quando o transgene confere resistência a uma praga ou patógeno; e (2) efeitos inesperados, em populações não-alvo, por exemplo, alterações na biodiversidade local associada direta ou indiretamente com a planta transgênica, ou aqueles associados com a integração e posterior expressão do transgene individual em um organismo diferente (fluxo gênico).

Quando se considera o risco ambiental, as ferramentas utilizadas devem ser capazes de avaliar as características agronômicas do transgênico, sua estabilidade no ambiente, as características ecológicas do ambiente no qual ele será inserido, incluindo os possíveis efeitos não intencionais resultantes da inserção do gene, e o risco potencial ao ambiente, podendo utilizar, caso necessário, o Princípio da precaução. (ANDRADE; FALEIRO, 2009b).

As avaliações ocorrem caso a caso e, no momento, as preocupações sobre o impacto de OGMs no ambiente se referem principalmente às plantas que contêm as tecnologias Bt (resistência a insetos) e HT (tole-

rância a herbicidas). Esses materiais tiveram grande aceitação pelos produtores desde o início e têm sido largamente utilizados (Figura 1). As plantas expressando tolerância a herbicida são as mais utilizadas, respondendo por 63% da área de produção biotecnológica, seguidas das plantas contendo os genes combinando ambas as características, com 22%, e, por fim, plantas expressando somente resistência a insetos, com 15% (JAMES, 2008).

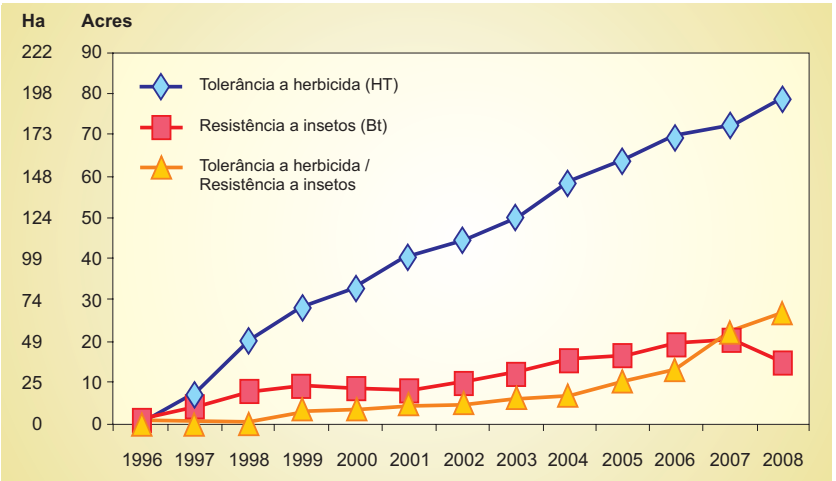


Figura 1. Área global de produção de culturas biotecnológicas de 1996 a 2008: trato cultural (milhões hectares, milhões acres).
Fonte: adaptado de James, 2008.

Segundo Carpenter e colaboradores (2002), são nove as principais considerações a respeito dos possíveis impactos ambientais das lavouras de soja, milho e algodão transgênicos: (a) risco da variedade cultivada ou silvestre "transformada" tornar-se uma espécie daninha invasora; (b) desenvolvimento de resistência pelo uso maciço da tecnologia; (c) possibilidade de escape gênico (transferência vertical e horizontal); (d) alterações na população de pragas e plantas daninhas; (e) efeito adverso sobre espécies não-alvo e benéficas; (f) impactos nos sistemas de produção vegetal; (g) alteração no padrão de uso de pesticidas; (h) manejo e conservação do solo; e (i) impactos sobre a saúde humana.

Já Sanvido e colaboradores (2006) consideram que os efeitos dos transgênicos no ambiente podem ser divididos em diretos ou indiretos. O efeito direto é aquele resultante da ação do transgene, isto é, da consequência da transformação genética no genótipo e fenótipo do organismo modificado. Os efeitos indiretos seriam decorrência de efeitos em organismos que não eram alvos iniciais do organismo transgênico (Figura 2).

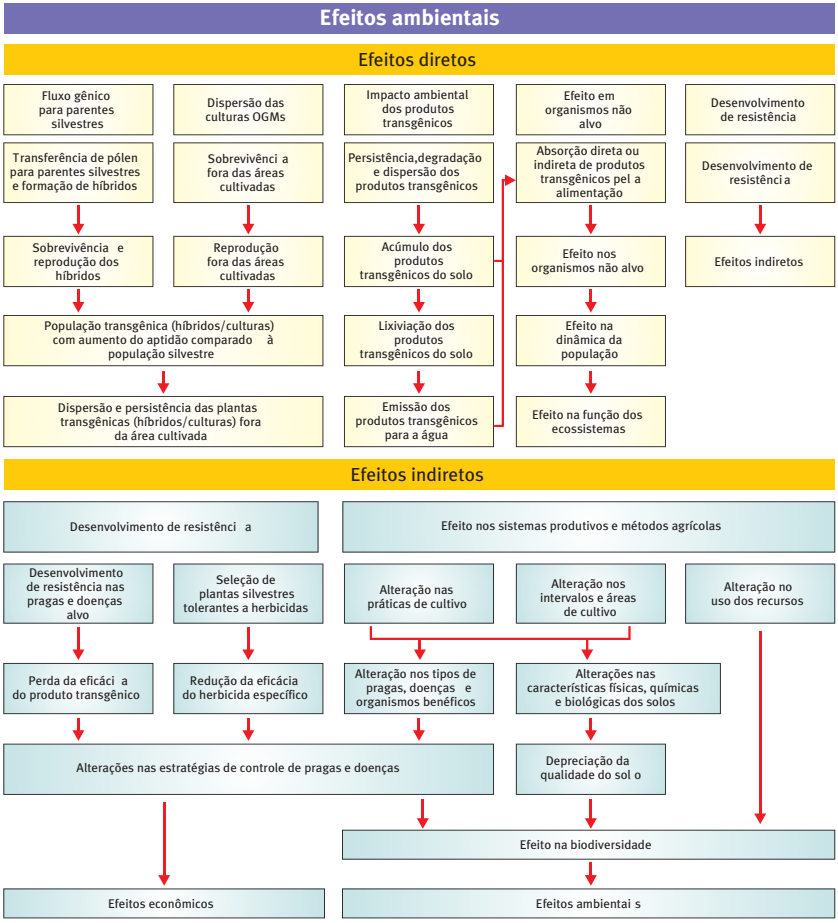


Figura 2. Efeitos potenciais diretos e indiretos dos organismos geneticamente modificados no ambiente.

Fonte: adaptado de Sanvido et al., 2006

A seguir, discutiremos alguns pontos-chave desse impacto potencial dos OGMs ao ambiente.

Fluxo gênico e recombinação

O fluxo gênico ou introgressão é a transferência de um gene ou genes de uma planta doadora para outra sexualmente compatível e genotipicamente diferente por meio da polinização, seguida de cruzamentos entre o híbrido dentro da população até a estabilidade do gene na população. Essa introgressão pode ocorrer entre espécies, variedades ou biótipos diferentes, desde que sejam compatíveis sexualmente. É um processo natural que ocorre desde o início da agricultura, no entanto o advento da transgenia suscitou preocupações adicionais, pois o fluxo entre a planta transformada geneticamente e as espécies silvestres, ou mesmo as cultivares convencionais, poderia trazer alguma vantagem seletiva ou contaminar uma produção não transgênica (ANDRADE; FALEIRO; 2009b; SILVA et al., 2007).

No entanto, o fluxo gênico vai ocorrer se as plantas doadoras e receptoras crescerem perto o suficiente para haver a troca de pólen, pois, embora o pólen possa viajar longas distâncias, seja por meio do vento, insetos ou por outros animais polinizadores, sua viabilidade decresce com o tempo e as condições ambientais. Além disso, para ocorrer o fluxo gênico, é necessário que ambas as espécies/variedades estejam na época de floração e os estigmas estejam receptivos para o pólen (CERDEIRA; DUKE; 2006; ANDRADE; FALEIRO, 2009b).

Segundo Sanvido e colaboradores (2006), existe um consenso dentro da comunidade científica de que pode haver fluxo gênico entre as variedades transgênicas e as espécies selvagens compatíveis sexualmente. Estudos no Canadá com canola demonstraram essa hipótese, porém também verificaram que o fluxo gênico ocorre na mesma proporção apresentada pelas cultivares não transgênicas. A inquietação que surge é saber se esse transgene poderia causar um impacto relevante na população selvagem. No caso da canola resistente a herbicida, cultivada há anos no Canadá, não foram encontradas evidências de que esse cultivo tenha espalhado resistência na população selvagem de canola. No caso específico de resistência a herbicidas, não é esperado que a introgressão dessa característica confira algum benefício

de seleção, pois dificilmente esses genes teriam características seletivas dentro do ambiente natural. No entanto, a resistência a insetos poderia aumentar a adaptação às pragas naturais da população selvagem. Entretanto, em ambientes naturais, após mais de 10 anos de plantio de OGMs, não foi observado nem a introgressão expressiva dentro das espécies silvestres compatíveis, nem a extinção de espécies selvagens pela introgressão de resistência de transgenes dentro da população (SANVIDO et al., 2006; ANDRADE; FALEIRO; 2009b).

Independente de o fluxo gênico causar ou não uma vantagem seletiva para espécies silvestres, pesquisas têm sido realizadas no sentido de desenvolver mecanismos para impedir ou minimizar esse risco. São elas: (i) a restrição geográfica dos cultivos transgênicos; (ii) a construção de plantas transgênicas com genes letais ativados por um agente químico ou pelo ambiente para evitar a dispersão de transgenes (terminator); (iii) a transformação de organelas (mitocôndrias e cloroplastos) ou de linhagens macho-estéreis; (iv) o desenvolvimento de bionanomoléculas que permitem o biomonitoramento *in vivo* do fluxo gênico em tempo real; e (v) o manejo para coexistência entre cultivos transgênicos e não transgênicos (SILVA et al., 2007; CHAPMAN; BURKE; 2006). Muitas dessas tecnologias ainda estão em estudo, entre elas, as bionanomoléculas e a transformação de organelas e linhas macho-estéreis; outras causam muita controvérsia, como o uso de genes terminadores, ou suicidas. No entanto, algumas já estão em uso e apresentando bons resultados, permitindo, em alguns casos, a liberação de OGMs para plantios comerciais no Brasil e no mundo, os quais serão discutidos abaixo.

Algodão resistente a inseto

No Brasil podem ser encontradas três espécies de algodão: *Gossypium hirsutum* L., *Gossypium barbadense* L. e *Gossypium mustelinum* Miers ex Watt. Todas são sexualmente compatíveis e os cruzamentos são mediados por insetos polinizadores. A introdução de cultivares transgênicas, resistentes a insetos, trouxe preocupações, pois o fluxo gênico a partir de cultivares transgênicas, assim como convencionais, pode afetar a estrutura genética das demais populações. Além disso, o algodão não apresenta barreiras sexuais completas, ou

seja, pode haver cruzamento entre diferentes espécies de um mesmo gênero. Assim, o isolamento geográfico entre cultivares e as populações que se deseja proteger pode ser utilizado para reduzir a probabilidade de cruzamentos. Nos Estados Unidos e na Austrália, essa estratégia foi adotada para evitar a ocorrência de fluxo gênico entre populações transgênicas e selvagens. Nos EUA, apenas *G. tormentosum,* uma planta daninha, é compatível com *G. hirsutum*, porém só cresce no Havaí. Existem populações de *G. hirsutum* na Flórida, Ilhas Virgínia e Porto Rico, e *G. barbadense*, em Porto Rico. Assim, por medidas de precaução, essas são áreas de restrição para o plantio de algodão transgênico experimental ou comercial (WOZNIACK, 2002; BARROSO et al., 2005).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) definiu as áreas de exclusão de algodão transgênico, na Portaria 21 de 2005. Essa portaria foi baseada no Comunicado Técnico 242 da Embrapa (BARROSO et al., 2005), e nos Pareceres Técnicos Prévios Conclusivos nº 480, de 2004, e nº 513, de 2005, da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Esses estudos levaram em consideração a distribuição das espécies de *Gossypium*, a importância biológica das populações e o zoneamento agrícola. Com base nessas informações, foram identificadas quatro grandes áreas que compõem a zona de exclusão (Figura 3). Nas zonas de exclusão, além da proibição do plantio de algodoeiros transgênicos, também deverá ser impedida a circulação de sementes, grãos, algodão em caroço e outras partes propagativas, salvo exceções analisadas pela autoridade competente (BARROSO et al., 2005).

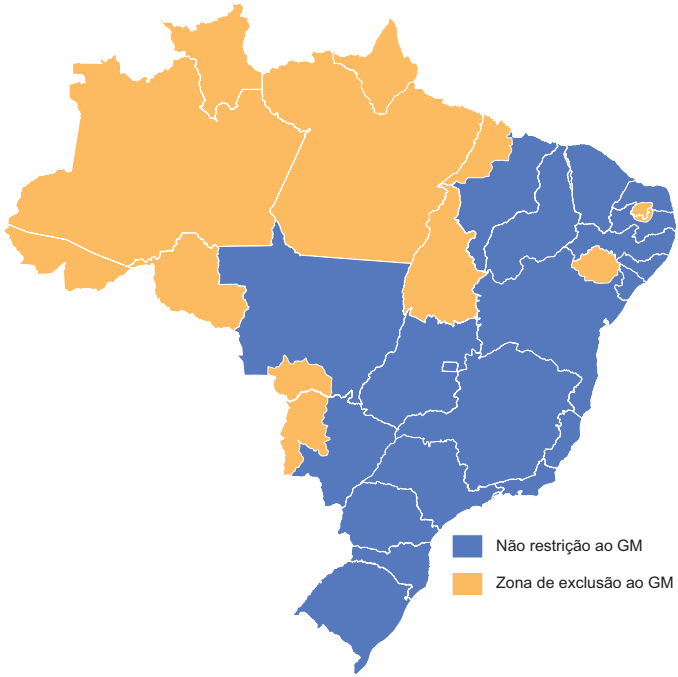


Figura 3. Localização das áreas propostas como zonas de exclusão para o plantio de cultivares de algodoeiro geneticamente modificado no Brasil.

Fonte: Barroso et al., 2005.

Além desses cuidados, o CTNBio, no Comunicado 04 de 24 de junho de 2008, visando a aumentar a segurança, determinou, para pesquisa, as seguintes condições de isolamento para concessão de autorização de liberação planejada no meio ambiente de algodoeiro geneticamente modificado:

a) Manter distância mínima de 800 m de quaisquer outras espécies de algodoeiro caso haja algodoeiros silvestres ou variedades locais nas proximidades.
b) Manter distância mínima de 250 m de qualquer algodoeiro e implantar bordaduras de contenção de trinta linhas de algodoeiro convencional e de dez linhas de milho ao redor das parcelas experimentais na ausência de plantas silvestres ou variedades locais.

As bordaduras são barreiras físicas que visam diminuir a possibilidade de o grão de pólen alcançar uma cultivar convencional ou um indivíduo da população silvestre. No entanto, nos EUA, o USDA-APHIS demanda uma distância de isolamento de 12 m entre o cultivar de algodão transgênico e os cultivares não transgênicos e espécies selvagens (MÜNSTER; WIECZOREK, 2007). Estudos demonstraram existir 1% de polinização cruzada nas linhas com 7 m de distância do plantio transgênico, e abaixo de 1% a 25 m (UMBECK et al., 1991).

Soja tolerante a herbicida

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, e, como no resto do mundo, a soja resistente a herbicida teve ótima aceitação pelos produtores. Essa rápida adoção e crescimento do plantio trouxeram questionamentos sobre a possibilidade da coexistência entre a soja transgênica e não transgênica, principalmente a orgânica. Existiam dúvidas sobre a possibilidade de haver fluxo gênico das cultivares transgênicas para as demais, gerando contaminação dos diversos sistemas de produção de soja (ANDRADE; FALEIRO; 2009b).

A soja é uma planta autógama, isto é, reproduz-se preferencialmente por autofecundação, apresentando um mecanismo chamado de cleistogamia, no qual a fecundação ocorre antes da abertura da flor. Apesar desse mecanismo, pode ocorrer a polinização cruzada em soja, a qual está em torno de 1%, podendo chegar a 2,5% em algumas cultivares. Em razão dessa característica, nos EUA, as Agências Reguladoras não exigem distância mínima para o plantio de soja transgênica e não transgênica, devido ao baixo índice de transferência de genes entre as cultivares (CARPENTER et al., 2002). Até o momento, não foram verificados ou comprovados maiores problemas com a ocorrência de fecundação cruzada entre a soja geneticamente modificada e a soja não transgênica nos plantios comerciais do Brasil e do mundo.

No Brasil, não existe exigência mínima para o plantio comercial de soja. Entretanto, a Lei nº 11.460, de 21 de março de 2007, estabelece que a distância mínima de plantio de OGMs será estabelecida caso a caso, e está proibido o plantio de qualquer OGM em áreas indígenas e unidades de conservação, exceto em áreas de proteção ambiental

(APA) com plano de manejo para regulamentar o plantio do OGM. Assim, o plantio comercial ou para pesquisa da soja transgênica deve seguir essa regulamentação.

Pesquisadores da Embrapa realizaram estudos para avaliar o fluxo gênico da soja transgênica e demonstraram que a maior frequência de disseminação de pólen transgênico foi de 0,45%, nas linhas com 0,5 m distância do cultivo transgênico (ABUD et al., 2003). Essa frequência foi reduzida para no máximo 0,14% na distância de 1 m, atingindo 0% aos 6,5 m do cultivo transgênico (Figura 4). Esses resultados foram corroborados em um novo experimento realizado na região do Cerrado, o qual demonstrou que a polinização cruzada em soja tende a zero em distâncias maiores que 8 m. Assim, os autores sugeriram uma distância de isolamento de 10 m para garantir a pureza das sementes (ABUD et al., 2007).

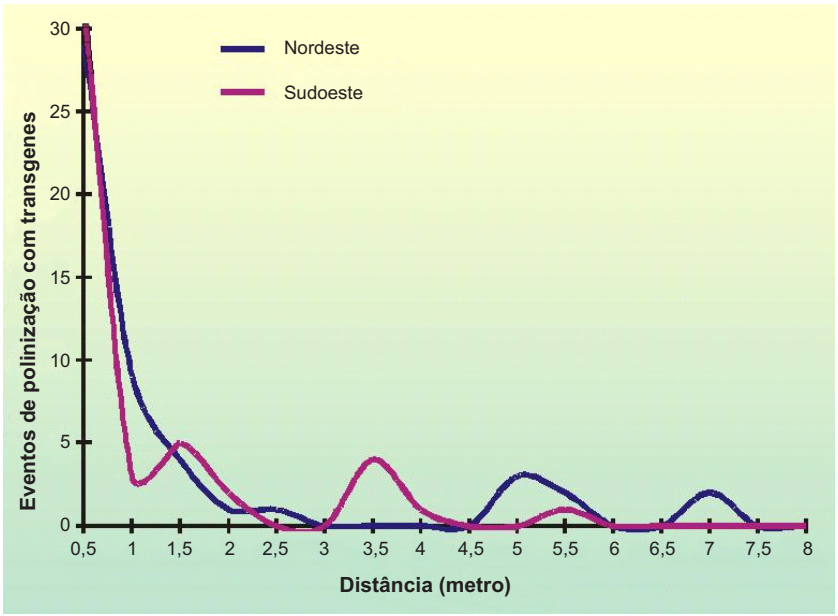


Figura 4. Distribuição dos eventos de fecundação entre plantas transgênicas da parcela central e não transgênicas na direção nordeste e sudoeste.

Fonte: adaptado de Abud et al., 2003.

Milho resistente a insetos

O problema do fluxo gênico é maior em plantas alógamas, ou seja, que apresentam fecundação cruzada, como no caso do milho. No Brasil, houve muita controvérsia principalmente a esse respeito desde que a empresa Monsanto entrou na CTNBio, em 1999, com um pedido para a liberação comercial do plantio do milho resistente a insetos da ordem lepidóptera (Milho Gardian, MON810). O parecer técnico conclusivo favorável ao plantio comercial só foi publicado em 2007. No Parecer Técnico Nº 1.100/2007 de 16 de agosto de 2007, a CTNBio se refere da seguinte maneira ao fluxo gênico:

> "*Estudos sobre dispersão de pólen de milho têm sido conduzidos, sendo que alguns deles mostram que o pólen de milho pode deslocar-se a longas distâncias. Porém, a maioria do pólen liberado é depositada próxima à cultura, com taxa de translocação muito baixa fora da cultura fonte. O agente de polinização predominante no milho é o vento e a distância que o pólen viável pode percorrer depende dos padrões de vento, umidade e temperatura... Os resultados indicam que a viabilidade do pólen é mantida por 2 h e que a polinização cruzada não foi observada em distâncias de 300 metros da fonte de pólen. Comparando-se as concentrações a 1 m da cultura fonte sob ventos baixos a moderados estimou-se que, aproximadamente, 2% de pólen são anotados a 60 m, 1,1% a 200 m e 0,75-0,5% a 500 m de distância. A 10 m de um campo, em média, o número de grãos de pólen por unidade de área é dez vezes menor que o observado a 1 m da borda. Portanto, se as distâncias estabelecidas de separação desenvolvidas para produção de sementes de milho são observadas, espera-se que a transferência de pólen às variedades adjacentes seja minimizada, sendo improvável a presença de materiais genéticos com resistência a insetos*" (CTNBio).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama) entraram com recurso no Conselho Nacional de Biossegurança (CMBS) contestando o parecer da CTNBio. No entanto, na Reso-

lução CBSN nº 3, de março de 2008, considerou-se improcedente o recurso impetrado e ratificou-se o parecer 1.100/2007 da CTNBio.

Por fim, para regulamentar os plantios comerciais, a CTNBio, na Resolução Normativa nº 4 de 16 de agosto de 2007, estabelece que, para haver a coexistência de plantios comerciais de milho transgênicos e não transgênicos, o agricultor deve respeitar a distância mínima de 100 m entre os plantios. Também existe a possibilidade de uma distância de 20 m, desde que haja uma bordadura de no mínino 10 m de milho convencional de porte e ciclo vegetativo similar ao geneticamente modificado. Em relação a estudos experimentais em campo, o Comunicado 01, de 9 de agosto de 2006, determinou que

> *"as instituições ou entidades interessadas em obter autorização de liberação planejada no meio ambiente de milho geneticamente modificado deverão adotar, pelo menos, uma das duas alternativas abaixo estipuladas:*
>
> *a) Isolamento espacial: estabelecer bordadura de contenção com dez linhas de milho não geneticamente modificado ao redor das parcelas experimentais e manter distância de 400 metros de outros plantios com milho.*
> *b) Isolamento temporal: estabelecer bordadura de contenção com vinte linhas de milho não geneticamente modificado ao redor das parcelas experimentais, mantendo distância de 10 metros de outros plantios de milho, e respeitar período mínimo de 40 dias entre datas de florescimento de outros plantios de milho.*
>
> *Nos casos de cultivo de variedades crioulas de milho nas proximidades da área experimental, as instituições ou entidades interessadas deverão estabelecer, ao redor das parcelas experimentais, bordadura de contenção com dez linhas de milho não geneticamente modificado, manter distância de 400 metros de outros plantios com milho (isolamento espacial) e respeitar período mínimo de 40 dias entre datas de florescimento de outros plantios de milho (isolamento temporal)"* (CTNBio, Comunicado 21, 2006).

Nos EUA, Goggi e colaboradores (2006) realizaram um experimento para determinar o potencial de fluxo gênico de um campo de produção transgênico quando rodeado por campos de produção convencional (não transgênicos), em duas safras 2003 e 2004. Os resultados demonstraram que a percentagem de polinização cruzada entre variedades de milho transgênicas e não transgênicas decresciam exponencialmente em distâncias de 1 m, 10 m, 35 m, 100 m, 150 m, 200 m e 250 m, chegando a 0,05% a 100 m e 0,002% a 250 m. No entanto, houve variação da frequência de polinização em função dos anos de plantio e não houve zero por cento de polinização mesmo a 250 m. Os autores sugerem que, para haver coexistência entre transgênicos e não transgênicos, é necessário haver uma separação temporal de semeadura ou o plantio de uma barreira de não transgênico com alta densidade de produção de pólen ao redor do cultivo transgênico.

Luna e colaboradores (2001) avaliaram a duração da viabilidade do pólen e a distância efetiva de isolamento em estudos realizados no México. Os resultados demonstraram que a polinização cruzada ocorre a uma distância máxima de 200 m e nenhuma polinização cruzada aconteceu em distâncias iguais ou superiores a 300 m em relação às fontes de pólen. Também demonstraram que, nas condições de potencial hídrico atmosférico, o pólen perdia sua viabilidade pós 2 horas de coleta. Esses resultados são importantes, pois o México é o centro de origem de várias espécies de milho e relativos, e existem muita discussão e dúvidas a respeito do fluxo gênico das cultivares transgênicas para as espécies nativas e crioulas do país (DALTON, 2008).

No Brasil, entende-se que o fluxo gênico só ocorrerá dentro da mesma espécie independente de ser crioula ou cultivada, pois aqui não ocorrem outras espécies que cruzam com o milho. Assim, a Embrapa considera que é possível a coexistência entre as variedades Bt e não transgênicas, desde que seja mantido um espaçamento espacial e temporal. A Embrapa também sugere a criação de zonas de exclusão para aumentar as possibilidades da coexistência de milho transgênico e não transgênico (EMBRAPA, 2006).

Efeito em espécies não alvo e benéficas

O efeito de plantas transgênicas sobre espécies não-alvo tem sido bastante debatido, existindo uma controvérsia sobre se devemos avaliar o efeito no ecossistema ou apenas selecionar algumas espécies-chave ou indicadoras (ARPAIA et al., 2007). Espécies não-alvo são definidas como as espécies que não são propósito direto do uso de um pesticida particular (SANVIDO et al., 2006). Assim, um grupo de estudos formado por 403 pesquisadores de diferentes instituições, formações e países desenvolveu um projeto visando definir as diretrizes de como realizar uma análise de risco referente ao efeito de OGMs sobre o ambiente (GMO-ERA, 2008). Esse estudo ocorreu em duas fases de 2002 a 2007, e, para avaliações de risco sobre espécies não-alvo, foi proposta uma metodologia em quatro etapas (Figura 5).

Existem muitas espécies com potencial de serem afetadas pelos OGMs. Em razão disso, era essencial avaliar, ranquear e selecionar as espécies e os processos ecológicos para identificar os mais afetados pelo OGM para futura análise de risco. As quatro etapas da metodologia de análise de risco de OGMs em espécies não alvo ilustrado na Figura 5 são explicadas abaixo:

1ª Etapa – Identificação dos grupos ecológicos funcionais: espécies e processos ecológicos podem ser divididos em grupos ecológicos e funcionais que são relacionados a possíveis danos ambientais. Grupos de alta prioridade podem ser identificados e selecionados, por exemplo, predadores, polinizadores e decompositores.

2ª Etapa – Associação com a cultura-alvo e significância: ranquear em importância todas as espécies relevantes associadas ao OGM dentro de cada grupo funcional selecionado na 1ª etapa e avaliar:

- Qual o grau de associação entre a espécie ou processo ecológico e o OGM? Caso a espécie ou processo seja afetado negativamente, qual o grau de significância das consequências negativas; caso a espécies seja benéfica, poderia se tornar praga futura ou causar problemas na saúde do produtor?

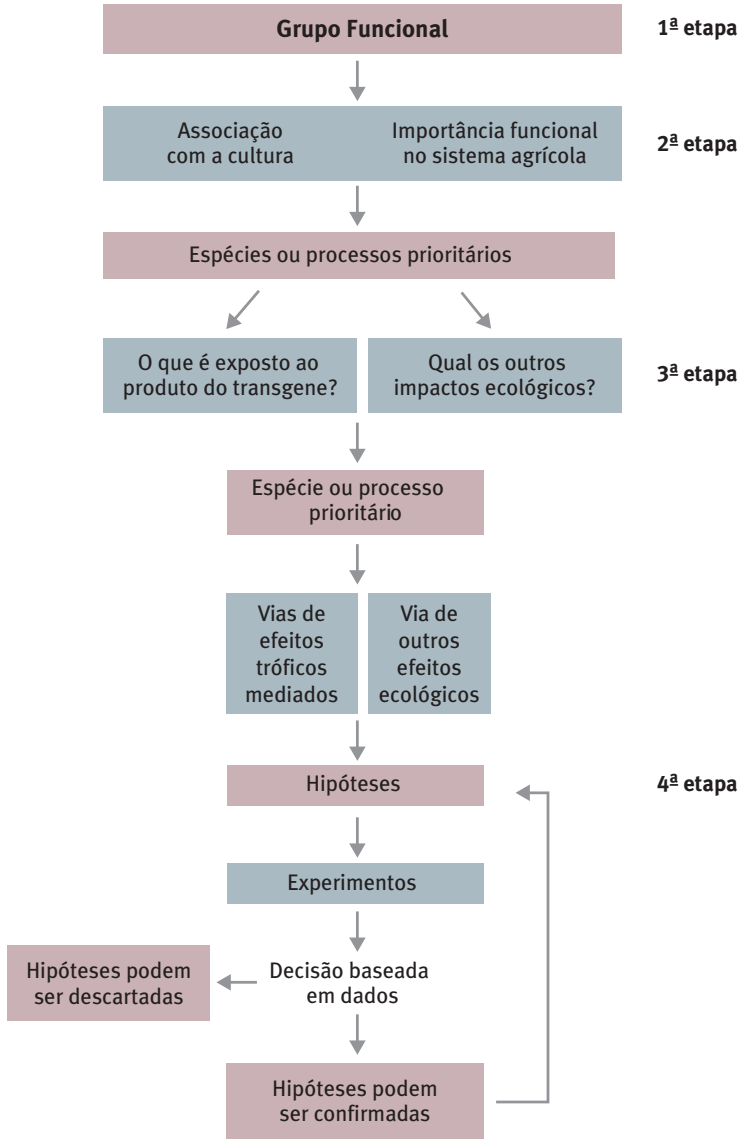


Figura 5. Metodologia de análise de risco do efeito de um OGM sobre espécies não-alvo.

Fonte: adaptado de GMO-ERA, 2008..

3ª Etapa – Vias de exposição e de efeitos adversos: avaliação preliminar e hipóteses de risco: (i) para espécies e processos ecológicos mantidos na etapa 2, avaliar quão próximo é o contato entre eles e o produto do OGM; (ii) na ocorrência de exposição, quais são os possíveis impactos negativos, incluindo impactos devido à alteração do manejo da cultura; e (iii) elaboração da hipótese de risco das vias de exposição e efeitos adversos, priorização baseada na probabilidade, reversibilidade, escala espacial e magnitude.

Essas etapas analisam e sintetizam a informação existente, utilizando o conhecimento local. Isso ajuda a identificar e priorizar falhas de conhecimento chaves na biodiversidade da região ou país de estudo.

4ª Etapa – Espécies e processos prioritários podem ser testados para avaliar o efeito real. É importante utilizar métodos que são relevantes ao ambiente local (GMO-ERA, 2008).

As principais preocupações do efeito de OGMs em espécies não-alvo são referentes às cultivares Bt. A resistência a insetos, característica introduzida nas plantas Bt, é expressa pelas proteínas Cry do *Bacillus thuringiensis* (Bt), e tem como alvo lagartas da ordem lepidóptera. No entanto, existem algumas dúvidas se o uso indiscriminado e prolongado de cultivares Bt poderia afetar direta ou indiretamente espécies não-alvo, principalmente inimigos naturais das pragas. Porém, no caso específico de toxidez de organismos não-alvo, é necessária a ingestão da proteína expressa pelas plantas Bt, seja pela alimentação com amostras das plantas Bt, seja pela ingestão de insetos-alvo ou de resíduos vegetais (SANVIDO et al., 2006; ANDRADE; FALEIRO, 2009b).

Segundo Frizza e Oliveira (2006), os potenciais efeitos diretos das cultivares Bt na dinâmica populacional das pragas dependem de diversos fatores, como, por exemplo: (i) o nível de resistência da planta; (ii) a especificidade da proteína expressa; (iii) em quais tecidos o transgene é expresso e por quanto tempo; (iv) a presença de outras plantas suscetíveis próximas e (v) o manejo da cultura. Além dos efeitos diretos sobre a biologia e comportamento do inimigo natural devido à expressão de substâncias químicas, existem os efeitos indiretos, ou seja, efeito da planta sobre o inimigo natural da praga, ou seja, sobre espécies não-alvo (FRIZZAS; OLIVEIRA; 2006).

Resultados de vários estudos realizados nos últimos anos não demonstraram evidências de efeitos provenientes da toxidez direta da proteína Cry, expressa em plantas Bt sobre os inimigos naturais não-alvo em campos experimentais (SANVIDO et al., 2006). Segundo os autores, existem mais evidências de que as plantas Bt são mais alvo específico e apresentam menor efeito colateral sobre espécies não-alvo que os inseticidas utilizados atualmente (SANVIDO et al., 2006). Efeitos indiretos sobre os inimigos naturais (predadores) nos plantios de milho Bt ocorreram pela diminuição da disponibilidade dos herbívoros alvos da tecnologia. No entanto, a maioria dos predadores naturais se alimenta de várias espécies, e, no campo, buscam outras espécies para se alimentarem quando há uma diminuição de uma espécie particular. Assim, a ocorrência de efeito indireto não está somente relacionada ao plantio do OGM, mas a qualquer manejo para controle da praga, pois todos reduzem a disponibilidade dos insetos-alvo e consequentemente afetam a população de inimigos naturais.

O parecer técnico do CTNBio referente ao Milho Bt (MON810), com base em estudos realizados no departamento de Entomologia da Esalq, concluiu que:

1) *"A proteína é tóxica somente para os insetos-alvo citados, especificamente para lepidópteros (lagartas) que possuem, exclusivamente, em seus intestinos, receptores específicos para essa proteína. Os mamíferos não possuem esses receptores ou sítios de ligação e, portanto, os seres humanos, os animais e outros organismos não-alvo não são afetados pela proteína Bt, incluindo outros artrópodes e também inimigos naturais das pragas-alvo"...*
2) "*Estudos de campo realizados no Brasil, sobre as populações de insetos presentes em plantações de milho transgênico derivado da linhagem MON810, mostraram que a presença de inimigos naturais e de insetos não-alvo, nestes campos, é semelhante. Os ensaios de campo feitos para a avaliação da dinâmica populacional de insetos como tesourinhas, joaninhas (Coleoptera), sirfídeos (Diptera), percevejos (Hemiptera) não demonstraram impactos significativos na entomofauna das regiões estudadas.*

3) *O milho MON810 não apresentou efeito sobre a dinâmica populacional das espécies predominantes de aranhas e insetos benéficos de diferentes guildas tróficas, incluindo pragas não-alvo e insetos benéficos (Carabidae, Coccinellidae, Chrysopidae, Hemerobiidae, Syrphidae, Tachinidae e Apidae). A população de abelhas, A. mellifera, foi maior nas áreas avaliadas. Esse resultado pode assim ser explicado: (1) a proteína Cry1Ab não age no aparelho digestivo das abelhas por ser específico somente para algumas espécies de lepidópteros; (2) as abelhas se alimentam livremente de pólen pelo menor uso de inseticidas nas plantações de milho MON810* (CTNBIO, 2007).

Em relação ao Algodão WideStrike , que também expressa a proteína Bt, o CTNBio conclui:

1) *"Numerosos experimentos com proteínas Bt demonstram a ausência de toxicidade ao homem e aos animais vertebrados, ausência de efeitos adversos a organismos não-alvo e ao ambiente.*
2) *Com relação aos artrópodes não-alvo, não foram observados efeitos na sobrevivência média de abelhas expostas a 2 mg de pólen do evento expressando Cry1F ou 1,98 µg/ml de proteína Cry1F em combinação com a proteína Cry1Ac. A CL50 em dieta para larvas de crispa (Chryosperia carnea) expostas à proteína Cry1F, pura ou em combinação com a proteína Cry1Ac, foi investigada em uma série de estudos com a proteína microbiana administrada em uma dieta de ovos de mariposa.*
3) *A ausência de efeitos em testes de ecotoxidez em organismos não-alvo mostra largas margens de segurança relativas às concentrações ambientais de exposição projetadas, de maneira conservadora e essas observações são corroboradas com monitoramento de campo da abundância de espécies.*
4) *O uso de tecnologia como o algodão Bt resistentes a insetos pode impactar positivamente a preservação de populações de organismos não-alvo e insetos benéficos, facilitando o manejo integrado de pragas da lavoura"* (CTNBio, 2009).

As plantas tolerantes a herbicida são consideradas sem efeito direto em espécies não-alvo, pois a tolerância a herbicida é uma característica normalmente expressa em plantas e conhecidas por não terem propriedades tóxicas. Entretanto, apresentam impactos ambientais indiretos em virtude de alterações nas práticas culturais (SANVIDO et al., 2006). Um estudo da Farm Scale Evaluations (FSE) realizado na Inglaterra demonstrou que houve uma queda da biomassa de plantas daninhas nos campos de beterraba e canola resistentes a herbicidas e, consequentemente, uma diminuição da densidade de insetos que, por sua vez, afetaram negativamente a população de pássaros da região. As conclusões desse estudo consideram que o uso de plantas resistentes a herbicida afeta a biodiversidade das regiões rurais (SQUIRE et al., 2003; CHAMPION et al., 2003). No entanto, embora o manejo de plantas resistentes a herbicidas permita um maior controle das plantas daninhas, qualquer sistema de manejo dessas pragas, quando bem aplicados, também terá a mesma consequência. Assim, os resultados são devidos a um efetivo sistema de controle das plantas daninhas, podendo ocorrer com outros tipos eficientes de manejo (SANVIDO et al., 2006).

Hawes e colaboradores (2009) realizaram um estudo com 20 espécies vegetais, tolerantes a herbicidas e suas cultivares convencionais, e avaliaram seu efeito em 36 grupos funcionais de invertebrados. Eles concluíram que ocorrem alterações nos grupos funcionais em função da cultura, época de plantio e do sistema de manejo, e que essas alterações afetam a abundância, a biomassa e a relação entre os diversos níveis tróficos. Por fim, concluíram que é o tipo de sistema de produção que determina essas alterações; ademais, propõem que um modelo de estudo poderia ser utilizado para desenvolver padrões e critérios de avaliação dos impactos ambientais da introdução de uma nova cultivar, transgênica ou não.

Persistência do gene após a colheita da cultura

A preocupação de o transgene permanecer intacto após a colheita e degradação dos restos culturais existe em razão da possibilidade de esse transgene ser incorporado por outros organismos, principalmente microrganismos. Isso é conhecido como transferência hori-

zontal, ou seja, a transferência não sexual de material genético para organismos da mesma espécie ou espécie diferente. A possibilidade de transferência genética entre espécies é um processo conhecido e possível, embora raro, com exceção de bactérias e fungos. Esse processo faz parte da evolução das espécies, contudo o fenômeno não ocorre de maneira corriqueira, sendo necessária uma série de fatores para que ele aconteça. Entre os fatores estão, a permanência da viabilidade do DNA intacto no solo em quantidade suficiente para a transformação dos microrganismos; a presença de bactérias/fungos competentes para a transferência e sequências homólogas entre o microrganismo e o transgene para a integração do DNA no genoma; e uma vantagem seletiva que essa nova sequência de DNA poderia conferir ao microrganismo para que seja transmitido para as próximas gerações (AZEVEDO; ARAÚJO, 2003; CRAIG et al., 2008). Com isso, Keese (2008) conclui que a transferência horizontal de um OGM para outras espécies não é motivo de maiores preocupações, porque são eventos raros e tem pequena chance de trazer uma característica vantajosa para o organismo receptor.

Nielsen e colaboradores (2008) determinaram que fragmentos de DNA persistem no solo após prolongados períodos de tempo, no entanto os autores concluem que somente isso não causa impacto no ambiente, pois são necessários outros fatores para a transferência horizontal. Assim, eles sugerem estudos aprofundados dos demais eventos necessários para a ocorrência de transferência horizontal, bem como o desenvolvimento de métodos mais adequados para essas avaliações.

Outros aspectos importantes dos possíveis impactos ambientais de OGMs são discutidos por Andrade e Faleiro (2009b). Um ponto discutido pelos autores é a redução do uso de pesticidas em plantios comerciais de transgênicos. Segundo Brookes e Barfoot (2005), as lavouras OGM contribuíram para uma significativa redução no impacto ambiental global da produção agrícola.

Biossegurança alimentar de OGMs

O termo Segurança Alimentar ("Food Security") surgiu na Europa, a partir da 1ª Guerra Mundial, em razão da necessidade de formação de estoques estratégicos de alimentos. Na 2ª Guerra Mundial, foi agre-

gada a noção do direito humano à alimentação. Com o tempo, foram agregadas as preocupações com a qualidade do alimento, no que se referia à segurança dos aditivos alimentares, dos resíduos de agrotóxicos e da irradiação de alimentos. Iniciou-se então um processo de desenvolvimento e padronização de métodos rápidos e eficientes para detecção e quantificação de agentes biológicos e químicos, ou seja, a inocuidade dos alimentos ("Food Safety"). Atualmente, a preocupação se refere também à segurança dos produtos transgênicos ("Biosafety") (ANDRADE; FALEIRO, 2009c; LAJOLO; NUTTI, 2002).

As avaliações de produtos geneticamente modificados são realizadas por diferentes grupos, publicadas e submetidas à análise dos pares. O processo é bastante similar ao que ocorre com produtos farmacêuticos. Isto é, assim como ocorre com as fábricas de fármacos que produzem os dados de segurança do produto e os submetem às agências reguladoras para revisão, as empresas que desenvolvem um OGM devem repassar todos os dados para as agências que regulam a liberação de produtos transgênicos. No caso do Brasil, as agências reguladoras são a CTNBio, e, em algumas situações, a Anvisa e o Ibama (LEMAUX, 2008).

Segundo a FAO/WHO (1996), as considerações em relação à segurança alimentar de OGMs incluem:

1) As consequências diretas de alteração nos níveis de expressão de genes existentes pela introdução do novo gene ou modificação genéticas causadas por ele.
2) As consequências diretas (por exemplo, efeitos antinutricionais, tóxicos ou alergênicos) da presença nos alimentos da proteína codificada pelo gene introduzido.
3) As consequências indiretas dos efeitos de qualquer novo(s) produto(s), ou níveis alterados de produto(s) já existentes, no metabolismo do organismo levando à presença de novos compostos ou níveis alterados de compostos já existentes.
4) As consequências das mutações causadas no processo de introdução genética no organismo, tais como a interrupção de sequências codantes ou controle ou ativação de genes latentes, levando à presença de novos componentes ou níveis alterados de componentes existentes.

5) As consequências da transferência do gene para a flora gastrointestinal pela ingestão do alimento geneticamente modificado (AGM) e (ou) alimentos derivados deles.
6) Potencial efeito adverso na saúde associado ao microrganismo geneticamente modificado pelo alimento.

Equivalência substancial (ES)

O Princípio da Equivalência Substancial considera que os organismos existentes e seus produtos derivados podem ser utilizados como parâmetro comparativo na avaliação de segurança de OGMs, uma vez que considera-se que esses alimentos são seguros. Isto é, todo alimento utilizado é presumivelmente seguro a não ser que um perigo significativo tenha sido identificado. Baseado nesse conceito, avaliam-se similaridades e diferenças entre os alimentos transgênicos em comparação aos seus análogos considerados saudáveis (OECD, 1993; WHO, 2000). O objetivo é garantir que os alimentos transgênicos sejam tão seguros quanto os análogos convencionais (ANDRADE; FALEIRO, 2009c). Essa comparação se refere à equivalência qualitativa e quantitativa de proteínas, gorduras, amido, aminoácidos, vitaminas, minerais e composição nutricional.

Entretanto, a ES é apenas uma análise preliminar que não garante a segurança, mas auxilia na identificação de similaridades e diferenças entre o alimento convencional e o OGM, que posteriormente é submetido a análises toxicológicas adicionais. Essas análises são importantes porque podem ocorrer efeitos não intencionais que alteram a composição e o valor nutricional do alimento, também podem ocorrer efeitos antinutricionais ou tóxicos. Assim, todo alimento transgênico é submetido a um processo de análise de risco antes de ser liberado para o consumo humano ou animal. A liberação de um alimento geneticamente modificado ocorre caso a caso e para isso o alimento em questão precisa ser analisado por meio da avaliação preliminar de perigo, na qual se analisa, além da Equivalência Substancial (ES), o aspecto nutricional e toxicológico (ANDRADE; FALEIRO, 2009c; WHO, 2000; WATANABE; NUTTI., 2002).

Consequências diretas de OGMs na alimentação humana

A Organização Mundial de Saúde (WHO-World Health Organization) juntamente com a Food and Agriculture Organization (FAO) definiram *perigo* como a presença de um agente nocivo capaz de causar algum efeito prejudicial; e *risco* como a probabilidade de ocorrência do agente. Com relação a OGMs, podemos considerar que a introdução de uma sequência nova no genoma de um organismo pode causar efeitos intencionais e não intencionais, previsíveis ou não, pois a incorporação do DNA no genoma pode interferir na expressão de outros genes, podendo alterar o metabolismo da planta. Além disso, o produto da expressão do DNA é uma proteína que pode ter efeito tóxico, alergênico, antinutricional ou mesmo alterar o valor nutricional do alimento (ANDRADE; FALEIRO; 2009c).

Considerando que DNA é constituído de nucleotídeos que apresentam uma base nitrogenada (adenina, guanina, citosina e timina), um açúcar (pentose) e um radical fosfato e que o DNA recombinante inserido nos alimentos não difere quimicamente do DNA constituinte dos alimentos que ingerimos diariamente, conclui-se que a degradação do DNA recombinante não difere do DNA normalmente ingerido através dos alimentos não transgênicos. Assim a FAO e Organização Mundial de Saúde consideram que a simples ingestão do DNA recombinante não é perigosa, pois ingerimos DNA diariamente em nossa dieta (FAO/WHO, 1996).

Consequências indiretas de OGMs na alimentação humana

A introdução de um gene no genoma de um organismo pode alterar a expressão de genes constitutivos e afetar não intencionalmente a expressão de algumas características. O transgene ao integrar dentro ou em regiões adjacentes dos genes de um organismo pode perturbar sua expressão, aumentando ou diminuindo a mesma. O seu rearranjo também pode criar novas sequências abertas de leitura (Open reading frames – ORFs) alteradas que permitem ao transgene sintetizar produtos não intencionais (HALLSBERG, 2005).

Efeitos não intencionais podem ser a elevação dos níveis de constituintes antinutricionais ou tóxicos em alimentos. Mas também podem

ser genéticos, com usos para o melhoramento ou epigenéticos, que são alterações induzidas pelo transgene que podem afetar a expressão de outro gene, sem mudar a sequência de DNA, e por fim algumas instabilidades, como o silenciamento de genes. Esses efeitos podem aumentar a probabilidade de efeitos pleiotrópicos, isto é, efeitos de um mesmo gene em mais de uma característica fenotípica, assim como de efeitos epistáticos, que é a interação do gene inserido com os outros genes (FAO, 2000).

Os efeitos não intencionais podem ser consequência da posição de inserção do gene de interesse, ou estão associados com a interação entre os produtos expressos do gene introduzido e as proteínas endógenas e metabólitos. Métodos adequados para a avaliação de efeitos não intencionais precisam ser estudados caso a caso, considerando fatores tóxicos e antinutricionais não intencionais, por meio de uma análise dos constituintes e de características GM. No entanto, por mais rigorosos que sejam os métodos para validação das variedades transgênicas, não é fácil distinguir alterações não desejáveis no metabolismo e a atividade de várias proteínas, pois existe grande variação no nível de expressão das proteínas em função da cultivar, ambiente, época de colheita e outros. Assim, para essas avaliações, tem-se o cuidado de comparar o transgênico com diversas cultivares da espécie estudada.

Diversos estudos com animais, tanto com alimentos transgênicos como com seus produtos, estão demonstrando ausência de efeitos não intencionais entre os alimentos transgênicos e sua contraparte não transgênica. Não foi encontrado efeito na composição, digestibilidade, saúde animal e performance, apoiando a equivalência substancial desses alimentos (LEMAUX, 2008).

Alergenicidade

A alergia a um alimento é uma reação adversa a algum componente do mesmo que envolve uma resposta anormal do sistema imunológico do corpo. O tipo mais comum de alergia a alimentos é o mediado pela produção de anticorpos específicos, as imunoglobulinas E específicas (IgE). Em uma resposta alérgica mediada por IgE, os primeiros sintomas ocorrem alguns minutos ou horas após a ingestão do

alimento e exposição do corpo ao agente alergênico. Algumas alergias comuns mediadas por IgE são as induzidas por pólen, esporos, pelos de animais, picadas de insetos e alguns tipos de alimentos. Existem também respostas alergênicas mediadas por reações celulares que, em geral, ocorrem cerca de 8 horas após a ingestão do alimento, por exemplo, a alergia ao glúten (ANDRADE; FALEIRO, 2009c; FAO/WHO, 2001).

Um ponto importante é que quase todos os alergênicos alimentares são proteínas, as quais podem estar distribuídas em diferentes partes da planta e serem influenciadas por fatores ambientais. No entanto, não existe uma propriedade única que caracterize um alergênico potencial, embora a maioria dos alergênicos possua uma série de características comuns. São elas: (1) resistência a digestão; (2) resistência ao processamento; (3) peso molecular de 10 a 70 kDa; (4) presença no alimento em concentrações acima de 1%; e (5) sequência de aminoácidos com homologia a outros alergênicos conhecidos (ANDRADE;FALEIRO, 2009c).

Em função da preocupação referente à capacidade de um alimento transgênico causar uma reação alérgica a um indivíduo, o Conselho Internacional de Biotecnologia de Alimentos e o International Life Science Institute (ILSI) desenvolveram uma árvore de decisões sobre o potencial alergênico de um OGM, que tem sido adotada pelas empresas que desenvolvem OGMs. Os critérios relevantes na utilização da arvore de decisão são:

1) Fonte do gene transferido: atenção particular no caso da fonte do gene conter alergênicos conhecidos.
2) Homologia da sequência: a sequência de aminoácidos de muitas proteínas alergênicas é facilmente acessada.
3) Imunoreatividade da nova proteína: caso a proteína seja derivada de uma fonte alergênica conhecida ou tenha homologia de sequência com algum alergênico, então a reatividade ao IgE do soro sanguíneo de indivíduos alérgicos ao alimento é determinada.
4) Efeito do pH e (ou) digestão: a maioria dos alergênicos é resistente ao suco gástrico e a proteases digestivas.

5) Estabilidade ao processamento ou aquecimento: alergênicos de alimentos susceptíveis ao calor ou processamento são considerados menos preocupantes (FAO/WHO 2000).

Transferência Horizontal no trato gastrointestinal

A Organização Mundial de Saúde em um Workshop sobre "Aspectos relacionados à saúde dos genes marcadores de plantas geneticamente modificadas", ocorrido em 1993, concluiu, com base na complexidade de etapas necessárias para a transferência horizontal, que não existiam evidências de transferência de genes de plantas para microrganismos no trato gastrointestinal. Para suceder essa transferência, seria necessária a ocorrência das seguintes etapas:

1) O DNA vegetal teria que ser liberado da célula/tecido vegetal e não ser degradado (sobreviver) no ambiente gastrointestinal, exposto ao ácido gástrico e às nucleases.
2) O microrganismo receptor teria que estar competente para a transformação.
3) O microrganismo receptor teria que se ligar ao DNA a ser transferido.
4) O DNA teria que penetrar a parede celular e translocar-se através da membrana celular do microrganismo.
5) O DNA teria que continuar íntegro ao sistema de restrição/modificação desenvolvido pelo microrganismo para degradar o DNA estranho.
6) O DNA teria que ser integrado ao genoma ou plasmídios do hospedeiro, o que requer a homologia de pelo menos 20 pares de base em ambas as extremidades do DNA a ser transferido, possibilitando a recombinação genética.

Assim, é improvável que o DNA exógeno se integre ao genoma humano, pois a molécula de DNA é desintegrada durante o processo digestivo e dificilmente ficaria intacta para ser aproveitada pelas células do corpo humano ou animal. Em 1996, um Conselho da FAO/WHO corroborou essa decisão. No entanto, considerou que, embora a transferência do DNA para as bactérias do trato intestinal seja remota, em caso de genes que poderiam afetar a saúde humana ou animal, como é o caso da resistência a antibióticos, estes não deveriam ser

utilizados em plantas geneticamente modificadas para o uso comercial. Estudos recentes comprovaram que a transferência horizontal de genes para o trato gastrointestinal ou microrganismos não é motivo de maiores preocupações (ANDRADE; FALEIRO, 2009c; KEESE, 2008).

Com relação à biossegurança alimentar, já foram emitidos alguns pareceres conclusivos do CTNBio em relação ao milho e algodão Bt e soja RR.

Milho Bt

Segundo a CTNBio, o milho Bt (MON810) não apresenta risco à saúde humana no que se refere à composição nutricional:

> *"A introdução do gene cry1Ab não resultou em aparente alteração de importância nutricional, pois os perfis dos principais nutrientes foram similares àqueles normalmente observados em outras variedades ou sob distintas condições de cultivo. Assim, os resultados sobre composição química e centesimal do milho MON810 estão de acordo com o Princípio da Equivalência Substancial"*.

Além disso, um efeito secundário benéfico foi encontrado em relação ao milho Bt, pois:

> *"em razão da menor infestação por insetos em relação às variedades tradicionais de milho, há menor crescimento de fungos associados, produtores de micotoxinas de importância patológica para seres humanos e animais e reduzindo, em consequência, de forma considerável, a contaminação e a presença dessas toxinas, contribuindo para melhorar a qualidade e o nível de segurança alimentar dos grãos"* (CTNBio, 2009).

A sequência da proteína foi comparada com bancos de dados de proteínas com propriedades alergênicas, não tendo sido demonstrada homologia biologicamente significativa entre a proteína Cry1Ab completa e sequências de proteínas com essas propriedades. Em virtude das características de digestibilidade da proteína Cry1Ab nos fluidos gástrico e intestinal, a probabilidade de que ela apresente ação alergênica é extremamente baixa (CTNBio, 2009).

Algodão Bt

No parecer conclusivo do CTNBio nº 513-2005, referente ao Algodão Bolgard, o relator pondera que:

> *"A exposição de organismos vivos às proteínas Cry produzidas pelo B. thuringiensis é um evento que ocorre abundantemente na natureza e o modo de ação dessa proteína já é bem conhecido. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), em 1998, concluiu a partir do grande volume de dados de toxicologia submetidos que as subespécies de B. thuringiensis não são tóxicas ou patogênicas para mamíferos, incluindo seres humanos. Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) revisou os extensos bancos de dados de segurança e concluiu que o Bt não causa efeitos adversos na saúde humana quando presente na água potável ou nos alimentos."*

Baseado em avaliações da equivalência nutricional:

> *"os estudos realizados não mostraram alterações nos principais componentes e nos antinutrientes naturais presentes no algodão. A segurança dos produtos alimentares do algodão Bollgard evento 531 foi determinada pela equivalência na composição de macro e micronutrientes em estudos de salubridade com animais e concluiu-se que este produto, como componente de ração animal e as proteínas Cry1Ac e NPTII expressas nos tecidos da planta, mostrou-se seguro e com valor nutritivo equivalente para o consumo humano e animal. Após o processamento das fibras e do caroço, as proteínas expressas pela planta não são detectadas. Como o óleo e as fibras processadas são os únicos produtos do algodão usados na alimentação humana e como vestuário, respectivamente, o consumo das proteínas não é esperado".*
>
> *Diante do exposto, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio após a análise de biossegurança do algodão Bollgard evento 531, processo 01200.001471/2003-01, delibera favoravelmente à sua liberação para plantio comercial e consumo humano e animal.*

Soja RR

No Comunicado 54 de 1998, o CTNBio declarou que:

> *"a introdução do transgene não altera as características da composição química da soja, com exceção da acumulação da proteína transgênica CP4 EPSPS. Esta conclusão de equivalência de composição química é baseada em avaliações realizadas através de metodologia científica, publicadas em revistas científicas indexadas e de circulação internacional. A segurança da proteína CP4 EPSPS, quanto aos aspectos de toxicidade e alergenicidade, também, foi comprovada. É importante registrar que, após a utilização da soja geneticamente modificada e de seus derivados na América do Sul, Central e do Norte, na Europa e na Ásia, não foi verificado um só caso de desenvolvimento de reações alérgicas em humanos que não fossem previamente alérgicos à soja convencional. Adicionalmente, é importante registrar que indivíduos sensíveis à soja convencional continuarão sensíveis à soja transgênica e, portanto, não deverão fazer uso deste produto".*

> *A análise dos resultados descritos na literatura não confirmou um possível aumento, na soja geneticamente modificada, da concentração de proteínas que reagem com uma combinação de soros de pacientes alérgicos à soja convencional. De fato, os artigos científicos disponíveis e citados sobre a matéria mostraram que a expressão do transgene não resultou no aumento dos níveis de proteínas reativas, especialmente daquelas de peso molecular próximo a 30 kilodáltons, a uma combinação de soro de indivíduos sensíveis à soja comercial (BURKS and FUCHS, 1995, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 96: 1008-1010). Os autores do artigo científico acima mencionado afirmaram que "nossos estudos demonstram que a introdução do gene codificador da proteína EPSPS, que confere tolerância a Glifosate, não causou modificação discernível, qualitativa ou quantitativamente, na composição de proteínas alergênicas endógenas de soja em qualquer dos cultivares resistentes a Glifosate analisados".*

Considerações finais

A engenharia genética, o desenvolvimento de OGMs e o cultivo comercial desses organismos geram preocupações referentes à biossegurança ambiental e alimentar. Essas preocupações estão sendo alvo de trabalhos científicos que têm subsidiado a tomada de decisões sobre a liberação ou não do cultivo e utilização comercial dos OGMs, ponderando-se os riscos potenciais com os benefícios e efeitos positivos da tecnologia.

Pode-se dizer que existem diversos estudos que geraram dados substanciais a respeito do impacto ambiental de OGMs. Embora existam alguns dados controversos, os resultados obtidos até o momento não demonstram evidência científica de efeito no ambiente. Do ponto de vista alimentar, o nível de segurança de AGMs é muito alto, uma vez que esses alimentos são submetidos a uma bateria de testes relacionados à caracterização da proteína expressada, testes de digestibilidade in vitro, avaliação de toxicidade aguda oral em camundongos, avaliação de homologia estrutural da proteína com toxinas proteicas conhecidas, avaliação do potencial alergênico e equivalência nutricional. Com base nesses testes, pode-se dizer que o risco que um alimento transgênico oferece pode ser considerado menor que o de outro tipo de alimento liberado para consumo humano que não passou por uma bateria de testes tão rigorosa.

É importante salientar que as análises caso a caso dos OGMs quanto à biossegurança ambiental e alimentar devem continuar sendo feitas com todo critério técnico e científico. Nesse contexto, as ações de pesquisa e desenvolvimento assumem importância estratégica, uma vez que essas ações têm assumido uma importância cada vez maior nas tomadas de decisão sobre todos os assuntos relativos a transgênicos, principalmente gerando informações para subsidiar a liberação comercial ou não dos OGMs.

Referências

ABUD, S. ; SOUZA, P. I. M.; VIANNA, G. R.; LEONARDECZ, E.; MOREIRA, C. T.; FALEIRO, F. G.; JÚNIOR, J. V.; MONTEIRO, P. M. F. O.; RECH, E. L.; ARAGÃO, F. J. L. Gene flow transgenic to nontransgenic soybean plants in the cerrado region of Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, p. 445-452, 2007.

ABUD, S.; SOUZA, P. I. M.; MOREIRA, C. T.; ANDRADE, S. R. M.; ULBRICH, A. V.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L.; ARAGÃO, F. J. L. Dispersão de pólen de soja transgênica na região do Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 10, p. 1299-1235, 2003.

ANDOW, D. A.; ZWAHLEN, C. Assessing environmental risks of transgenic plants. **Ecology Letters**, v. 9, PP 196-214, 2006.

ANDRADE, S. R. M. de; FALEIRO, F. G. Biossegurança ambiental. In: FALEIRO, F. G.;ANDRADE, S. R. M. (Org.). Biotecnologia, transgênicos e biossegurança. 1 ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009b, v. 1, p. 61-76.

ANDRADE, S. R. M. **Transformação de plantas**. Planaltina-DF; Embrapa Cerrados, 2003. 27p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 102).

ANDRADE, S. R. M.; FALEIRO, F. G. Biossegurança alimentar. In: FALEIRO, F. G.; Andrade, S. R. M. (Org.). **Biotecnologia, transgênicos e biossegurança**. 1 ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009c, v. 1, p. 77-88.

ANDRADE, S.R.M. de ; FALEIRO, F. G. . Breve histórico da biossegurança. In: Faleiro, F.G.; Andrade, S.R.M.. (Org.). Biotecnologia, transgênicos e Biossegurança.. 1 ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009a, v. 1, p. 49-59.

Arpaia S.; Di Leo, G. M.; Fiore, M. C, Schmidt J.; Scardi, M. Composition of arthropod species assemblages in Bt-expressing and near isogenic eggplants in experimental fields. **Environmental Entomology**, v. 361, p. 213–227, 2007.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Genetically modified crops: environmental and human concerns. **Mutation Research**, v. 544, p. 223-233, 2003.

BARROSO, P. A., FREIRE, E. C.; AMARAL, J. A. B., SILVA, M. T. **Zonas de exclusão de algodoeiro transgênico para preservação de espécies de** Gossypium **nativas ou naturalizadas.** Campina Grande, MT: Embrapa Algodão, 2005. (Embrapa Algodão. Comunicado Técnico, 242). 7 p.

BERG, P. **Asilomar and recombinat DNA.** Disponível em: <http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/articles/berg/index.html,>. Acesso em: 10 Nov. 2006.

BERG, P.; BALTIMORE, D.; BRENNER, S.; ROBLIN III, R. O; SINGER, M. F. Summary statement of the asilomar conference on recombinat DNA molecules. **Proceedings of the National Academic Science USA,** v. 72, p. 1981-1984 , 1975.

BORÉM, A. Impactos da biotecnologia na biodiversidade. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 34, p. 22-28. 2005.

BRAUN, R.; AMMAN, K. Biodiversity: the impact of biotechnology. **Encyclopedia of Life Support Systems**, p. 1-17, 2002.

BROOKES, G.; BARFOOT, P. GM Crops: the global economic and environmental impact: the first nine years 1996-2004. **AgBioForum**, v. 8, p. 187-196. 2005.

CARPENTER, J.; GOODE, T.; HAMMIG, M.; ONSTAD, D. SANKULA, S. **Comparative environmental impacts of biotechnology derived and traditional soybean, corns, and cotton crops**. Indianapolis, USA: Council for Agriculture Science and Technology, 2002. 42 p.

CERDEIRA, A. L.; DUKE, S. O. The current status and environmental impacts of glyphosate-resistance crops: a review. **Journal of Environmental Quality**, v. 35, p. 1633-1658. 2006.

CHAMPION, G. T.; MAY, M. J.; BENNET, S.; BROOKS, D. R.; CLARK, S. J.; DANIEIS, R. E.; FIRBANK, L. G.; HAUGHTON, A. J.; HAWES, C.; HEARD, M. S.; PERRY, J. N.; RANDLE, Z.; ROSSAL, M. J.; ROTHERY, P. SKELLERN, M. P.; SCOTT, R. J. SQUIRE, G. R.; THOMAS, M. R. Crop management and agronomic context of the Farm Scale Evaluations of genetically modified herbicice-tolerant crops. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B-Biological**, v. 358, p. 1801-1818, 2003.

COHEN, S. N.; CHANG, A. C. Y.; HSU, L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. **Proceedings of the National Academic Science USA**, v. 69, p. 2110-2114 , 1972.

Comissão Técnica de Biossegurança – CTNbio – Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/>. Acesso em: jun. 2009.

CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA – CIB – **Glossário**. Disponível em:< http://www.cib.org.br/glossario.php>. Acesso em: jun. 2009.

CRAIG, W.; TEPFER, M.; DEGRASI, G.; RIPANDELLI, D. An overview of general features of risk assessments of genetically modified crops. **Euphytica**, v. 164, p. 853–880, 2008.

Dalton, R. Modified genes spread to local maize. **Nature**, v. 456, p. 149, 2008.

EMBRAPA Milho e Sorgo. **Posição da Embrapa com relação ao cultivo dos milhos transgênicos aprovados pela CTNBio no Brasil**. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 102).

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. Biotecnologia e transgênicos. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. (Org.). **Biotecnologia, transgênicos e Biossegurança**. 1 ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009, v. 1, p. 15-29.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, Solange Rocha M. de (Org.). **Biotecnologia, transgênicos e biossegurança.** 1. ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. v. 1000, 183 p.

FAO/WHO. Biotechnology and food safety: report of a Joint. **FAO/WHO Consultation**. Rome, 1996. 31 p. (FAO Food Nutrition Paper, 61). Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/biotechnology.pdf>. Acesso em: 16 maio 2005.

FAO/WHO. Evaluation of Allergenicity of Genetically modified foods. **FAO/WHO Consultation** Rome, 2001. 27 p. (Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology). Disponível em: <http://www.fao.org/es/ESN/food/pdf/allergygm.pdf.> Acesso em: 16 maio 2005.

FAO/WHO. Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Geneva, **FAO/WHO Consultation,** 2000. 36 p. (Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology). Disponível em: <http://www.fao.org/es/ESN/food/pdf/gmreport.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2004.

FRIZZAS, M. R.; OLIVEIRA, C. M. Plantas transgênicas resistentes a insetos e organismos não alvo: predadores, parasitóides e polinizadores. **Ciência e Saúde**, v. 4, p. 63-82, 2006.

GMO-ERA PROJECT. **Final report**: phase II. Disponível em: <www.gmoera.umn.edu>. Acesso em: maio 2010.

Goggi, A. S.; Lopez-Sanchez, H.; Caragea, P.; Westgate, M.; Arritt, R.; Clark, C. A. Statistical analysis of outcrossing between adjacent maize grain production fields. **Field Crop Research**, v. 99, p. 147–157, 2006.

Haslberger A. G. Need for an "integrated safety assessment" of GMOs, linking food safety and environmental considerations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 9, p. 3173-3180, 2006.

Hawes C.; Haughton A J.; Bohan D. A.; Squire G. R. Functional approaches for assessing plant and invertebrate abundance patterns in arable systems. **Basic and Applied Ecology,** v. 10, p. 34-42, 2009.

IFT. **Expert report on biotechnology food**: backgrounder, safety assessment of biotech foods. Disponível em: < http://www.ift.org/pdfs/expert/biotech/iftbiotechsafety-b.pdf>. Acesso em: 10 maio 2005.

ILSI. **Method development in the relationship to regulatory requirements for the detection of GMOs in the food chain**, Belgium. Brussels, 2001. Disponível em: <http://www.gmsciencedebate.org.uk/topics/forum/pdf/0080f.pdf> Acesso em: 10 maio 2005.

JACKSON, D. A.; SYMONS, R. H.; BERG, P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: cirular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and galactose operon of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 69, p. 2904-2909, 1972.

JAMES, C. Executive summary of global status of commercialized biotech/GM Crops: 2008. **ISAAA Briefs**, v. 39. Ithaca, USA, 2008. 20 p.

JESUS, K. R. E.; LANNA, A. C.; VIEIRA, F. D.; ABREU, A. L.; LIMA, D. U. A proposed risk assessment method for genetically modified plants. **Journal of Applied Biosafety**, v. 11, p. 127-137, 2006.

KEESE, P. Risks from GMOs due to horizontal gene transfer. **Environmental Biosafety Research**, v. 7, p. 123-149, 2008.

KOVACH, J.; PETZOLDT, C.; DEGNI, J.; TETTE, J. **A method to mesure the environmental impact of pesticides: New York's food and life sciences Bulletin**. Geneva, NY. Disponível em: <http://www.nysaes.cornell.edu/pubs/fls/OCRPDF/139.pdf>. Acesso em:17 nov. 2006.

LAJOLO, F. M.; NUTTI, M. R. **Transgênicos:** bases científicas da sua segurança. São Paulo: SBAN, 2003. 112 p.

LEMAUX, P. G. Genetically engineered plants and foods: a scientist's analysis of the Issues (part I). **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 771-812, 2008.

Luna, V. S.; FIGUEROA, J. M.; BALTAZAR, M. B.; GOMEZ L. R.; Gomez, R. T.; SCHOPER, J. B. Maize pollen longevity and distance isolation requirement for effective pollen control. **Crop Science**, v. 41, p.1551–1557, 2001.

MINARÉ, R. L. O Princípio da precaução. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 34, p. 65-66, 2005.

MÜNSTER, P.; WIECZOREK, A. M. Potential gene flow fram agrcultural crops to native plant relatives in Hawaian Islands. **Agriculture, Ecosystems and Environment,** v. 119, p. 1 – 10, 2007.

Nielsen, K. M.; johbsen, p. j.; BENSASSON, D.; DAFFONCHIO, D. Release and persistence of extracellular DNA in the environment. **Environmental Biosafety Research,** v. 6, p. 37-53, 2007.

OECD. 1993. **Safety evaluation of foods produced by modern biotechnology:** concepts and principles. Disponível em: <http://www.oecd.org/dataoecd/57/3/1946129.pdf>. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France. Acesso em 30 maio 2005.

SANVIDO, O.; STARK, M.; ROMEIS, J.; BIGLER, F. **Ecological impacts of genetically modified crops**: experiences from ten years of experimental field research and commercial cultivation. Agroscope Reckenholz-Tãnikon Research Station ART, Zurich, p. 108, 2006. Disponível em: <http://www.art.admin.ch/dms_files/03017_de.pdf>. Acesso em: 30 maio 2005.

Silva, A. L. L.; Walter, J. M.; Horbach, M. A.; Quoirin, M. Contenção do fluxo gênico de plantas geneticamente modificadas. **Caderno de Pesquisa Série Biologia,** v. 19, n. 1, 2007, p. 19-26.

SILVA, A. L. L.; WALTER, J. M.; HORBACH, M. A.; QUOIRIN, M. Contenção do fluxo gênico de plantas geneticamente modificadas. **Caderno de Pesquisa, série Biologia**, v. 19, p. 18-26, 2007.

SQUIRE, G. R.; BROOKS, D. R.; BOHAR, D. A.; CHAMPION, G. T.; DANIEIS, R. E.; HAUGHTON, A. J.; HAWES, C.; HEARDS, M. S.; HILL, M. O.; MAY, M. J.; OSBORN, J. L.; PERRY, J. N.; ROY, D. B.; WOIWOD, I. P.; FIRBANK, L. G. On rationale and interpretation of the farm scale evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B-Biological**, v. 358, p. 1779-1799, 2003.

UMBECK, P. F.; BARTON, K. A.; NORDHEIM, E. V.; McCARTY, J. C.; PARROT, W. L.; JENKINS, J. N. Degree of pollen dispersal by insects from a field test of genetically engineered cotton. **Journal of Economic Entomology**, v. 84, n. 6, p. 1943-1950, 1991.

UNEP – United Nations Environments Programme. Highligts of some of the basic requirements of the Cartagena Protocol on biosafety. 2003 Disponível em: <www.biodiv.org/doc/notifications/**2003**/ntf-**2003**-127-cop-en.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2004.

UNITED NATIONS. Rio declaration on Environment and Development. UN.DocA/Conf. 151/26/Ver.1, United Nations, New York, 1992. Disponível em; <http://www.un.org/documents/ga/conf151/aconf15126-1annex1.htm.> Acesso em: 12 fev. 2010.

WATANABE, E.; NUTTI, M. R. Alimentos geneticamente modificados: avaliação de segurança e melhorias de qualidade em desenvolvimento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2002.

WHO, 2000. **Safety aspects of genetically modified foods of plant origin**. Disponível em: <http://www.fao.org/es/ESN/food/pdf/gmreport.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2006.

WOSNIAK, C. A. Gene flow assessment for plant-incorporated protectants by the biopesticide and pollution prevention, US EPA. **Proceedings...** Gene Flow Workshop, p. 153-168, 2002.

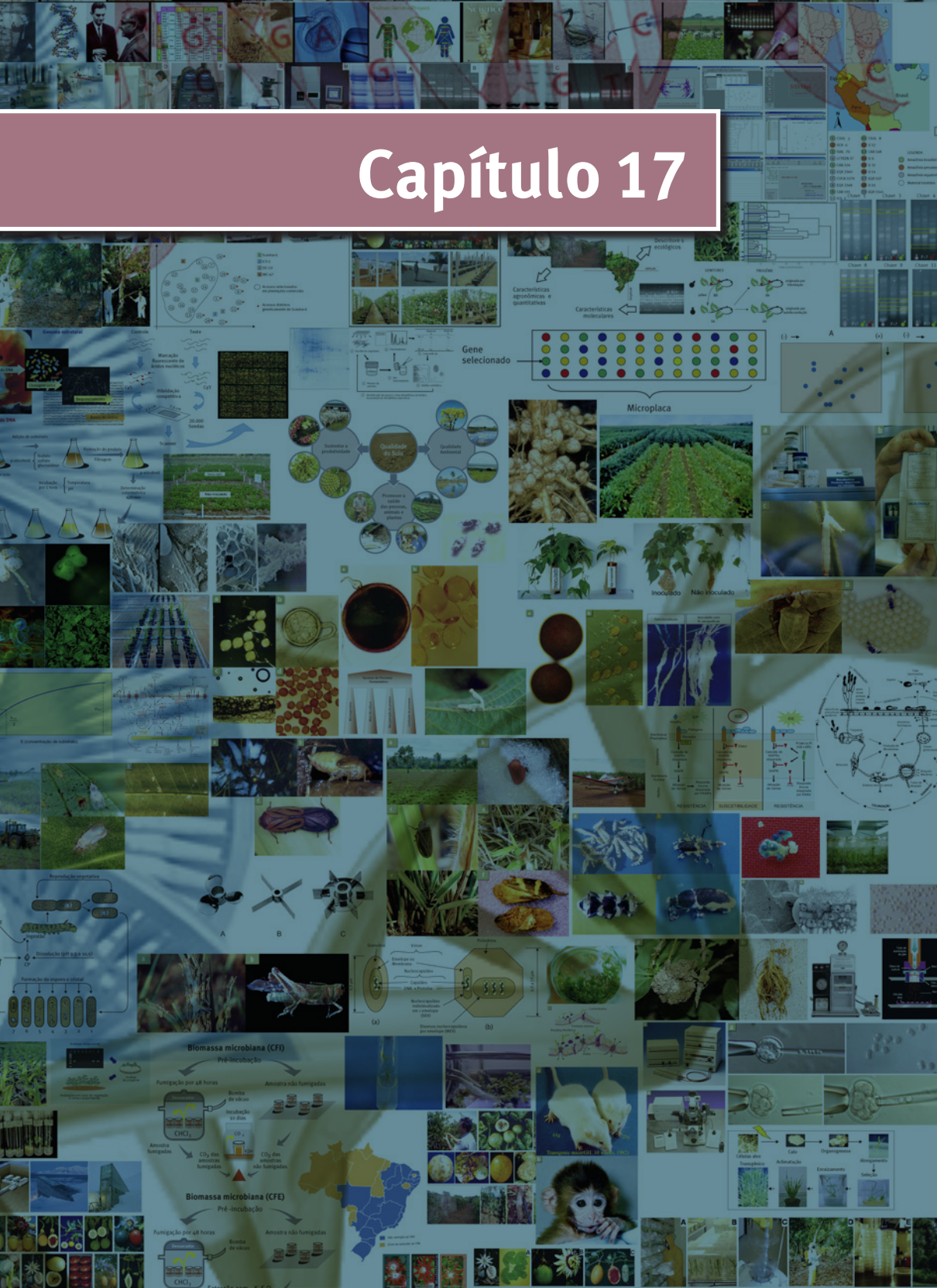
Bibliografia complementar

ANDRADE, S. R. M. **Biossegurança de alimentos transgênicos.** Planaltina-DF; Embrapa Cerrados, 2004. 22 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 130).

ANDRADE, S. R. M. **Biossegurança ambiental de OGMs.** Planaltina-DF; Embrapa Cerrados, 2006, 32 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 168).

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. de (Org.). **Biotecnologia, transgênicos e biossegurança**. 1. ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. v. 1000. 183 p.

Capítulo 17


Gene selecionado
Microplaca
Inoculado
Não inoculado
Biomassa microbiana (CFI)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas
Biomassa microbiana (CFE)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas

Recursos genéticos: conservação, caracterização e uso

Fábio Gelape Faleiro
Nilton Tadeu Vilela Junqueira

Introdução

Quando pensamos na biotecnologia aplicada, a capacidade de conservar, caracterizar e utilizar recursos genéticos vegetais, animais e microbianos para avanços tecnológicos na agropecuária e na indústria assume importância estratégica. Nesse sentido, as atividades relacionadas à conservação, caracterização e uso de recursos genéticos estão entre as mais relevantes da pesquisa agropecuária brasileira e mundial.

A variabilidade genética é a essência da vida, sendo o fator básico para a evolução das espécies. A existência da variabilidade genética permitiu a obtenção, via melhoramento genético, de variedades e animais produtivos, resistentes a pragas e doenças e adaptados aos mais diferentes ambientes. No caso dos vegetais, existem aproximadamente 250 mil espécies de plantas superiores identificadas e 40% delas podem ter importância para a agricultura, considerando as espécies cultivadas e espécies relacionadas. Quando pensamos nos recursos genéticos animais e microbianos, a variabilidade genética também é riquíssima, assim como sua utilização atual e potencial nos mais variados campos da atividade humana.

Atualmente, existe uma grande preocupação com a significativa redução da variabilidade genética de plantas e animais, a qual representa um sério risco para a sustentabilidade da agropecuária. Essa perda de variabilidade genética, também chamada erosão genética, significa a perda de genes ou combinações gênicas de plantas ou animais que possuem valor atual ou potencial para a agropecuária. Entre as causas da erosão genética, pode-se citar a perda do *habitat* dessas plantas e animais (desmatamento, desertificação, expansão urbana, modernização da agropecuária), distúrbios no *habitat*

(construção de rodovias e outras ações do homem), desastres naturais (seca, enchente), substituição de variedades ou animais locais ou tradicionais por novas variedades e animais melhorados, mudanças nas práticas culturais, etc. Embora o fenômeno da erosão genética possa ser irreversível, ações devem ser tomadas para prevenir ou minimizar as suas causas. Uma das ações é a conservação da variabilidade genética via formação de bancos de germoplasma (SILVA et al., 2007; FALEIRO, 2010a; FALEIRO 2010b).

Paralelamente ao esforço de conservar os recursos genéticos, atividades de caracterização são fundamentais para que a variabilidade genética conservada seja utilizada e aproveitada de forma prática nos sistemas de produção vegetal e animal. Diferentes grupos de características são utilizados na caracterização de acessos conservados em bancos de germoplasma, destacando-se as características ecológicas, morfológicas, agronômicas e moleculares. Essa caracterização vai subsidiar a utilização desses acessos, fornecendo genes de interesse para programas de melhoramento genético e ou subsidiando seu uso *per se* como alternativas para diversificação dos sistemas de produção agropecuária e industrial.

Neste capítulo, as principais estratégias de conservação, caracterização e uso de recursos genéticos são discutidas, bem como a situação atual no Brasil e no mundo. Experiências da Embrapa Cerrados com as espécies nativas do Cerrado e, mais especificamente, com o maracujazeiro, são apresentadas como estudo de caso.

A preocupação mundial com a conservação e uso de recursos genéticos

A conservação de recursos genéticos é essencial para o futuro da sociedade, sendo uma preocupação mundial. Esses recursos são a base da cadeia alimentar do homem e dos animais domésticos, além de atender outras necessidades relacionadas à bioenergia, vestuário, medicamentos e habitação. Considerando as mais variadas atividades agropecuárias, existe uma interdependência mundial dos recursos genéticos, de modo que a conservação desses recursos em condições

ideais, mantendo sua integridade física e genética, é uma obrigação de todos os países.

Nos últimos 15 anos, o desenvolvimento de acordos, convenções e tratados internacionais tem influenciado de modo marcante a conservação e uso dos recursos genéticos. Merecem destaque a elaboração de um marco legal internacional, com destaque para a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB), e o Tratado Internacional sobre os Recursos Fitogenéticos para Alimentação e Agricultura (TIRFAA). Internamente, o Brasil editou importantes normas para regular o tema, dentre elas a Medida Provisória 2186-16/01 e os Decretos 3.945/01 e 5.459/05.

A CDB é um instrumento internacional que tem três objetivos principais: (i) a conservação da diversidade biológica; (ii) o uso sustentável de seus componentes; e (iii) a repartição equitativa dos benefícios derivados do uso dos recursos genéticos. O TIRFAA reconhece os direitos soberanos dos Estados sobre seus próprios recursos fitogenéticos para a alimentação e a agricultura, contudo estabelece um sistema multilateral, almejando que seja eficiente, eficaz e transparente tanto para facilitar o acesso aos recursos fitogenéticos para a alimentação e a agricultura quanto para repartir, de forma justa e eqüitativa, os benefícios derivados da utilização desses recursos, em base complementar e de fortalecimento mútuo. O marco legal brasileiro envolveu a criação de uma autoridade nacional, o Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN), responsável pelas autorizações de acesso a recursos genéticos e ao conhecimento tradicional associado e pela coordenação da implementação de políticas para a gestão destes recursos.

A partir da vigência desses acordos, tratados e marcos legais, a pesquisa brasileira relacionada à conservação, caracterização e uso de recursos genéticos que utiliza biodiversidade nativa e ou conhecimentos tradicionais associados está sendo induzida a profundas modificações. Tanto as pesquisas que envolvem acesso a recursos genéticos, quanto aquelas que remetem material para o exterior com esta finalidade, necessitam de uma autorização governamental, a ser concedida por uma autoridade nacional. Também o acesso ao conhecimento tradicional associado, bem como a sua disponibilização, são regulados, envolvendo a necessidade de anuência prévia por parte dos detento-

res e autorização governamental. Embora o princípio envolvido nos acordos e tratados seja nobre, existe uma grande preocupação com a excessiva burocratização de todas atividades de acesso, conservação e uso de recursos genéticos, principalmente quando isso envolve as estratégicas e essenciais atividades de pesquisa científica e tecnológica. Segundo Silva e Viccini (2009) é preciso tomar cuidado para que a produção científica não seja desestimulada face às exigências da lei.

Além das legislações muito restritivas ou burocráticas para o acesso a recursos genéticos, outras preocupações científicas mundiais estão relacionadas à manutenção e situação atual dos bancos de germoplasma como a existência de coleções inapropriadas (muito grandes e pouco representativas da variabilidade genética), problemas de duplicação (estimada em 33%), baixa qualidade das sementes conservadas (baixo vigor, baixa germinação e presença de pragas e doenças), baixo estoque de sementes por acesso, existência de processos inadequados de regeneração e multiplicação, problemas de infraestrutura (equipamentos falhos e ausência de manutenção), falta de dados de caracterização, falta de base de dados e documentação dos acessos, recursos financeiros escassos, descontinuidade de políticas públicas e institucionais relacionadas a recursos genéticos e falta de visão estratégica da importância dos recursos genéticos para o futuro da agricultura e da sociedade.

Estratégias para a conservação de recursos genéticos

Os recursos genéticos são conservados nos chamados bancos de germoplasma, os quais são unidades conservadoras de material genético de uso imediato ou com potencial de uso futuro. Nos bancos de germoplasma, são conservadas as chamadas coleções base e as coleções ativas. As primeiras são coleções abrangentes de acessos conservadas a longo prazo. A coleção base ideal deve conter amostras representativas dos estoques domesticados da cultura e suas formas parentais silvestres. A coleção base é vista como uma estratégia de segurança, abrigando em seu acervo a coleção ativa duplicada, e com seus materiais não sendo utilizados para intercâmbio. As coleções

base existentes são todas compostas de sementes ortodoxas, ou seja, sementes que não perdem sua viabilidade quando conservadas em baixa umidade (4% a 6%) e baixas temperaturas (-15 °C a -18 °C). As coleções ativas são aquelas conservadas no curto e médio prazos, rotineiramente usadas para propósitos de pesquisa, caracterização, avaliação e utilização de materiais. A coleção ativa é multiplicada de acordo com a demanda e regenerada periodicamente. Normalmente possui menor tamanho que a coleção base. A coleção ativa, geralmente, funciona em dois ciclos: plantas vivas crescendo no campo e sementes armazenadas para regeneração ou multiplicação de materiais. A coleção ativa normalmente corresponde a um subconjunto da coleção base localizado próximo ao pesquisador.

Existem, basicamente, três estratégias de conservação de germoplasma: *in situ*, *ex situ* e *on farm*. Na conservação *in situ*, as plantas e animais são conservados em suas comunidades naturais. Para realizar esse tipo de conservação, existem as chamadas unidades operacionais, destacando-se parques nacionais, reservas biológicas, reservas genéticas, estações ecológicas, santuários de vida silvestre etc. Na conservação *ex situ*, a variação genética das espécies é conservada fora de suas comunidades naturais. Desdobra-se em várias modalidades, entre as quais conservação *in vitro*, em coleções a campo, em câmaras frias, em nitrogênio líquido etc. Já a conservação *on farm* é uma estratégia complementar à conservação *in situ*, sendo uma das formas para a conservação da agrobiodiversidade. Apresenta como particularidade o fato de envolver recursos genéticos cultivados pelas comunidades locais e populações indígenas, detentoras de grande diversidade de recursos genéticos e de um amplo conhecimento sobre eles. A conservação *on farm* envolve, portanto, recursos nativos e exóticos adaptados às condições locais, que estão em contínuo processo de seleção e de melhoramento pelas comunidades locais e populações indígenas.

Conservação *in situ*

Com aproximadamente 50 mil espécies de plantas superiores (18% do total mundial), o Brasil possui uma das mais diversas floras do mundo (NASS et al., 2009). Na tentativa de conservar parte dessas espécies em seu *habitat*, têm sido criadas e estabelecidas áreas de pro-

teção, chamadas Unidades de Conservação (UC). A UC é o nome dado pela legislação brasileira às áreas protegidas, fazendo parte do sistema brasileiro de proteção ao meio ambiente, e são controladas pelo órgão federal Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), compondo o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza (SNUC). As unidades de conservação integrantes dividem-se em dois grupos: (i) Unidades de Proteção Integral (UPI), cujo objetivo é preservar a natureza, onde a interferência humana é limitada, sendo admitido apenas o uso indireto dos seus recursos naturais, com exceção dos casos previstos na Lei. (ii) Unidades de Uso Sustentável (UUS), cujo objetivo básico é compatibilizar a conservação da natureza com o uso sustentável de parcela dos seus recursos naturais, de modo que diferentes graus de interferência humana são permitidos (FREITAS et al., 2009).

O grupo das Unidades de Proteção Integral é composto pelas seguintes categorias de unidades de conservação: (i) Estação Ecológica; (ii) Reserva Biológica; (iii) Parque Nacional; (iv) Monumento Natural; (v) Refúgio da Vida Silvestre. Por sua vez, o grupo das Unidades de Uso Sustentável é composto por: (i) Área de Proteção Ambiental; (ii) Área de Relevante Interesse Ecológico; (iii) Floresta Nacional; (iv) Reserva Extrativista; (v) Reserva de Fauna; (vi) Reserva de Desenvolvimento Sustentável; e (vii) Reserva Particular do Patrimônio Natural.

O Brasil possui um total de 1.343 áreas protegidas ou Unidades de Conservação, das quais, 292 são federais, 308 são estaduais e 743 são particulares. As áreas particulares são designadas Reservas Particulares do Patrimônio Natural (RPPN), sendo sua criação um ato voluntário do proprietário de uma área, que decide transformar toda ou parte desta em uma RPPN, sem que isso ocasione a perda do direito de propriedade. Esse tipo de reserva tem o objetivo de promover a educação ambiental. Em termos de área, as unidades federais cobrem, aproximadamente, 8,2% do território nacional (3,9% com UPI e 4,3% com UUS); as unidades estaduais cobrem 3,5% (1,0% com UPI e 2,5% com UUS) e as unidades particulares (RPPN) 0,06%. Dessa forma, aproximadamente, 11,7% do território brasileiro ou 100 milhões de hectares são dedicados a Unidades de Conservação (FREITAS et al., 2009). O Bioma Amazônia é o que apresenta maior

porcentagem de áreas protegidas (~ 10%), seguida da Mata Atlântica (~2%), e os demais biomas apresentam menos de 1% de áreas protegidas (Figura 1).

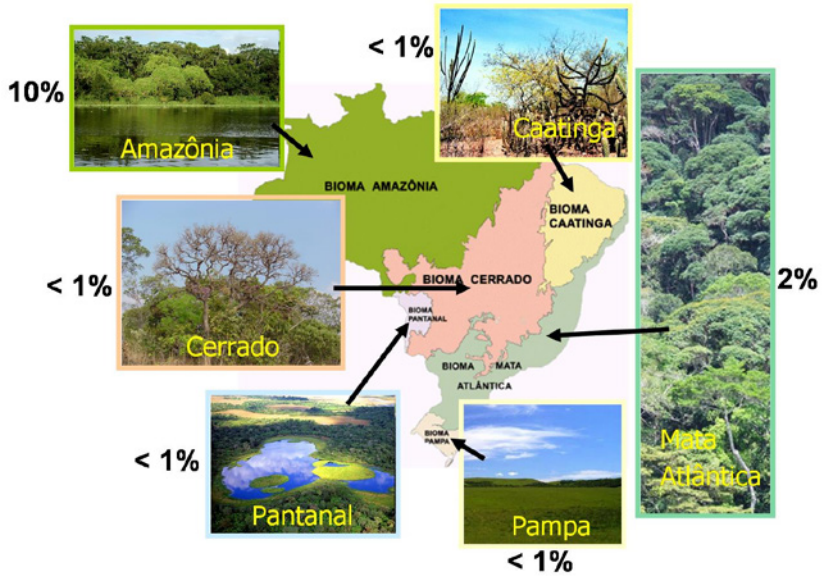


Figura 1. Porcentagem do território dos biomas brasileiros sob proteção em Unidades de Conservação .

Quando pensamos em áreas para conservação da biodiversidade, devemos considerar, também, as áreas de povos indígenas. Atualmente existem 611 reservas de povos indígenas, cobrindo uma área total de, aproximadamente, 106 milhões de hectares – o que corresponde a 12,4% do território nacional. Segundo Freitas et al. (2009), as áreas de povos indígenas apresentam grande importância para a conservação *in situ*, porque, nestas terras, a população indígena preserva suas tradições, incluindo o cultivo de vários recursos genéticos vegetais e, além disso, essas terras servem como unidades de manejo *in situ*, onde recursos naturais tendem a ser manejados de forma mais sustentável.

A conservação *in situ* apresenta algumas vantagens, tais como: (i) permitir que as espécies continuem seus processos evolutivos;

(ii) favorecer a proteção e a manutenção da vida silvestre; (iii) apresentar melhores condições para a conservação de espécies silvestres, especialmente vegetais e animais; (iv) oferecer maior segurança na conservação de espécies com sementes recalcitrantes; e (v) conservar os polinizadores e dispersores de sementes das espécies vegetais. Deve-se considerar, entretanto, que esse método é oneroso, pois, por ser dependente de eficiente e constante manejo e monitoramento, pode exigir grandes áreas, o que nem sempre é possível; além disso, a conservação de uma espécie em um ou poucos locais de ocorrência não significa, necessariamente, a conservação de toda a sua variabilidade genética (BRASIL, 2010).

Conservação *ex situ*

A conservação *ex situ* envolve a manutenção, fora do *habitat*, de uma representatividade da biodiversidade, de importância científica ou econômico-social, inclusive para o desenvolvimento de programas de pesquisa e desenvolvimento, particularmente aqueles relacionados ao melhoramento genético. A conservação *ex situ* é considerada complementar à conservação *in situ*, servindo tanto para conservação de espécies silvestres como para espécies cultivadas. Os principais objetivos da conservação *ex situ* são: (i) permitir que, em apenas um local, sejam reunidos recursos genéticos de muitas procedências, facilitando as ações de pesquisa e desenvolvimento, especialmente o trabalho do melhoramento genético; (ii) assegurar a conservação e a disponibilidade contínua e imediata de recursos genéticos; (iii) preservar espécies que ocorrem em *habitat* ameaçado; (iv) diminuir a erosão genética das espécies; (v) garantir melhor proteção à diversidade intraespecífica, especialmente de espécies de ampla distribuição geográfica; (vi) conservar, no curto, médio e longo prazos, recursos genético com importância atual ou potencial, garantindo a sustentabilidade dos trabalhos de melhoramento genético e, em consequência, o futuro da sociedade.

Existem diferentes estratégias ou metodologias utilizadas para a conservação *ex situ*, podendo-se citar: (i) conservação de sementes, no longo prazo, em câmaras frias a -20 °C; (ii) conservação de sementes, no curto e médio prazos, em câmaras frias a 5 °C; (iii) conser-

vação *in vitro*, via cultura de tecidos; (iv) criopreservação (-150 °C a -196 °C); (v) conservação a campo; (vi) conservação em laboratórios, principalmente no caso de microorganismos; (vii) jardins botânicos; (viii) núcleos de conservação, para o caso de espécies animais. Na Figura 2, ilustram-se esses principais métodos de conservação.

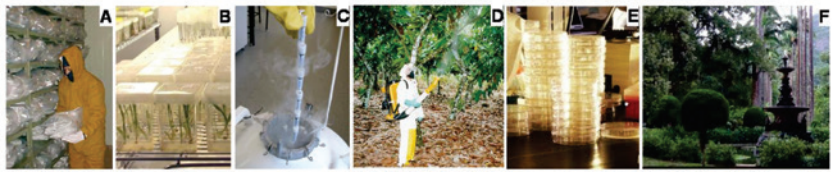


Figura 2. Principais métodos de conservação *ex situ*: (A) câmaras frias; (B) conservação *in vitro*; (C) criopreservação; (D) conservação a campo; (E) conservação em laboratórios; e (F) jardins botânicos.

Por um lado a conservação *ex situ* apresenta algumas vantagens: (i) mantém os recursos genéticos em um espaço pequeno sob cuidado intensivo; (ii) facilita a caracterização e utilização dos recursos genéticos em ações de pesquisa e desenvolvimento; (iii) garante a sobrevivência e a segurança dos recursos genéticos por longos períodos; (iv) garante a sobrevivência e a segurança dos recursos genéticos em ambientes mais protegidos não sujeitos a ação antrópica e condições adversas do meio ambiente; (v) disponibiliza a diversidade máxima do germoplasma de espécies de importância atual e potencial; (vi) em alguns métodos de conservação, mantém material indexado e livre de patógenos, dispensando a quarentena na sua entrada ou saída do país ou da região (ROSA, 2004; NASS et al.; 2001).

Por outro lado , dependendo da estratégia ou metodologia, a conservação *ex situ* apresenta algumas desvantagens: (i) interrupção da evolução quando usadas técnicas que reduzem drasticamente as atividades vitais do germoplasma por longos períodos; (ii) risco de instabilidade genética nas coleções de sementes ortodoxas e *in vitro*; (iii) alto custo de algumas técnicas, como a regeneração no campo de coleções de sementes ortodoxas ou aquelas que requerem mão-de-obra especializada; (iv) alto consumo de eletricidade e equipamentos sofisticados ou o uso de grandes áreas de campo de boa fertilidade por longos períodos; (v) risco de perda de variabilidade genética dos acessos

conservados em virtude da deriva genética (perda aleatória de genes devido à amostragem ou à multiplicação de amostras muito pequenas) ou à pressão de seleção (material geralmente é multiplicado em áreas com condições edafoclimáticas distintas do seu local de coleta) (ROSA, 2004; NASS *et al.*, 2001).

Praticamente, todas as espécies podem ser conservadas *ex situ*, desde que seja possível multiplicá-las, posteriormente. Geralmente, são conservadas *ex situ*: espécies de plantas cultivadas e seus parentes silvestres; espécies que representam amplo e variado espectro de genes que podem ser úteis em programas de melhoramento ou outras atividades tecnológicas importantes para o homem, como as espécies úteis na alimentação e agricultura, incluindo variedades locais de cultura tradicional e variedades, cultivares, linhagens e materiais sintéticos obtidos por programas de melhoramento genético ou pela biotecnologia e engenharia genética.

Entre os métodos de conservação *ex situ*, o armazenamento de sementes em câmaras frias merece um destaque especial, considerando a possibilidade de conservação de grande número de acessos em um pequeno espaço por um período de tempo praticamente ilimitado. Para a conservação de sementes em longo prazo, é necessário manter a atividade respiratória em níveis baixos, através da redução da temperatura ambiente e do grau de umidade das sementes. As sementes são acondicionadas em embalagens herméticas e armazenadas em câmaras frias a -20°C (conservação a longo prazo) ou a +5 °C (conservação no curto e médio prazos). Somente as sementes ortodoxas (por suportarem redução da umidade a 4% e 6% e exposição prolongada a temperatura subzero, -10 °C a -20 °C) podem ser conservadas no longo prazo. No caso de espécies que possuem sementes recalcitrantes ou intermediárias, outras estratégias, como a conservação a campo, devem ser utilizadas. Além do caso das espécies com sementes recalcitrantes e intermediárias, a conservação em campo é também indicada para a conservação de espécies de propagação vegetativa, arbóreas, silvestres, semidomesticadas, heterozigotas, além daquelas que produzem quantidades reduzidas de sementes como as forrageiras (ROSA, 2004).

Segundo Silva et al. (2007), medidas efetivas visando à conservação *ex situ* de recursos genéticos iniciaram há aproximadamente 40 anos, quando a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) reconheceu que a variabilidade de muitas espécies, especialmente cereais, estavam sob risco de perda. Estimativas da FAO indicam que aproximadamente 6 milhões de acessos de germoplasma são conservados em todo mundo e apenas 14% desses acessos são conservados no longo prazo. Os Estados Unidos e a China são os países que detêm o maior número de acessos conservados no longo prazo, com aproximadamente 450 mil e 300 mil, respectivamente (WETZEL, 2006). Esses países também apresentam a maior capacidade para armazenamento de sementes no longo prazo, sendo 2 milhões e 1 milhão, respectivamente (SILVA et al., 2007). Recentemente, essa capacidade mundial de armazenamento de sementes no longo prazo aumentou consideravelmente com a construção do Banco Global de Sementes de Svalbard com capacidade para quatro milhões e quinhentas mil amostras de sementes. O conjunto arquitetônico conta com três câmaras de segurança máxima situadas ao final de um túnel de 125 metros dentro de uma montanha em uma pequena ilha norueguesa do arquipélago de Svalbard, próximo ao Pólo Norte (Figura 3). Essa localização estratégica assegura as baixas temperaturas, mesmo se houver falha no suprimento de energia elétrica.

Figura 3. Banco Global de Sementes de Svalbard.

Fotos: Global Crop Diversity Trust.

No Brasil, a criação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e a consolidação do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA) nos anos 1970 (CABRAL, 2005) foi importante para organi-

zar os esforços voltados para a conservação, caracterização e uso de recursos genéticos (GOEDERT, 2007). O SNPA é formado em parte pela Embrapa, com suas mais de 40 unidades de pesquisa, além de instituições federais e estaduais de pesquisa agrícola, universidades e empresas públicas ou privadas, direta ou indiretamente vinculadas à pesquisa agrícola. A maioria das iniciativas para a conservação de recursos genéticos vegetais, animais e de microorganismos no Brasil foram integradas recentemente à Plataforma Nacional de Recursos Genéticos, liderada pela Embrapa com a participação da grande maioria das outras instituições do SNPA localizadas em vários estados brasileiros (Figura 4). Com a participação de todas essas instituições, 383 Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal são mantidos no Brasil, sendo 140 nas unidades da Embrapa e 243 em outras instituições do SNPA (VALLS et al., 2009). De todos os bancos, 52% conservam apenas espécies exóticas, mostrando a importância dessas espécies para a alimentação e agricultura no Brasil. Valls et al. (2009) realizaram um levantamento de todas as espécies e seus respectivos números de acessos conservados no Brasil no longo prazo (coleção base) e no médio e curto prazos (bancos ativos). Com base nesse levantamento, aproximadamente 170 mil acessos vegetais, incluindo duplicatas, são conservados no Brasil, dos quais 107 mil são conservados no longo prazo (VALLS et al., 2009).

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia possui a infraestrutura responsável pela conservação no longo prazo de sementes de espécies de interesse agronômico, incluindo espécies cultivadas e seus parentes silvestres. Essa coleção de base é composta atualmente por 212 gêneros de 661 espécies diferentes, com um total de 107.249 acessos, sendo, dessa forma, o 6° maior banco de germoplasma conservado em longo prazo do mundo. As culturas com maior número de acessos conservados em longo prazo são a cevada (29.227), feijão (14.069), arroz (9.989) e soja (9.177). Todo o acervo das coleções *ex-situ* é gerenciado pelo Sistema Brasileiro de Informação de Recursos Genéticos (Sibrargen), que integra, compatibiliza, organiza e disponibiliza dados e conhecimentos sobre recursos genéticos estratégicos para o sistema de inovação agropecuária no país (CAJUEIRO et al., 2000).

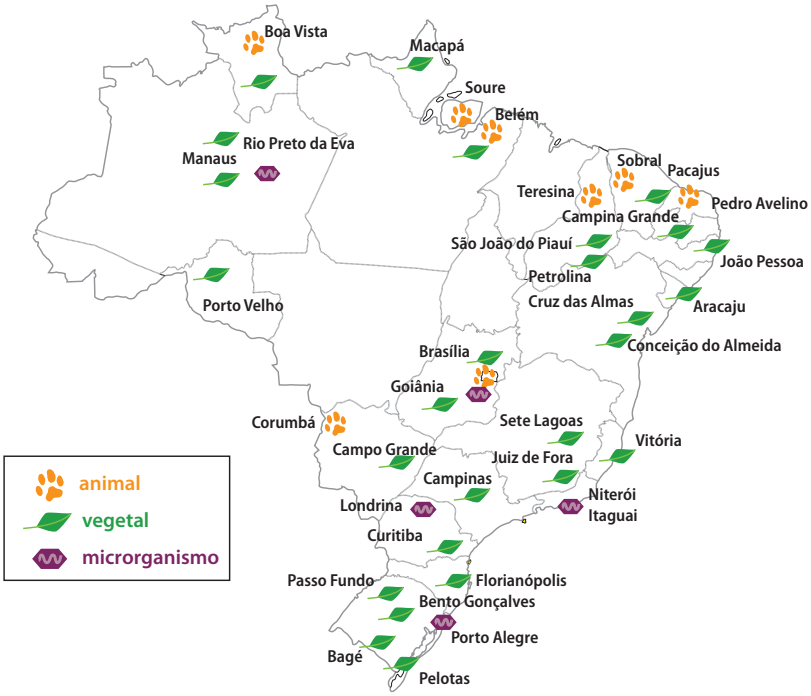


Figura 4. Plataforma Nacional de Recursos Genéticos no Brasil.

Fonte: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Conservação *on farm*

A conservação *on farm* é uma estratégia semelhante à conservação *in situ*, uma vez que também permite que as espécies continuem o seu processo evolutivo, sendo permanentemente submetidas a diferentes condições edafoclimáticas. A conservação *on farm* é uma das formas para a conservação da agrobiodiversidade, que é um termo usado para referir à diversidade de seres vivos, de ambiente terrestres ou aquáticos, cultivados em diferentes estágios de domesticação. Apresenta como particularidade o fato de envolver recursos genéticos, principalmente variedades crioulas, cultivados por agricultores (pequenos agricultores de comunidades locais, tradicionais e populações indígenas) detentores de grande diversidade de recursos genéticos e de um amplo conhecimento sobre eles.

A conservação *on farm* envolve, portanto, recursos nativos e exóticos adaptados às condições locais, que estão em contínuo processo de seleção e de melhoramento genético realizado pelos agricultores. Esses recursos genéticos são de grande importância para a segurança alimentar desses agricultores. Entre os principais recursos genéticos mantidos a campo pelos pequenos agricultores brasileiros estão a mandioca, o milho, o feijão, além de uma série de fruteiras nativas, plantas medicinais e aromáticas e raças locais de animais domesticados (suínos, caprinos e aves, entre outros). Na conservação *on farm*, a estratégia consiste em monitorar e proteger diferentes acessos e diferentes espécies cultivadas em um agroecossistema (FALEIRO, 2010b), podendo ser agrícola, hortícula, florestal, pastoril ou associações entre eles, como no sistema agrosilvopastoril. Acredita-se que, ainda hoje, a maioria dos recursos genéticos nativos do Brasil é conservada *on farm*, ou seja, estão nas propriedades dos agricultores e não nos bancos de germoplasma (CLEMENT et al., 2007).

Assim como a conservação *in situ* e *ex situ*, a conservação *on farm* também apresenta vantagens e desvantagens (BRUSH, 2000; JARVIS et al., 2000; CLEMENT et al., 2007). A principal vantagem está relacionada ao envolvimento dos agricultores no processo de conservação de recursos genéticos. Esse envolvimento vai gerar um comprometimento e interesse dos agricultores, incluindo os jovens que, desde cedo, passarão a se sentir responsáveis pela conservação (CARVALHO et al., 2001). Esse envolvimento e ação dos agricultores farão com que a coleção *on farm* seja constantemente enriquecida com novos recursos genéticos via a evolução em seu meio natural e a domesticação em seu meio social (CLEMENT et al., 2007). Outra vantagem dessa estratégia de conservação é permitir que os recursos genéticos conservados na propriedade rural constituam uma fonte de renda e melhore a qualidade de vida do agricultor com a diversificação da produção e de sua base alimentar. Esses recursos genéticos estarão, assim, sendo conservados com maior interesse e segurança ao longo do tempo, diminuindo a dependência de recursos financeiros limitados e inseguros que, há muito tempo, estão ameaçando todas iniciativas e esforços relacionados à conservação *ex situ*. Como principal desvantagem da conservação *on farm*, podemos citar a sua natureza complexa e dinâ-

mica, o que faz com que sejam altos os riscos de erosão genética e perda de acessos (LOUETTE, 2001). A falta de controle sobre os recursos genéticos relacionada à ação dos agricultores e condições adversas do meio ambiente também é um alto risco à manutenção da variabilidade genética das coleções. Essas desvantagens fazem com que a conservação *on farm* seja uma estratégia para complementar e não substituir a conservação *in situ* e *ex situ*.

Algumas ações de instituições governamentais e sociais podem ser implementadas para promover a conservação *on farm*. Freitas et al. (2009) relatam algumas dessas ações implementadas no Brasil nos últimos anos: (i) melhoramento participativo – é uma metodologia que preconiza a participação efetiva dos agricultores, extensionistas e pesquisadores na seleção de variedades melhoradas para determinada região (VIEIRA et al., 2008); nesse método, vários acessos desenvolvidos pela pesquisa e cultivados localmente pelos agricultores são testados e conservados na propriedade; (ii) feira de sementes – são eventos onde pequenos agricultores de comunidades locais, tradicionais e populações indígenas apresentam experiências com diferentes recursos genéticos e trocam sementes e material propagativo; (iii) Centros Irradiadores de Manejo da Agrobiodiversidade – são instituições implantadas em vários estados do Brasil por iniciativa do governo federal, em parceria com movimentos sociais e organizações não-governamentais. Esses centros possuem como linhas temáticas a produção de sementes crioulas pelas próprias comunidades, o uso de plantas medicinais e aromáticas, a implantação de sistemas agroflorestais e agroextrativistas e o manejo animal alternativo, visando proporcionar a segurança alimentar, a geração de renda e a conservação da agrobiodiversidade; (iv) reconhecimento oficial de populações tradicionais – esse reconhecimento oficial tem como objetivo promover o desenvolvimento sustentável dos povos e comunidades tradicionais com ênfase no reconhecimento, fortalecimento e garantia dos seus direitos territoriais, sociais, ambientais, econômicos e culturais. Entre outras expectativas, espera-se, com tal reconhecimento, aumentar a demanda pela conservação de recursos genéticos de cultivo local com vistas à produção sustentável.

Caracterização de recursos genéticos

Para que a variabilidade genética de recursos genéticos de espécies cultivadas e silvestres conservada nos bancos de germoplasma seja utilizada e aproveitada de forma prática, atividades de caracterização e avaliação são essenciais, sendo uma importante demanda para a pesquisa científica. A falta de dados de caracterização e avaliação dos recursos genéticos conservados em bancos de germoplasma é uma das principais causas do baixo uso desses materiais genéticos (SLOTEN, 1987; VALLS, 2007). Estimativas de Holden (1984) mostraram que 65% dos acessos não apresentavam dados de passaporte, 80% não apresentavam caracterização morfológica e 95% não apresentavam avaliação agronômica. Segundo Valls (2007), a falta de dados pode ser contornada pela organização da informação já disponível, pela tomada disciplinada de observações de maior interesse dos usuários e pela divulgação adequada dessa informação.

Diferentes grupos de características são utilizados na caracterização e avaliação de recursos genéticos, destacando-se as características ecológicas, morfológicas, agronômicas e moleculares.

As características ecológicas referem-se àquelas obtidas com base no local de coleta de determinado acesso. Dados de passaporte podem conter importantes características ecológicas de cada material genético. O conhecimento das condições ecogeográficas dos locais de coleta do germoplasma fornece um indicativo do processo de adaptação a que o acesso foi submetido, e do seu possível comportamento agronômico e biológico *(*HAWTIN et al. 1996). A idéia de se utilizar esse tipo de informação é relativamente nova e os descritores obtidos por essa via tem sido denominados, genericamente, de descritores ecológicos (STEINER; GREENE, 1996). Com base no Sistema de Informação Geográfica, quando as coordenadas do local de coleta são disponíveis, é possível inferir sobre as informações ecogeográficas dos acessos, pela possibilidade de associar os locais de coleta com dados de clima, vegetação, solo, pluviometria local, entre outros dados geográficos disponíveis em forma de mapas que podem ser sobrepostos aos locais de coleta (COSTA et al., 2005). Na Figura 5, ilustra-se o procedimento de obtenção de descritores ecológicos com base na sobreposição de mapas de informações geográficas ao ponto de coleta do acesso.

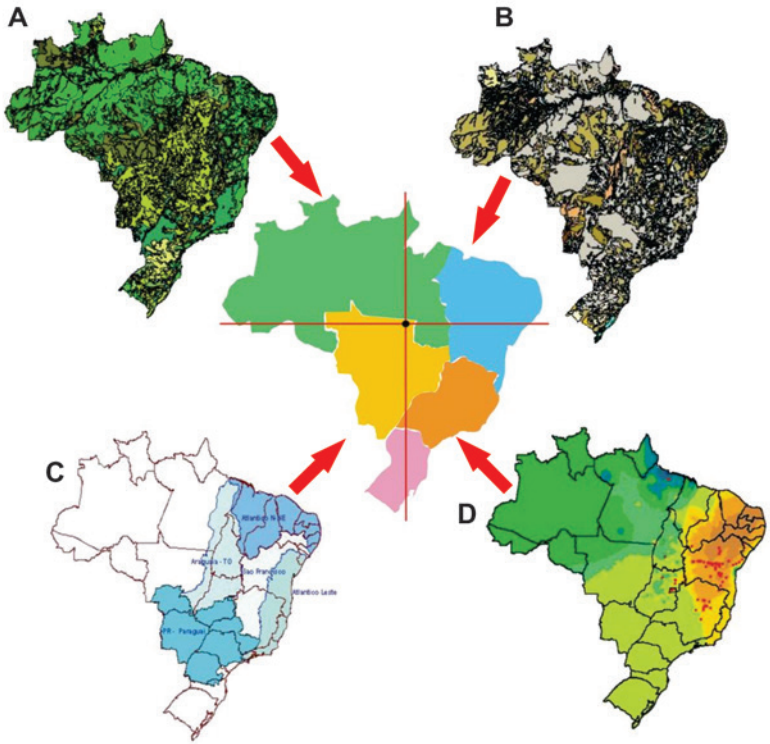


Figura 5. Exemplos de mapas do Sistema de Informação Geográfica do Brasil utilizados para obtenção de descritores ecológicos baseados no ponto de coleta: (A) tipos de vegetação; (B) solos; (C) bacias hidrográficas; e (D) pluviometria.

As características morfológicas são aquelas relacionadas aos caracteres botânicos de alta herdabilidade, facilmente visíveis ou mensuráveis e que se expressam consistentemente em todos os ambientes (WILLIAMS, 1984). Existe uma grande variabilidade morfológica entre as espécies e entre acessos da mesma espécie, considerando o porte da planta e as características das raízes, folhas, flores e frutos. Muitas vezes, características morfológicas podem subsidiar o uso prático de determinado acesso ou espécie. Por exemplo, a beleza e a natureza exótica de uma flor pode dar uma boa ideia do seu potencial ornamental, a coloração mais intensa da polpa do fruto pode dar

uma ideia do potencial funcional daquele material genético e a forma e tamanho do fruto pode dar uma ideia do seu potencial agronômico para consumo in natura. Na Figura 6, ilustra-se uma pequena parte da variabilidade genética do gênero *Passiflora*, com base na morfologia das flores e dos frutos.

Figura 6. Exemplos de características morfológicas de flores e frutos do gênero *Passiflora*.

As características agronômicas compreendem aquelas que fornecem informações sobre o desempenho agronômico de uma espécie ou de um acesso. Por exemplo, um acesso pode possuir maior desempenho agronômico que outro porque é mais resistente a várias doenças ou a várias raças do patógeno causador daquela doença. Além da resistência a doenças, outras características agronômicas apresentam grande importância como as relacionadas ao vigor vegetativo, produtividade, épocas de florescimento e sensibilidade ao fotoperíodo, adaptabilidade a diferentes ecossistemas, tamanho do fruto, rendimento e características químicas da polpa, resistência e tolerância a insetos-praga, entre outras. Geralmente, as características agronômicas são quantitativas, governadas por um conjunto de genes e fortemente

influenciadas pelas condições ambientais. Nesse sentido, a montagem de experimentos com repetições, em diferentes ambientes, utilizando delineamentos para o controle ambiental, é de grande importância no processo de caracterização e avaliação do recurso genético. Muitas vezes, a importância prática dos recursos genéticos depende de uma adequada caracterização e avaliação das características agronômicas. Na Figura 7, ilustram-se algumas características agronômicas de acessos de maracujazeiro.

Figura 7. Avaliação de características agronômicas do maracujazeiro.

As características moleculares pertencem a um grupo de características que teve um grande desenvolvimento nos últimos anos. Tecnologias modernas de análise molecular permitem a geração de marcadores genético-moleculares diretamente no DNA. Entre as vantagens dos marcadores moleculares, pode-se citar a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos, a identificação direta do genótipo sem influência do ambiente, a possibilidade de detecção em qualquer estádio do desenvolvimento da planta ou a partir de cultura de células ou tecidos e a possibilidade de gerar

maior quantidade de informação genética por loco no caso de marcadores co-dominantes. Com base nas características moleculares geradas pelos polimorfismos do DNA dos diferentes acessos ou espécies do banco de germoplasma, várias informações podem ser obtidas (FALEIRO, 2007). Na Figura 8, ilustram-se alguns marcadores moleculares e informações geradas com base em características moleculares.

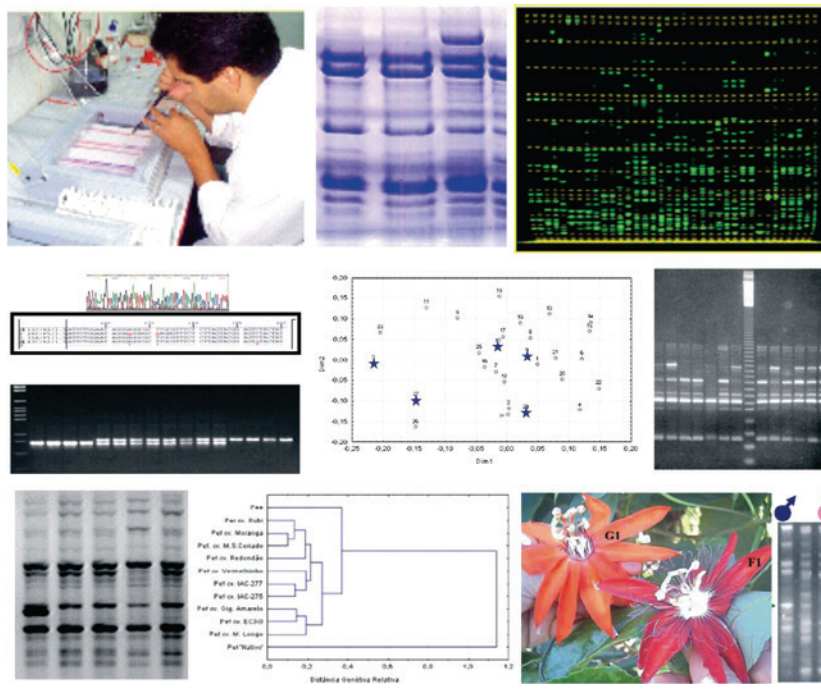


Figura 8. Obtenção de polimorfismos e informações baseadas em marcadores moleculares do DNA.

Além dos marcadores moleculares do DNA, também podem ser incluídas no grupo das características moleculares, aquelas obtidas com base na caracterização citogenética como as análises de cariótipo, bandeamento cromossômico e hibridização *in situ* (PEÑALOZA; POZZOBON, 2007) e aquelas obtidas com base na caracterização química e bioquímica como compostos fenólicos, terpenoides, alcaloides, entre outros metabólitos secundários e substâncias bioativas com potencial econômico (VIEIRA; AGOSTINI-COSTA, 2007).

Os diferentes grupos e as diferentes características são utilizados nas diferentes etapas do processo de caracterização e avaliação. Segundo Valls (2007), esse processo passa por cinco etapas subsequentes, correlatas e complementares:

a) Identificação botânica: dependendo da espécie, essa etapa é mais difícil do que geralmente é considerada, uma vez que a taxonomia das plantas é, muitas vezes, confusa e exige alta especialização, principalmente quando o germoplasma inclui várias espécies silvestres com diferentes taxa e variedades botânicas (VALLS, 2007).
b) Elaboração do cadastro de acessos disponíveis: nessa etapa, são obtidos os chamados descritores de passaporte para cada acesso, os quais são baseados nas informações de origem (nome, procedência, códigos etc.) e local de coleta (coletor, coordenadas geográficas, características ecológicas etc.).
c) Caracterização: consiste na obtenção das características morfológicas ou da lista de descritores. Existe, na literatura mundial, um grande número de listas e de descritores para as mais diferentes espécies. A eficiência dessas listas na diferenciação dos acessos e sua importância na atribuição de valor prático ao germoplasma têm sido discutida (ONYILAGHA, 1986; FRANKEL; BROWN, 1984; VALLS, 2007).
d) Avaliação preliminar: nessa etapa, inicia-se a obtenção de características agronômicas, principalmente aquelas que podem ser obtidas para maior número de acessos em determinada condição ambiental. A caracterização reprodutiva da espécie (ocorrência de autogamia, alogamia, cleistogamia, apomixia etc.) é um exemplo. A caracterização da fenologia ou das fenofases da espécie (período de germinação, brotação, florescimento, desfolhação, maturação etc.) também pode ser iniciada nessa etapa e finalizada na etapa seguinte.
e) Avaliação aprofundada ou complementar: nessa etapa, são obtidas as demais características agronômicas ou não, relacionadas a características adaptativas e de desempenho agronômico altamente influenciadas pelo ambiente. Nesse caso, são necessários experimentos de avaliação com delineamentos estatísticos,

repetições, em vários ambientes e em vários anos, de modo que o número de acessos a serem avaliados é reduzido. As informações obtidas nessa última etapa são mais caras e difíceis de serem obtidas, entretanto são aquelas que mais facilitam ou dão subsídios para a utilização prática dos recursos genéticos.

Uso dos recursos genéticos

Segundo Guimarães (2006), a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) está realizando um levantamento mundial das capacidades dos países em utilizar recursos fitogenéticos para a agricultura e alimentação. O resultado desse levantamento no Brasil é relatado por Albuquerque e Nass (2009). Segundo esses autores, o uso de acessos disponíveis em bancos de germoplasma é limitado em todo mundo, incluindo o Brasil, especialmente considerando a ampla diversidade disponível. As principais causas dessa baixa utilização são a falta de adequada documentação e descrição das coleções, a falta de informação útil aos programas de melhoramento genético, falta de atividades de avaliação preliminar e aprofundada dos acessos, limitada adaptação dos acessos, número limitado de melhoristas principalmente em países em desenvolvimento, baixa quantidade e qualidade de sementes disponíveis devido a inadequados sistemas de regeneração e multiplicação, troca de germoplasma entre os melhoristas, que, geralmente, utilizam apenas a variabilidade genética encontrada em materiais elite, dificuldade de identificação de genes potencialmente úteis em acessos silvestres e dificuldade de transferência desses genes para acessos elite em razão da falta de compatibilidade genética e necessidade de grande número de ciclos de seleção e recombinação para recuperação do genoma elite, mantendo-se o gene de interesse.

Essas últimas causas da baixa utilização de recursos genéticos têm sido amenizadas com as chamadas atividades de pré-melhoramento. A palavra pré-melhoramento foi traduzida a partir de termos vindos do inglês como *pre-breeding, introgression breeding, genetic base broadening* ou *germplasm enhancement* (FÁVERO et al., 2008). Pode-se definir pré-melhoramento como sendo atividades que visam à identificação de genes e características de interesse em germoplasma exótico

ou em populações que não foram submetidas a qualquer processo de melhoramento (parentes silvestres e raças locais), e sua posterior incorporação em materiais elites agronomicamente adaptados (NASS; PATERNIANI, 2000). Pode-se dizer então que o pré-melhoramento é a "ponte" entre as atividades de recursos genéticos e os programas de melhoramento (NASS et al., 2001). É usado para definir a fase do desenvolvimento do germoplasma em materiais mais atrativos aos melhoristas (FÁVERO et al., 2008).

Além da importância como elo entre os recursos genéticos vegetais e o melhoramento genético, as atividades de pré-melhoramento podem identificar genes e características para composição de bancos de caracteres e funções biológicas (LOPES et al., 2007; NASS et al., 2007). Esses bancos podem alimentar programas biotecnológicos, como aqueles baseados em genômica funcional, manipulação gênica e transgenia e, também, alimentar programas envolvendo a diversificação e agregação de valor à agricultura, na forma de novos alimentos, de fibras, de aromas, de biomateriais e de novas variedades com valor ornamental, funcional e medicinal.

O sucesso do pré-melhoramento envolve, pelo menos, duas fases – a primeira, o conhecimento de genes ou características potencialmente úteis de espécies silvestres, germoplasma exótico ou de populações não-melhoradas; e a segunda, a sua utilização prática com a incorporação em materiais-elite agronomicamente adaptados com características comerciais prontamente utilizadas na agricultura. Faleiro et al. (2008) relatam, de forma sintética, algumas experiências de sucesso do pré-melhoramento de plantas, tendo como base os resultados apresentados no I Curso Internacional de Pré-melhoramento de Plantas (LOPES et al., 2006) e nas experiências do Programa de Melhoramento do Maracujazeiro, cujas atividades têm contribuído de forma decisiva para o lançamento de novas variedades e híbridos. Além da experiência com o maracujazeiro, exemplos de sucesso são relatados com o milho, café, arroz, amendoim, mandioca, hortaliças, citrus e fruteiras nativas (FALEIRO et al., 2008). Importantes estudos de caso envolvendo o uso de recursos genéticos também são relatados no levantamento de Albuquerque e Nass (2009) para a soja (OLIVEIRA et al., 2009), espécies do gênero *Prunus* (RASEIRA et al., 2009), maracuja-

zeiro (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2009); pupunha (CLEMENT, 2009), curcubitáceas (QUEIROZ, 2009), arroz (PEREIRA, 2009; RANGEL et al., 2009), mandioca (ALVES, 2009; FUKUDA, 2009; BRANCO, 2009) e fruteiras arbóreas do Sul do Brasil (CASTRO et al., 2009).

Considerando os vários exemplos de sucesso citados acima, existe uma grande variabilidade genética com utilidade atual e potencial para programas de melhoramento genético provenientes de acessos elite e silvestres. Várias características de interesse são encontradas nos recursos genéticos conservados em bancos de germoplasma como resistência a pragas e doenças; adaptação a baixas latitudes, colheita mecanizada, diferentes sistemas de cultivo e condições edafoclimáticas; arquitetura e porte da planta; cor, forma, sabor de frutos e grãos; eficiência na absorção e utilização de nutrientes; qualidade nutricional e funcional; qualidade e teor de proteínas, óleo e vitaminas; tolerância à seca e ao alumínio; qualidade pós-colheita; maiores produtividades etc.

Essa rica base genética disponível é a munição para os programas de melhoramento, os quais são de grande importância para o agronegócio brasileiro e mundial. Queiroz e Lopes (2007) relatam os importantes impactos da pesquisa em recursos genéticos e melhoramento vegetal na evolução da agricultura brasileira nos últimos 50 anos com o desenvolvimento de cultivares e grande diversidade de plantas adaptadas às condições tropicais, citando vários exemplos em várias culturas como o milho, soja, feijão, olerícolas, fruteiras temperadas e tropicais, café, eucalipto entre outras.

Experiências na Embrapa Cerrados com a conservação, caracterização e uso de recursos genéticos: estudo de caso

Na Embrapa Cerrados, existem várias coleções de germoplasma, envolvendo coleções ativas, coleções nucleares e coleções de trabalho. Na Figura 9, ilustram-se alguns dos principais produtos cujos recursos genéticos são conservados, caracterizados, avaliados e utilizados na Embrapa Cerrados.

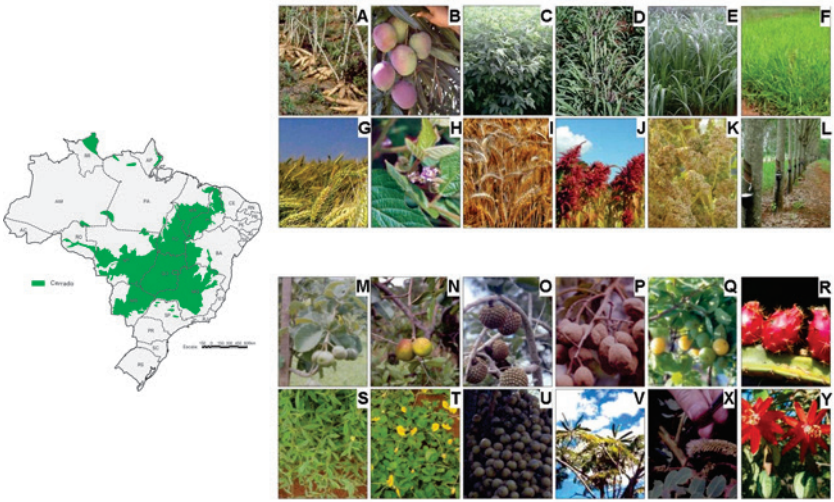


Figura 9. Principais recursos genéticos conservados, caracterizados, avaliados e utilizados na Embrapa Cerrados, envolvendo materiais exóticos ou nativos de outras regiões do Brasil [(A) mandioca; (B) manga; (C) feijão guandu; (D) capim colonião; (E) capim elefante; (F) brachiaria; (G) trigo; (H) soja; (I) cevada; (J) amaranto; (K) quinoa; e (L) seringueira (L)] e nativas do Cerrado [(M) pequi; (N) mangaba; (O) araticum; (P) baru; (Q) cagaita; (R) pitaya; (S) estilosantes; (T) amendoim forrageiro; (U) macaúba; (V) faveira; (X) barbatimão; e (Y) maracujás silvestres].

A utilização dos recursos genéticos ilustrados na Figura 9 está relacionada à diversificação dos sistemas de produção com espécies exóticas (amaranto, quinoa, entre outras) e com espécies da rica biodiversidade do Cerrado como as fruteiras nativas (pequi, mangaba, araticum, baru, cagaita, pitaya, entre outras), como novas opções de forrageiras (estilosantes, amendoim forrageiro, entre outras), como fontes alternativas para produção de bioenergia (macaúba, entre outras), como plantas medicinais (barbatimão, faveira, maracujazeiro silvestre, entre outras), como plantas ornamentais (maracujazeiro silvestre, entre outras). Alguns recursos genéticos estudados na Embrapa Cerrados são importantes para programas de melhoramento como vários acessos de mandioca, manga, gramíneas e leguminosas forrageiras, trigo, cevada, soja, seringueira e maracujá.

No caso das espécies nativas do Cerrado, a utilização dos recursos genéticos está passando, primeiramente, por um processo de domesticação e ajustes de sistemas de produção (JUNQUEIRA et al., 2008b). No caso do maracujazeiro, a utilização dos recursos genéticos envolvendo a variabilidade genética interespecífica e intraespecífica tem o objetivo de diversificar sistemas de produção e fornecer genes importantes para programas de melhoramento genético, considerando a uso diversificado do maracujá (FALEIRO et al., 2005; FALEIRO et al., 2006; FALEIRO et al., 2008) (Figura 10).

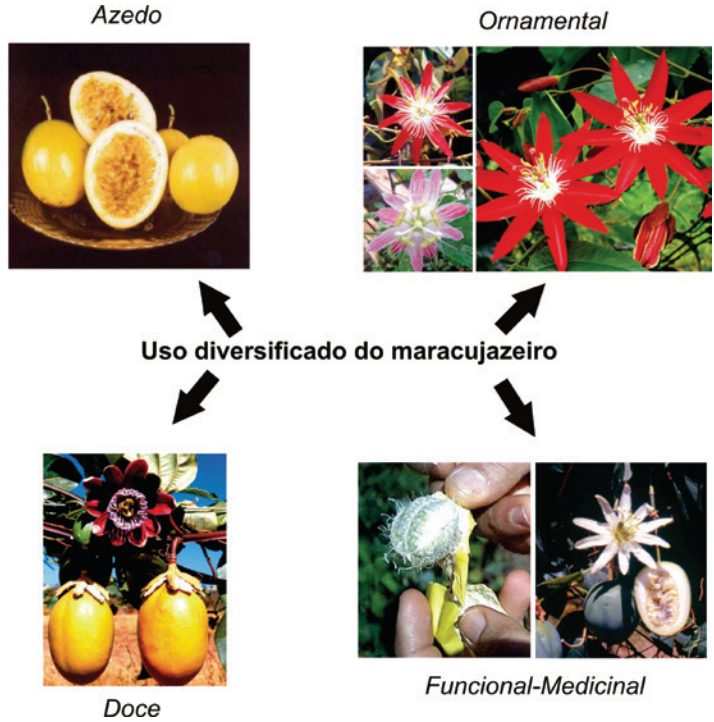


Figura 10. Uso diversificado do maracujazeiro.

Para que a variabilidade genética de espécies silvestres seja utilizada e aproveitada em programas de melhoramento, torna-se necessário a realização de hibridações intraespecíficas ou o uso da biotecnologia moderna na obtenção de híbridos somáticos ou na utilização da tecnologia do DNA recombinante e engenharia genética. No programa

de melhoramento genético do maracujazeiro realizado na Embrapa Cerrados, híbridos interespecíficos de *P. edulis* com *P. setacea*, *P. coccinea* e *P. caerulea*, entre outras, têm sido obtidos com sucesso (JUNQUEIRA et al., 2005; JUNQUEIRA et al., 2008a).

Avaliações agronômicas de germoplasma silvestre de *Passiflora* têm mostrado o potencial das espécies *P. actinia*, *P. setacea* e *P. coccinea* para resistência a viroses (Figura 11A), das espécies *P. odontophylla*, *P. gibertii*, *P. caerulea*, *P. serrato-digitata*, *P. actinia*, *P. mucronata* e alguns acessos de *P. edulis* e *P. nitida* para resistência à bacteriose e das espécies *P. serrato-digitata*, *P. gibertii*, *P. coccinea*, *P. actinia*, *P. setacea*, *P. nitida*, *P. caerulea* e alguns acessos de *P. edulis* para resistência à antracnose. Além da resistência a doenças e a algumas pragas, há espécies autocompatíveis como a *P. tenuifila*, *P. elegans*, *P. capsularis*, *P. villosa*, *P. suberosa*, *P. morifolia* e *P. foetida*. Há espécies como a *P. setacea* e *P. coccinea* que, nas condições da região Central do Brasil, comportam-se como planta de "dias curtos", pois florescem e frutificam durante o período de dias curtos do ano, e a colheita ocorre de agosto a outubro, época da entressafra do maracujá-azedo comercial. A tolerância ao frio verificada em *P. caerulea* e *P. incarnata* também é uma característica de grande interesse para o melhoramento genético do maracujazeiro. Outra característica observada em algumas espécies silvestres, relatada por Junqueira et al. (2006a), é a presença de androginóforo mais curto, que reduz a altura dos estigmas em relação à coroa, facilitando a polinização por insetos menores. Em alguns acessos de maracujá roxo silvestre e *P. odontophylla*, no momento de máxima curvatura do estilete, os estigmas chegam a tocar na coroa (Figura 11B), podendo, dessa forma, serem polinizados por abelhas que são consideradas pragas importantes por transportarem todo o pólen e não fazerem a polinização de forma eficaz. Espécies silvestres também podem ser utilizadas quando se deseja melhorar características físicas, químicas ou sensoriais da polpa do maracujá para novas opções de mercado, seja como fruta exótica ou para incrementar propriedades funcionais. Nesse sentido, a *P. caerulea* e acessos silvestres de *P. edulis* têm apresentado potencial para deixar mais avermelhada a polpa do maracujazeiro-azedo comercial, melhorando suas propriedades funcionais (Figura 11C).

Figura 11. Características de espécies silvestres de maracujazeiro úteis para o melhoramento genético: (A) resistência a doenças; (B) androginóforo mais curto que reduz a altura dos estames e estigmas em relação à coroa, facilitando a polinização por pequenos insetos; e (C) coloração vermelha da polpa contendo maior quantidade de vitaminas e substâncias antioxidantes.

Em pesquisas realizadas na Embrapa Cerrados, estudos sobre compatibilidade genética, índices de cruzabilidade, período da antese, período da viabilidade de pólen e da receptividade do estigma têm permitido, por meio de cruzamentos artificiais, a obtenção de vários híbridos interespecíficos férteis e promissores para o programa de melhoramento genético (JUNQUEIRA et al., 2008a). Híbridos envolvendo três ou mais espécies também têm sido obtidos com o objetivo de piramidar diferentes genes de resistência a doenças, sendo exemplos o híbrido *P. coccinea* X *P. setacea* X *P. edulis* e o híbrido *P. setacea* X *P. coccinea* X *P. mucronata* X *P. edulis*. Após a obtenção do híbrido interespecífico, trabalhos de melhoramento genético têm sido realizados para recuperar as características comerciais mantendo-se os genes de resistência. O método dos retrocruzamentos auxiliados por marcadores moleculares do DNA tem sido utilizado (FALEIRO et al., 2007; FONSECA et al., 2009). Na Figura 12, ilustra a recuperação do genoma recorrente a partir do cruzamento base entre *P. edulis* e *P. setacea*.

Figura 12. Plantas RC do cruzamento inicial entre *P. edulis* e *P. setacea*, ilustrando a recuperação do genoma recorrente.

Entre os híbridos interespecíficos que estão sendo obtidos, destaque especial deve ser dado ao híbrido *P. coccinea* X *P. setacea*. Esse híbrido foi lançado como o primeiro híbrido ornamental de maracujazeiro no Brasil, BRS Estrela do Cerrado. Trabalhos de seleção em populações RC obtidas do retrocruzamento desse híbrido com *P. coccinea* e *P. setacea* permitiram a obtenção de mais dois híbridos ornamentais de maracujá, BRS Rubiflora e BRS Roseflora, respectivamente (Figura 13). Outros produtos tecnológicos obtidos a partir do trabalho básico de pré-melhoramento do maracujazeiro são os híbridos BRS Sol do Cerrado, BRS Gigante Amarelo e BRS Ouro Vermelho. A utilização de acessos silvestres de *P. edulis* na base dos cruzamentos permitiu a obtenção de materiais genéticos com a coloração de polpa mais avermelhada e menos dependentes da polinização artificial. Outro híbrido muito promissor obtido pelo programa de melhoramento realizado na Embrapa Cerrados envolve as espécies *P. caerulea* e *P. edulis*. A partir do cruzamento base, trabalhos de retrocruzamentos e seleção para coloração avermelhada da polpa estão sendo feitos. Plantas RC têm apresentado a coloração da polpa mais avermelhada e bons níveis de produtividade.

Figura 13. Capa dos folderes técnicos dos híbridos de maracujazeiro-ornamental lançados em 2007 e híbridos de maracujazeiro azedo lançados em 2008.

Também merecem um destaque os híbridos interespecíficos envolvendo as espécies *P. nitida*, *P. setacea* e *P. coccinea*. O potencial desses materiais está relacionado à sua utilização como porta-enxertos. Esses porta-enxertos podem ser obtidos por estaquia ou sementes. Junqueira et al. (2006b) observaram aumentos de produtividade do maracujazeiro-azedo enxertados em *P. nitida*. Além da utilidade dos híbridos, algumas espécies silvestres têm potencial para consumo in natura, considerando suas propriedades como alimento funcional. Dentro dessa linha, o programa de melhoramento realizado na

Embrapa Cerrados tem trabalhado com seleção de populações de *P. alata*, *P. setacea* e de *P. nitida* (Figura 14), objetivando o aumento do tamanho do fruto para o mercado de frutas frescas (maracujá doce) e para produção de matéria-prima para produção de doces e sorvetes.

Figura 14. Espécies de maracujás doce: (A) *Passiflora alata*; (B) *Passiflora setacea;* e (C) *Passiflora nitida*.

A exploração de todo potencial das espécies silvestres de maracujazeiro envolve trabalhos de pesquisa básica nas áreas de conservação, caracterização e avaliação dos recursos genéticos e pesquisa aplicada voltada para o melhoramento genético. A integração entre as atividades relacionadas à conservação e caracterização de recursos genéticos, atividades de pré-melhoramento e também atividades de melhoramento e pós-melhoramento estão permitindo a utilização prática dos recursos genéticos, contribuindo efetivamente para o desenvolvimento variedades, híbridos e outros produtos tecnológicos.

Considerações finais

As atividades relacionadas à conservação, caracterização e uso de recursos genéticos são estratégicas para a soberania nacional e para toda humanidade, sendo um grande desafio para a pesquisa básica e aplicada, considerando a complexidade e o grande potencial dos recursos genéticos para ampliar a base da cadeia alimentar do homem e dos animais domésticos, além de atender outras necessidades relaciona-

das à bioenergia, vestuário, medicamentos, ornamentação, habitação entre outras utilidades, muitas das quais subestimadas. Para o sucesso das atividades relacionadas aos recursos genéticos, é essencial o fortalecimento e a consolidação de redes de pesquisas transdisciplinares e multinstitucionais para formação de recursos humanos, articulação de parcerias, otimização dos recursos financeiros e humanos e para facilitar e intensificar o intercâmbio de germoplasma e informações.

Referências

ALBUQUERQUE, A. C. S.; NASS, L. L. The state of use. In: MARIANTE, A. S.; SAMPAIO, M. J. A.; INGLIS, M. C. V. (Ed.). The **state of Brazil´s plant genetic resources**: second national report: conservation and sustainable utilization for food and agriculture. Brasília, DF: Embrapa Technological Information, 2009. p. 81-129.

ALVES, A. A. C. Preservation and use of wild *Manihot* species. In: MARIANTE, A.S.; SAMPAIO, M. J. A.; INGLIS, M. C. V. (Ed.). **The state of Brazil´s plant genetic resources:** second national report: conservation and sustainable utilization for food and agriculture. Brasília, DF: Embrapa Technological Information, 2009. p. 114-115.

BRANCO, L. C. C. Utilization of spontaneous mutations in *Manihot esculenta* for the improvement of nutritional quality of cassava roots. In: MARIANTE, A. S.; SAMPAIO, M. J. A.; INGLIS, M. C. V. (Ed.). **The state of Brazil´s plant genetic resources**: second national report: conservation and sustainable utilization for food and agriculture. Brasília, DF: Embrapa Technological Information, 2009. p. 120-122.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. **Conservação** in situ, ex situ **e** on farm**.** Disponível em: http://www.mma.gov.br/sitio/ index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=89&idConteudo=8142 Acesso em: 30 jan. 2010.

BRUSH, S. B. (Ed.). **Genes in the field: on-farm conservation of crop diversity**. Boca Raton: F. L. Lewis Publ.,International Development Research Centre, International Plant Genetic Resources Institute, 2000. 288 p.

CABRAL, J. I. **O sol da manhã:** memória da Embrapa**.** Brasília, DF: UNESCO, 2005, 344 p.

CAJUEIRO, E. V. M.; COSTA, I. R. S.; MONTEIRO, J. S. Sistema Brasileiro de Informação de Recursos Genéticos – Sibrargen. In: CAVALCANTI, T. B.; WALTER, B. M. T. (Org.). **Tópicos atuais em botânica.** Brasília, DF: SBB: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p. 129-132.

CARVALHO, P. C. L. de; SOARES-FILHO; W. dos S.; RITZINGER, R.; CARVALHO, J. A. B. S. Conservação de germoplasma de frutíferas tropicais com a participação do agricultor. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 730-734, 2001.

CASTRO, M. C.; RASEIRA, M. C. B.; VIZZOTO, M.; KROLOW, A. C. The use of native Southern Brazilian fruit tree genetic resources. In: MARIANTE, A. S.; SAMPAIO, M. J. A.; INGLIS, M. C. V. (Ed.) **The state of Brazil´s plant genetic resources**: second national report: conservation and sustainable utilization for food and agriculture.Brasília, DF: Embrapa Technological Information, 2009. p. 123-124.

CLEMENT, C. R.; ROCHA, S. F. R.; COLE, D. M.; VIVAN, J. L. Conservação *on farm*. In: NASS, L. L. (Ed.) **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 511-544.

CLEMENT, C. R. The use of native genetic resources and conventional knowledge in peach-palm breeding (*Bactris gasipaes,* Palmae). In: MARIANTE, A. S.; SAMPAIO, M. J. A.; INGLIS, M. C. V. (Ed.) **The state of Brazil´s plant genetic resources**: second national report: conservation and sustainable utilization for food and agriculture. Brasília, DF: Embrapa Technological Information, 2009. p. 106-109.

COSTA, A. M.; FALEIRO, F. G.; KARIA, C. T.; SHIRATSUCHI, L. S.; ANDRADE, R. P.; LOPES, G. K. B. Variabilidade genética e ecológica de *Stylosanthes macrocephala* determinadas por RAPD e SIG. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 9, p. 899-909. 2005.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro – desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá**: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 187-210.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá:** demandas para a pesquisa. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2006. 54 p.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; JUNQUEIRA, K. P.; BELLON, G.; FONSECA, K. G.; PEIXOTO, J. R. Cruzamentos inter-específicos e retrocruzamentos visando à resistência do maracujazeiro a doenças. In:CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 4., 2007, São Lourenço. **Anais...** São Lourenço: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2007. 1 CD-ROM. 4 p.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. Passion fruit (*Passiflora* spp.) improvement using wild species. In: MARIANTE, A. S.; SAMPAIO, M. J. A.; INGLIS, M. C. V. (Ed.). The state of Brazil´s plant genetic resources: second national report: conservation and sustainable utilization for food and agriculture. Brasília, DF: Embrapa Technological Information, 2009. p. 101-106.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FÁVERO, A. P.; LOPES, M. A. Pré-melhoramento de plantas: experiências de sucesso. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L.; RIBEIRO JÚNIOR, W. Q. **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento**: estratégias e desafios. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2008. p. 43-62.

FALEIRO, F. G. **Banco de germoplasma flor da paixão.** Portal Toda Fruta, 2010a. (Artigo técnico). Disponível em:< http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=17091>. Acesso em: 30 jan. 2010.

FALEIRO, F. G. **Preservação da variabilidade genética de plantas: um grande desafio.** Boletim Pecuário. 2010b. (Artigo Técnico). Disponível em: <.> Acesso em: 30 de jan. 2010.

FAVERO, A. P.; LOPES, M. A.; FALEIRO, F. G. Estado da arte do pré-melhoramento de espécies vegetais. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L.; RIBEIRO JUNIOR, W. Q. **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios.** Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2008. p. 29-42.

FONSECA, K. G.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; PEIXOTO, J. R.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, K.P.; SANTOS, E. C. Análise da recuperação do genoma recorrente em maracujazeiro-azedo com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura,** v. 31, n. 1, p. 145-153. 2009.

FRANKEL, O.; BROWN, A.H.D. **Plant genetic resources today: a critical reappraisal.** In: Holden, J.H.W.; Williams, J.T. (Eds.) Crop genetic resources: conservation and evaluation. London: G. Allen & Unwin, 1984. p. 249-257.

FREITAS, F. O.; MEDEIROS, M. B.; CLEMENT, C. R. *In situ* management of plant genetic resources. In: MARIANTE, A. S.; SAMPAIO, M. J. A.; INGLIS, M. C. V. (Ed**.). The state of Brazil´s plant genetic resources**: second national report: conservation and sustainable utilization for food and agriculture. Brasília, DF: Embrapa Technological Information, 2009. p. 51-64.

FUKUDA, W. M. G. Use of Brazilian genetic diversity in cassava breeding program. In: MARIANTE, A. S.; SAMPAIO, M. J. A.; INGLIS, M. C. V. (Ed.) **The state of Brazil´s plant genetic resources**: second national report: conservation and sustainable utilization for food and agriculture. Brasília, DF: Embrapa Technological Information, 2009. p. 116-119.

GOEDERT, C. O. Histórico e avanços em recursos genéticos no Brasil. In: NASS, L.L. (Ed.) **Recursos genéticos vegetais.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Brasília, DF. 2007. p. 23-60.

GUIMARÃES, E. P. Iniciativas globais de capacitação em pré-melhoramento e melhoramento vegetal e ações da FAO para promoção do uso de recursos genéticos para alimentação e agricultura. In: LOPES, M. A.; FÁVERO, A. P.; FERREIRA, M. A. J. F.; FALEIRO, F. G. (Ed.) **Curso Internacional de pré-melhoramento de plantas.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. p. 27-29. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 185).

HAWTIN, G.; IWANAGA, M.; HODGKIN, T. Genetic resource in breeding for adaptation. **Euphytica,** v. 92, p. 255-266, 1996.

HOLDEN, J. H. W. The second ten years. In: HOLDEN, J. H. W.; WILLIAMS, J. T. (Ed.) **Crop genetic resources: conservation and evaluation.** London: G. Allen & Unwin, 1984. p. 277-285.

JARVIS, D. I.; MYER, L.; KLEMICK, H.; GUARINO, L.; SMALE, M.; BROWN, A. H. D.; SADIKI, M.; STHAPIT, B.; HODGKIN, T. **A training guide for** in situ **conservation on-farm**: version 1. Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. 161p.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; BERNACCI, L. C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá**: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 81-108.

JUNQUEIRA, N. T. V.; FALEIRO, F. G.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R. Uso de espécies silvestres de *Passiflora* no pré-melhoramento do maracujazeiro. In: LOPES, M. A.; FÁVERO, A. P.; FERREIRA, M. A. J. F.; FALEIRO, F. G. (Ed.). **Curso Internacional de pré-melhoramento de plantas.** Brasília, DF: Embrapa, 2006a. p. 133-137.

JUNQUEIRA, N. T. V.; LAGE, D. A. C.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R.; BORGES, T. A.; ANDRADE, S. R. M. Reação a doenças e produtividade de um clone de maracujazeiro-azedo propagado por estaquia e enxertia em estacas de passiflora silvestre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, 2006b.

JUNQUEIRA, K.P.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BELLON, G.; RAMOS, J. D.; BRAGA, M. F.; SOUZA, L. S. Confirmação de híbridos interespecíficos artificiais no gênero *Passiflora* por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura,** v. 30, n. 1, p. 191-196. 2008a.

JUNQUEIRA, N. T. V.; FALEIRO, F. G.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R. Domesticação de espécies da flora nativa do Cerrado. In: PARRON, L. M.; AGUIAR, L. M. S.; DUBOC, E.; OLIVEIRA FILHO, E. C.; CAMARGO, A. J. A.; AQUINO, F. G. (Ed.). **Cerrado**: desafios e oportunidades para o desenvolvimento sustentável. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2008b. p. 125-163.

LOPES, M. A. L. O sistema brasileiro de pesquisa em recursos genéticos. In: LOPES, M. A.; FÁVERO, A. P.; FERREIRA, M. A. J. F.; FALEIRO, F. G. (Ed.). **Curso internacional de pré-melhoramento de plantas.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. p. 30-36. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 185).

LOPES, M. A.; NASS, L. L.; MELO, I. S. Bioprospecção. In: BORÉM, A.; GIUDICE, M. del (Ed.). **Biotecnologia e meio ambiente**. Viçosa: Suprema, 2007. p. 77-106.

LOUETTE, D. Traditional management of seed and genetic diversity: what is a landrace?. In: BRUSH, S.B. (Ed.) **Genes in the field:** on-farm conservation of crop diversity. Boca Raton: F. L. Lewis Publ.,International Development Research Centre, International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p. 109-142.

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.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C., (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento:** plantas. Rondonópolis, MT: Fundação MT, 2001.

NASS, L. L.; NISHIKAWA, M. A. N.; FÁVERO, A. P.; LOPES, M. A. Pré-melhoramento de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 683-716.

NASS, L. L.; WALTER, B. M. T.; CORADIN, L.; CIAMPI, A. Y. **The state of diversity.** In: MARIANTE, A.S.; SAMPAIO, M.J.A.; INGLIS, M.C.V. (Ed.). **The state of Brazil´s plant genetic resources**: second national report: conservation and sustainable utilization for food and agriculture.Brasília, DF: Embrapa Technological Information, 2009. p. 39-50.

OLIVEIRA, M. F.; ARIAS, C. A.; TOLEDO, J. F. F. **The importance of the introduction of germplasm for soybean (**Glycine max**) improvement.** In: MARIANTE, A. S.; SAMPAIO, M. J. A.; INGLIS, M. C. V. (Ed.). The state of Brazil´s plant genetic resources: second national report: conservation and sustainable utilization for food and agriculture. Brasília, DF: Embrapa Technological Information, 2009. p. 96-98.

ONYILAGHA, J. C.; Numerical analysis of variation among Nigerian *Dioscorea rotunda* accessions. **Euphytica,** v. 35, p. 413-419, 1986.

PEÑALOZA, A. P. S.; POZZOBON, M. T. Caracterização citogenética de germoplasma vegetal. In: NASS, L.L. (Ed.) **Recursos genéticos vegetais.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 307-342.

PEREIRA, J. A. Using red rice genetic, cultural and food heritage (*Oryza sativa*). In: MARIANTE, A. S.; SAMPAIO, M. J. A.; INGLIS, M. C. V. (Ed.). **The state of Brazil´s plant genetic resources**: second national report: conservation and sustainable utilization for food and agriculture. Brasília, DF: Embrapa Technological Information, 2009. p. 112-114.

QUEIROZ, M.A. Recovering conventional agriculture genetic resources and improving cucurbits in Northeastern Brazil. In: MARIANTE, A. S.; SAMPAIO, M. J. A.; INGLIS, M. C. V. (Ed.). The state of Brazil´s plant genetic resources: second national report: conservation and sustainable utilization for food and agriculture. Brasília, DF: Embrapa Technological Information, 2009. p. 110-112.

QUEIROZ, M. A.; LOPES, M. A. Importância dos recursos genéticos vegetais para o agronegócio. In: NASS, L. L. (Ed.) **Recursos genéticos vegetais.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 61-119.

RANGEL, P. N.; RANGEL, P. H. N.; FERREIRA, M. E. **Introgression of** Oryza glumaepatula **genes of economic interes tinto elite lineages of** Oriza sativa **breeding program.** In: MARIANTE, A.S.; SAMPAIO, M.J.A.; INGLIS, M.C.V. (Eds.) The state of Brazil´s plant genetic resources. Second National Report. Conservation and Sustainable Utilization for food and agriculture. Embrapa Technological Information: Brasília, DF. 2009. p. 124-129.

RASEIRA, M. C. B.; CASTRO, C. M.; UENO, B. Passion fruit (*Passiflora* spp.) improvement using wild species. In: MARIANTE, A. S.; SAMPAIO, M. J. A.; INGLIS, M. C. V. (Ed.). **The state of Brazil´s plant genetic resources**: second national report: conservation and Sustainable Utilization for food and agriculture. Brasília, DF: Embrapa Technological Information, 2009. p. 99-101.

ROSA, M. F. M. **Conservação de recursos genéticos vegetais.** 2004 52 f. (Monografia). São João da Boa Vista, SP. Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos.

SILVA, D. J. H.; VICCINI, L. F. Acesso ao patrimônio genético brasileiro e bioprospecção: aspectos legais e científicos. In: BORÉM, A.; LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R. **Domesticação e melhoramento**: espécies amazônicas. Viçosa, MG: Suprema Editora Ltda, 2009. p. 53-66.

SILVA, D.B.; WETZEL, M.M.V.S; SALOMÃO, A.N.; FAIAD, M.G.R. **Conservação de germoplasma semente em longo prazo.** In: NASS, L.L. (Ed.) **Recursos genéticos vegetais.** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Brasília, DF. 2007. p. 441-471.

VAN SLOTEN, D. H. **The use of curators, breeders anda other users of germplasm in characterization and evaluation of crop genetic resources.** Rome: IBPGR/SEAN, 1987. p. 3-8. Special Issue.

STEINER, J. J.; GREENE, S. L. Proposed ecological descriptors and their utility for plan germplasm collections. **Crop Science**, v. 36, p. 439-451, 1996.

VALLS, J. F. M.; VEIGA, R. F. A.; BARBIERI, R. L.; RAMOS, S. R. R.; BUSTAMANTE, P. G. Ex situ **management of plant genetic resources**. In: MARIANTE, A. S.; SAMPAIO, M. J. A.; INGLIS, M. C. V. (Ed.) The state of Brazil´s plant genetic resources: second national report: conservation and sustainable utilization for food and agriculture. Brasília, DF: Embrapa Technological Information, 2009. p. 65-79.

VALLS, J. F. M. **Caracterização de recursos genéticos vegetais.** In: NASS, L. L. (Ed.) **Recursos genéticos vegetais.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 281-305.

VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Caracterização química de metabólitos secundários em germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.) **Recursos genéticos vegetais.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 343-376.

VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. F.; SILVA, M. S. Estado da arte e estratégias do melhoramento participativo: o exemplo da mandioca no Cerrado. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L.; RIBEIRO JÚNIOR, W. Q. **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios.** Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2008. p. 109-124.

WETZEL, M. M. V. S. Manutenção da variabilidade dos recursos genéticos para o pré-melhoramento vegetal. In: LOPES, M. A.; FÁVERO, A. P.; FERREIRA, M. A. J. F.; FALEIRO, F. G. (Ed.). **Curso Internacional de pré-melhoramento de plantas**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. p. 41-44. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 185).

WILLIAMS, J. T. A decade of crop genetic resources research. In: HOLDEN, J. H. W.; WILLIAMS, J. T. (Ed.). **Crop genetic resources**: conservation and evaluation. London: G. Allen & Unwin, 1984. p. 1-17.

Bibliografia Complementar

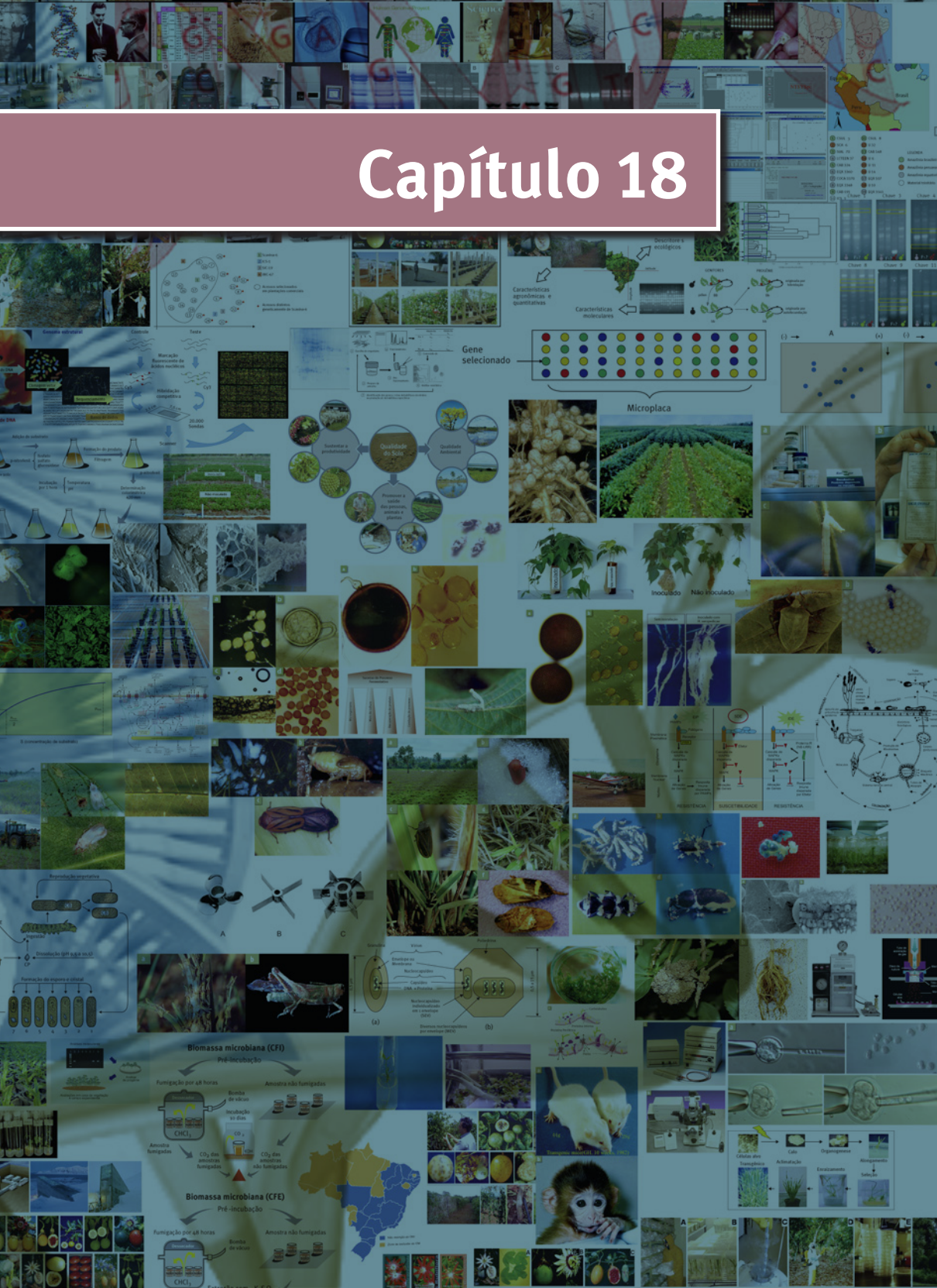
LOPES, M. A.; FÁVERO, A. P.; FERREIRA, M. A. J. F.; FALEIRO, F. G. (Ed.). **Curso Internacional de pré-melhoramento de plantas**. Brasília: Embrapa, 2006. 184 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 185).

MARIANTE, A. S.; SAMPAIO, M. J. A.; INGLIS, M. C. V. (Ed.) **The state of Brazil´s plant genetic resources: second national report: conservation and sustainable utilization for food and agriculture.** Brasília, DF: Embrapa Technological Information, 2009. 236 p.

NASS, L. L. (Ed.) **Recursos genéticos vegetais.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 858 p.

VALOIS, A. C. C.; SALOMÃO, A. N.; ALLEM. A. C. (Ed.). **Glossário de recursos genéticos.** Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1996. 62 p.

Capítulo 18


Gene selecionado
Microplaca
Inoculado
Não inoculado
Biomassa microbiana (CFI)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas
Biomassa microbiana (CFE)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas

Melhoramento genético de plantas e biotecnologia

Fábio Gelape Faleiro
Walter Quadros Ribeiro Júnior
Austeclínio Lopes de Farias Neto

Introdução

Segundo seu conceito amplo, a biotecnologia é o uso de conhecimentos sobre os processos biológicos e sobre as propriedades dos seres vivos, com o fim de resolver problemas e criar produtos de utilidade. Conceitualmente, o melhoramento de plantas não deixa de ser uma biotecnologia, como ciência que visa à modificação genética das plantas para torná-las mais úteis ao homem.

O melhoramento de plantas pode ser definido de forma clássica como a ciência e ou a arte de modificar as plantas para o benefício humano (BORÉM, 1998; BERNARDO, 2002). Trata-se de uma ciência multidicisplinar que aplica os princípios da genética para o desenvolvimento de cultivares melhoradas para utilização humana e animal, utilizando-se de conhecimentos de agronomia, botânica, genética, genética molecular, citogenética, fisiologia, patologia, entomologia, bioquímica e estatística (SCHLEGEL, 2003).

Após a descoberta da hereditariedade por Gregor Mendel em 1865, novas e grandes descobertas como a heterose, a mutagênese, a genética quantitativa, avanços na fisiologia e bioquímica, a cultura de tecidos, a bioinformática e os avanços na genética e biologia molecular tiveram influência direta e muito positiva no melhoramento de plantas.

Nas últimas décadas, surgiram inúmeras tecnologias baseadas em análises do DNA e na sua manipulação controlada e intencional por meio das técnicas de engenharia genética. Essas tecnologias abriram novas possibilidades para o melhoramento genético por romperem a barreira de cruzamentos entre diferentes espécies estabelecidas pela compatibilidade sexual. Mediante a engenharia genética, é possível transferir, para plantas, genes isolados de plantas de outras espécies

ou mesmo de microrganismos e animais, aumentando o conjunto gênico disponível para cada programa de melhoramento.

Neste capítulo, é apresentado um pouco da história e da importância do melhoramento genético vegetal para a humanidade, abordando aspectos gerais e exemplos do melhoramento clássico e do melhoramento baseado em técnicas da biotecnologia moderna relacionadas à engenharia genética.

História do melhoramento genético de plantas

Podemos dizer que o melhoramento de plantas nasceu com o início da agricultura, há aproximadamente 10.000 anos. A agricultura incentivou a prática empírica do melhoramento de plantas pelos primeiros agricultores, os quais selecionavam sementes das melhores plantas para estabelecer novos plantios com melhor qualidade e maior produtividade. Esse processo possibilitou a domesticação de várias espécies de plantas pelo homem (Figura 1).

Figura 1. Ilustrações da origem do melhoramento genético, do processo de domesticação das plantas e de alterações no tamanho da espiga e da arquitetura da planta do milho e do tamanho do fruto do maracujá decorrentes do melhoramento genético.

Como ciência, o melhoramento de plantas começou logo após a redescoberta das leis de Mendel no começo do século XX. Desde então, vem evoluindo em diferentes áreas, permitindo aos melhoristas aumentarem a eficiência na seleção e explorarem mais racionalmente os recursos genéticos. Dos primórdios da agricultura até hoje, o melhoramento passou por muitas modificações no exercício da sua prática, mas poucas mudanças foram observadas, nos últimos 50 anos, em seus princípios fundamentais de geração de variabilidade (BORÉM; MILACH, 1999).

Borém e Milach (1999) relatam alguns avanços importantes na área do melhoramento genético de plantas que ocorreram no século XX, o qual foi marcado por grandes descobertas ou desenvolvimentos que tiveram profundo impacto na maneira de se fazer o melhoramento de plantas (Figura 2). A redescoberta das leis de Mendel e do princípio da hereditariedade foi a base científica para a descoberta da heterose (1910), para o desenvolvimento dos métodos clássicos de melhoramento (1920), para a descoberta da mutagênese (1930), para a utilização de métodos estatísticos e da genética quantitativa (1940), fisiologia (1950), bioquímica (1960), cultura de tecidos (1970), engenharia genética e biologia molecular (1980), bioinformática (1990) e interações das áreas genômicas, proteômicas e metabolômicas em alta escala e de forma rotineira (2000).

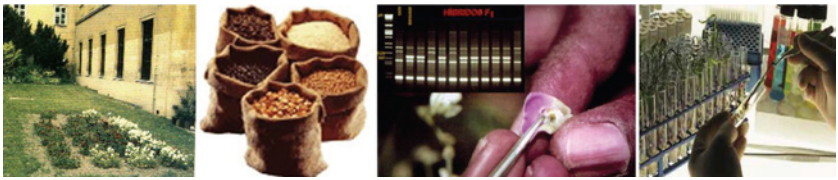


Figura 2. Ilustrações de avanços na ciência do melhoramento de plantas, tendo como base os primeiros experimentos de Mendel, passando pelo desenvolvimento dos métodos clássicos de melhoramento, ferramentas moleculares e engenharia genética.

Com o avanço da ciência, o melhoramento de plantas passou a possibilitar aos melhoristas a criação de novos tipos de plantas, pela modificação dirigida e controlada dos caracteres hereditários de interesse. Hoje, várias cultivares de várias espécies são desenvolvidas a cada ano com características de alta produtividade, qualidade, resistência a estresses bióticos e abióticos, adaptabilidade, etc. Logicamente, os altos rendimentos das culturas atualmente utilizadas na produção agrícola mundial somente foram possíveis com a ajuda do melhoramento do ambiente para as plantas, sendo exemplos a correção da acidez e fertilidade dos solos, a irrigação, o controle fitossanitário e das plantas invasoras entre outras práticas de manejo fitotécnico. Estima-se que a contribuição do melhoramento de plantas ao nível

mundial responde por cerca de 50% dos aumentos em produtividade nas espécies cultivadas (FEHR, 1984).

O melhoramento genético convencional

O melhoramento genético clássico possibilita a criação de novas combinações de genes por diferentes métodos, desenvolvidos e aperfeiçoados no último século (BORÉM, 1997), utilizando-se o cruzamento sexual entre plantas da mesma espécie e, quando possível, entre plantas de espécies próximas geneticamente. Por meio desse cruzamento, é possível combinar características desejáveis presentes em diferentes plantas. As atividades de melhoramento envolvendo a combinação de características e a fixação dos genes de interesse em novas cultivares são feitas em sucessivas gerações envolvendo a recombinação e seleção gênica baseada no fenótipo. Esse processo de desenvolvimento de uma nova variedade ou cultivar é um processo lento que pode demorar uma década ou mais. Nas primeiras gerações de melhoramento, milhares de plantas são obtidas por meio de cruzamentos; testadas e ao longo das gerações, as plantas com características desejáveis (produtividade, resistência a doenças, adaptabilidade, etc.) são selecionadas, culminando com o lançamento de uma nova cultivar (Figura 3). Essas atividades possibilitaram um notável avanço do melhoramento genético de plantas nos últimos 100 anos.

Ferreira e Faleiro (2008) ilustram esse notável avanço com os resultados da tão discutida Revolução Verde, responsável pelo aumento na produção de cereais na segunda metade do século XX. A utilização de cultivares semianãs de trigo e de arroz pelo melhoramento clássico resultou em grande aumento de produtividade dessas culturas, solucionando ou equacionando a escassez de alimentos e potencial fome em escala que se intensificavam em vários países do mundo após a Segunda Grande Guerra (BORLAUG, 1969).

Conforme mencionado, as cultivares de plantas de diferentes espécies cultivadas foram desenvolvidas, em sua grande maioria, com base na seleção fenotípica de características de interesse econômico. Essa tarefa torna-se complexa e menos eficiente quando a característica de interesse é controlada por vários genes (característica quantitativa), geralmente com pequeno efeito e significativa influência ambien-

tal. Não obstante, os programas de melhoramento genético têm tido sucesso no desenvolvimento de cultivares superiores para características qualitativas e quantitativas. Esse sucesso pode ser atribuído, entre outros fatores, à combinação de métodos clássicos de melhoramento genético, avaliação do fenótipo em diferentes anos e ambientes, e a sistemas sofisticados de experimentação, fitotecnia, estatística e estratégias de seleção (FERREIRA; FALEIRO, 2008).

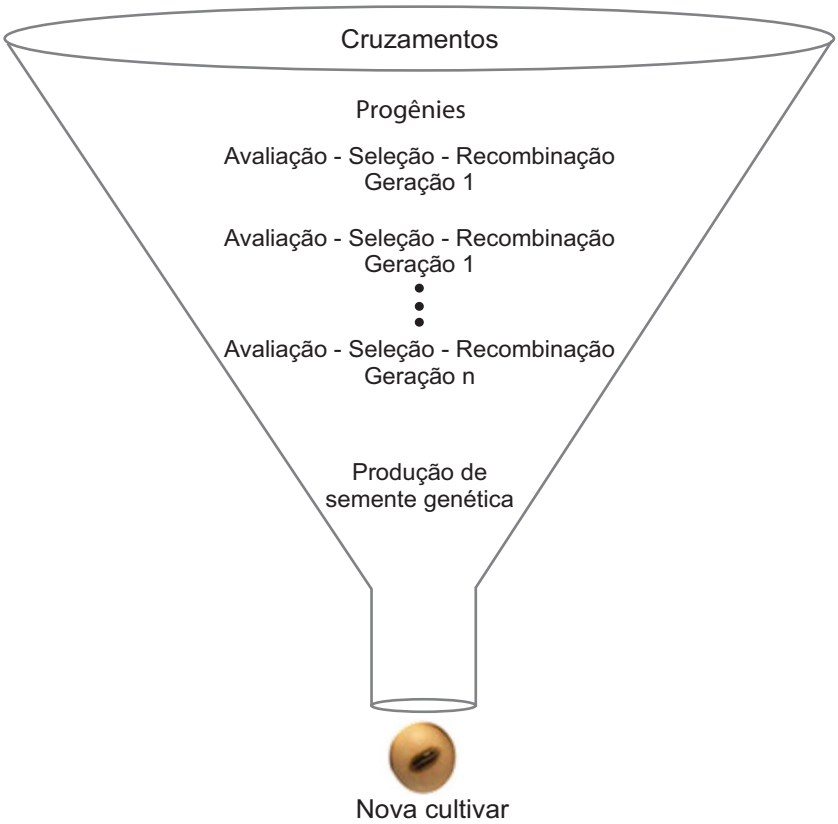


Figura 3. Ilustrações do processo de avaliação, seleção e recombinação de plantas com características desejáveis ao longo de sucessivas gerações de melhoramento, culminando com o lançamento de uma nova cultivar.

Fonte: adaptado de Souza et al. (2009).

O melhoramento auxiliado pela biotecnologia

De um modo geral, as técnicas relacionadas à biotecnologia como a cultura de tecidos, marcadores moleculares, análises do DNA e engenharia genética, além de aumentarem a disponibilidade de genes desejáveis, têm auxiliado o melhoramento genético das plantas, tornando o processo mais rápido, preciso e eficiente.

A cultura de tecidos, por meio das técnicas de micropropagação, produção de di-haploides, cultura de anteras e cruzamentos interespecíficos pela fusão de protoplastos, tem sido uma ferramenta interessante. As técnicas de melhoramento genético por engenharia genética têm na cultura de tecidos uma ferramenta básica, sem a qual não se alcança a regeneração da planta transgênica completa e funcional a partir da célula geneticamente modificada. Muitas outras metodologias importantes no campo da cultura de tecidos vegetais têm sido diariamente implantadas e têm trazido novas possibilidades como ferramenta auxiliar para o melhoramento genético. No capítulo 14, deste livro, são relatadas algumas dessas metodologias.

Marcadores moleculares e análises do DNA estão, a cada dia, sendo utilizados de maneira rotineira nos programas de melhoramento genético, auxiliando nas diferentes fases do programa, desde a caracterização da variabilidade genética do germoplasma, passando por diferentes atividades de pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento. No capítulo 3, nesta obra, são apresentadas as principais aplicações dos marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas melhoramento genético vegetal.

A engenharia genética tem aberto novas possibilidades para o melhoramento genético, sendo exemplos o desenvolvimento de cultivares de feijoeiro resistentes ao vírus-do-mosaico dourado, cultivares de mamoeiro resistentes ao vírus-da-mancha-anelar, cultivares de milho, soja e algodão resistentes a insetos, cultivares resistentes a herbicidas para reduzir custos e facilitar o manejo da cultura, cultivares tolerantes a condições adversas como seca, frio, geada, alcalinidade e acidez do solo, cultivares de alimentos com melhor qualidade nutricional, etc. Com a engenharia genética, o conjunto gênico disponível para o melhorista foi ampliado. Essa possibilidade traz a esperança de equacionar problemas de certas culturas, os quais não teriam solução

utilizando apenas a variabilidade genética limitada pela compatibilidade sexual intraespecífica ou entre espécies relacionadas. No capítulo 15, deste livro, são discutidos os princípios científicos da engenharia genética e os aspectos tecnológicos envolvendo a obtenção de plantas transgênicas geneticamente melhoradas.

Planejamento de programas de melhoramento

O planejamento e as decisões sobre as estratégias a serem utilizadas em programas de melhoramento são tão importantes quanto a sua execução propriamente dita. As principais etapas do planejamento de programas de melhoramento de plantas são descritas por Borém (1998); e Ribeiro Júnior et al. (2008) fazem uma discussão dessas etapas, incluindo um estudo de caso sobre melhoramento genético do trigo (RIBEIRO JÚNIOR et al. 2006). O primeiro passo estratégico de um programa de melhoramento é a identificação de demandas e em função delas, a definição dos objetivos.

Para a identificação das demandas, costuma-se considerar somente o mercado com sua cadeia produtiva e a possibilidade de lucro, o que é uma visão reducionista e limitada. Para uma visão sistêmica, deve-se considerar também impactos sócios econômicos e ambientais de uma possível cultivar a ser gerada, que, em outras palavras, significa sustentabilidade. Em função desse ponto de vista mais amplo, deve-se definir as demandas, objetivos e metas do programa. É importante que as demandas, objetivos e metas sejam coerentes e exequíveis porque projetos muito ambiciosos podem fracassar. Deve-se considerar de forma realista a relação custo e benefício das novas cultivares a serem obtidas.

Para a obtenção das novas cultivares, a variabilidade genética da espécie alvo é a mais importante ferramenta a ser utilizada. Essa variabilidade pode ser buscada não somente em cultivares modernas, mas também em acessos obsoletos, raças locais, espécies selvagens de gêneros relacionados à espécie-alvo, entre outros. Quando se considera a espécie e seu sistema produtivo, pode-se prever os gargalos a serem enfrentados, ou seja, quais características de interesse estão ausentes nas atuais cultivares comerciais. Nessa fase do planejamento, é possível definir se haverá necessidade de atividades de

pré-melhoramento, envolvendo a identificação de genes de interesse em espécies silvestres e sua transferência para acessos mais adaptados. As atividades de pré-melhoramento são de grande importância para subsidiar a utilização prática dos recursos genéticos e ampliar a base genética dos programas de melhoramento (DUVICK, 1990; NASS; PATERNIANI, 2000), sendo várias experiências de sucesso relatadas por Faleiro et al. (2008a). A impossibilidade de atingir os objetivos com a variabilidade genética existente no pool gênico da espécie ou de espécies relacionadas pode levar à decisão de se utilizar técnicas biotecnológicas, incluindo a transgenia.

As atividades do melhoramento propriamente dito envolvem basicamente metodologias de avaliação, seleção e novas recombinações a cada geração. Caso não se domine essas metodologias para a espécie-alvo, um estudo prévio deve ser conduzido inicialmente antes do melhoramento propriamente dito. O conhecimento prévio da forma de reprodução e multiplicação da espécie-alvo é imprescindível para se decidir a estratégia apropriada do melhoramento. Espécies autógamas ou alógamas, com reprodução via sementes ou assexuada, requerem metodologias distintas de melhoramento. Finalmente, as limitações de manejo da espécie na região-alvo, como por exemplo, doenças e problemas de adaptação às condições climáticas, assim como necessidade de irrigação nas diferentes épocas de plantio, são determinantes no planejamento dos experimentos. O conhecimento das exigências do mercado auxilia na busca de produtos tecnológicos com maior valor agregado.

O programa de melhoramento não termina com a obtenção da cultivar. Para atingir seu objetivo central, essa cultivar deve ser utilizada pelos produtores e atingir o mercado com benefícios para toda cadeia produtiva, envolvendo a indústria e os consumidores. Para isso, atividades de pós-melhoramento são essenciais. Essas atividades envolvem a elaboração de planos de marketing, logística de produção e comercialização de sementes e difusão da tecnologia. A divulgação dos ganhos não somente econômicos, mas também sociais e ambientais podem ser importantes para a adoção das novas cultivares.

Para realização de todas atividades de pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento (FALEIRO et al., 2008b), o trabalho em

equipe envolvendo profissionais com várias especialidades (genética, fitossanidade, fitotecnia, fisiologia vegetal, bioquímica, estatística, etc.) assume grande importância. Toda equipe, por mais qualificada que seja, possui limitações e lacunas de conhecimento e, nesse sentido, parcerias multidisciplinares e interinstitucionais devem ser criteriosamente estabelecidas, aproveitando-se as áreas de maior domínio ou de maior experiência de cada instituição ou equipe parceira.

Importância e exemplos do desenvolvimento de novas cultivares

O melhoramento clássico tem contribuído de forma significativa para o aumento da produção brasileira de plantas cultivadas, assim como para a redução dos custos de produção dessas culturas e para a incorporação de novas áreas de produção (RAMALHO, 2004). O melhoramento de plantas de diversas espécies produtoras de grãos, fibras, frutos e energia foi fundamental para a ocupação agrícola da região, por meio da criação de cultivares adaptadas à região do Cerrado. Hoje, essa região responde por quantidades significativas da produção nacional de carne, soja, milho, feijão, algodão, arroz, café, entre outras culturas.

O melhoramento baseado na biotecnologia e engenharia genética também tem contribuído significativamente na produção de alimentos no mundo, com um número crescente de países que cultivam plantas geneticamente modificadas e considerável aumento de áreas cultivadas com estas plantas. Um total de 25 países cultiva plantas geneticamente modificadas em aproximadamente 134 milhões de hectares, dos quais 15 tem a área cultivada superior a 50 mil hectares (Figura 4) (JAMES, 2009). Os países com maiores áreas cultivadas com plantas geneticamente modificadas são EUA, Brasil e Argentina com 64; 21,4 e 21,3 milhões de hectares, respectivamente.

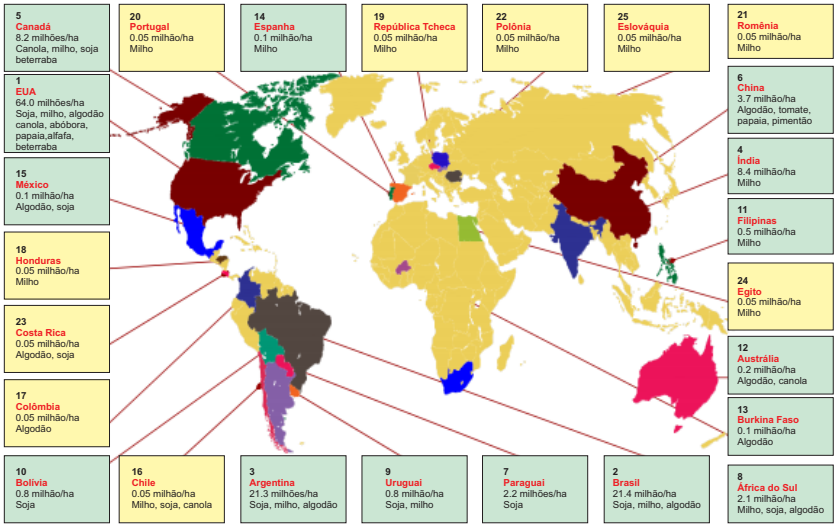


Figura 4. Países que cultivam plantas geneticamente modificadas e respectivas áreas de cultivo.

Fonte: James (2009).

De acordo com o Serviço Internacional para Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia (ISAAA), o Brasil plantou 21,4 milhões de hectares com culturas geneticamente modificadas em 2009, um crescimento de 35,4% em relação a 2008 (equivalente a 5,6 milhões de hectares). Segundo o ISAAA, trata-se do maior índice de crescimento entre os 25 países produtores de transgênicos, especialmente em razão da rápida adoção do milho geneticamente modificado. Do total da área cultivada com transgênicos no Brasil, 16,2 milhões de hectares correspondem à soja tolerante a herbicidas, o que equivale a 71% do total da cultura; 5,0 milhões de hectares correspondem ao milho Bt em ambas as safras, de verão e inverno, o que corresponde a 31% do total da cultura; e 0,15 milhão de hectares de algodão Bt e tolerante a herbicida, o que corresponde a 16% do total da cultura.

O melhoramento genético convencional ou baseado na engenharia genética é um processo contínuo e vibrante com capacidade de se reinventar, absorvendo novas técnicas científicas e metodologias modernas, na busca do desenvolvimento de cultivares que contribuam

para uma agricultura sustentável combinado produtividade, qualidade nutricional, adaptação a estresses bióticos e abióticos, manejo de solo e manejo integrado de pragas, entre outros. São vários os exemplos de cultivares desenvolvidas, com inúmeros benefícios econômicos, sociais e ambientais.

Perspectivas do melhoramento de plantas

A cada ano surgem novos desafios e demandas para o desenvolvimento de novas cultivares, fazendo com que os programas de melhoramento genético convencional e baseado na engenharia genética tenham uma natureza dinâmica e importância estratégica atual e futura. O grande potencial de uso da biotecnologia moderna no melhoramento de plantas é inegável. Os resultados obtidos até o presente momento refletem as contribuições atuais da biotecnologia moderna e, para o futuro, certamente, novos produtos tecnológicos serão gerados.

Várias oportunidades são citadas para geração de produtos com o auxílio da biotecnologia (NAS, National Academy of Sciences, 2010). Entre elas, o aumento da produtividade de plantas cultivadas, através de maior resistência e tolerância a estresses bióticos (pragas, doenças, ervas daninhas) e estresses abióticos (altas temperaturas, seca, maior eficiência no uso de nutrientes); aumento do valor nutricional das plantas, através do aumento da concentração de vitaminas, minerais e proteínas em plantas; geração de plantas biofábricas, para produção de vacinas e proteínas terapêuticas; aumento da segurança de produtos, por intermédio da geração de plantas com maior durabilidade pós-colheita; uso da biotecnologia com o objetivo da preservação da biodiversidade e na conservação dos recursos naturais e produção de energia renovável.

Entretanto, é necessário que sejam considerados pontos essenciais para o desenvolvimento de novos produtos como a identificação das demandas e prioridades de cada região e dos diferentes sistemas de produção existentes, tendo em vista que eles são diversos entre regiões e mesmo dentro de uma região. James (2009) cita como fator importante o fornecimento de tecnologias relevantes para satisfazer as necessidades de países em desenvolvimento na Ásia, América

Latina e África. Também devem ser considerados fatores relacionados à definição clara dos beneficiários dos produtos a serem gerados e o impacto que os mesmos irão causar e as questões de protocolos de testes de campo necessários para novos eventos tendo em vista as diferenças ambientais, por exemplo, as regiões temperadas e as regiões tropicais (PERSLEY, 1999). Da mesma forma, devem ser considerados os protocolos para regulação e liberação de novos produtos e o engajamento da indústria de processamento e do consumidor, considerando que o sucesso de novos produtos geneticamente modificados também depende da aceitação por parte do consumidor.

Considerações finais

É inquestionável a grande importância do melhoramento genético vegetal para a humanidade. São inúmeros os exemplos de sucesso no desenvolvimento de cultivares de plantas melhoradas geneticamente que trouxeram grandes benefícios para o agronegócio, garantindo a sustentabilidade econômica e ambiental da agricultura. Os exemplos vão desde as primeiras atividades de domesticação de genótipos selvagens, passando pelas inúmeras cultivares desenvolvidas pelo melhoramento clássico, até o uso de tecnologias avançadas de engenharia genética para o desenvolvimento de novas cultivares. Certamente, essas tecnologias modernas podem beneficiar diferentes culturas e programas de melhoramento genético em algumas situações, em que o melhorista teria dificuldades utilizando apenas metodologias convencionais de melhoramento. Logicamente, as novas tecnologias como ferramentas auxiliares ao melhoramento genético nunca irão substituir as práticas essenciais do melhoramento como a avaliação fenotípica das plantas contabilizando os efeitos ambientais e das interações genótipo x ambiente.

Referências

BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. Stemma Press: Minneapolis, MN, 2002. 369 p.

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

BORÉM A; Milach S. C. K. Melhoramento de plantas: o melhoramento de plantas na virada do milênio. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 7, p. 68-72. 1999.

BORLAUG, N. E. A Green Revolution yields a golden harvest. **Columbia Journal of World Business,** p. 9-19, 1969.

DUVICK, D. N. Genetic enhancement and plant breeding. In: JANICK, J.; SIMON, J. E. (Ed.). **Advances in new crops.** Portland :Timber Press, 1990. p. 90-96.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA M. T. V.; FAVERO, A. P.; LOPES, M. A. Pré-melhoramento de plantas: experiências de sucesso. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L.; RIBEIRO JÚNIOR, W. Q. (Ed.) **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento:** estratégias e desafios. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008a. p. 45-62.

FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L.; RIBEIRO JÚNIOR, W. Q. **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento:** estratégias e desafios. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2008b. 184 p.

FEHR, W. R. **Genetic contributions to yield gains of five major crop plants.** Madison : Crop Science Society of America, 1984. 101 p.

FERREIRA, M. E.; FALEIRO, F. G. Biotecnologia: avanços e aplicações no melhoramento genético vegetal. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L. **Savanas**: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2008. p. 765-792.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops**: 2008. Ithaca, NY: ISAAA, 2008. (ISAAA Brief, n. 39).

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009. the first fourteen years, 1996 to 2009 Ithaca, NY: ISAAA, 2009. (ISAAA Brief, n. 41-2009). Disponível em: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/41/executivesummary/default.asp.> Acesso em: 02 ago 2009

NAS, National Academy of Sciences. Global Challenges and Directions for Agricultural Biotechnology: Workshop Report Disponível em: <http://www.nap.edu/catalog/12216.html>. 74 p. Acesso em: 02 ago 2010.

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

PERSLEY, G. L. **Agricultural Biotechnology and the Poor**: Promethean Science. 1999. Disponível em:< http://www.cgiar.org/biotech/rep0100/persley.pdf>. Acesso em: 02 ago. 2010.

RAMALHO, M. P. Genetic Improvement and agribusiness in Brazil. **Crop breeding and applied biotechnology**, v. 4, p. 127-134, 2004.

RIBEIRO JÚNIOR, W. Q., MORAES, A. F.; RAMOS, M. L. G.; AMABILE, R. F.; SCHEEREN, P. L.; CAIERÃO, E. Objetivos e estratégias de melhoramento de plantas em projetos de pesquisa. In: FALEIRO, F.G.; FARIAS NETO, A.L.; RIBEIRO JÚNIOR, W. Q. (Ed.) **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento**: estratégias e desafios. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. p. 93-106.

RIBEIRO JÚNIOR, W. Q.; RAMOS, M. L. G.; VASCONCELOS, U.; TRINDADE, M. da G.; FERREIRA, F. M.; SIQUEIRA, M. M. H.; SILVA, H. L. M. da; RODRIGUES, G. C.; GUERRA, A. F.; ROCHA, O. C.; AMÁBILE, R. F.; ALBUQUERQUE, A. C.; SÓ E SILVA, M.; ALBRECHT, J. C.; DURÃES, F. O. M. **Fenotipagem para tolerância à seca visando o melhoramento genético do trigo no cerrado**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 24 p. (Embrapa Trigo. Circular técnica Online, 21). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/ci/p_ci21.htm>. Acesso em: 02 ago. 2010

SCHLEGEL, R. H. J. **Encyclopedic dictionary of plant breeding and related subjects.** New York: Haworth Press , 2003. 177 p.

SOUZA, P. I. M.; SILVA, S. A.; MOREIRA, C. T.; FARIAS NETO, A. L.; SILVA, N. S.; TOLEDO, J. F. F.; ARANTES, N. E. O programa de melhoramento genético da soja transgênica para o Cerrado. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. **Biotecnologia, transgênicos e biossegurança.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. p. 169-183.

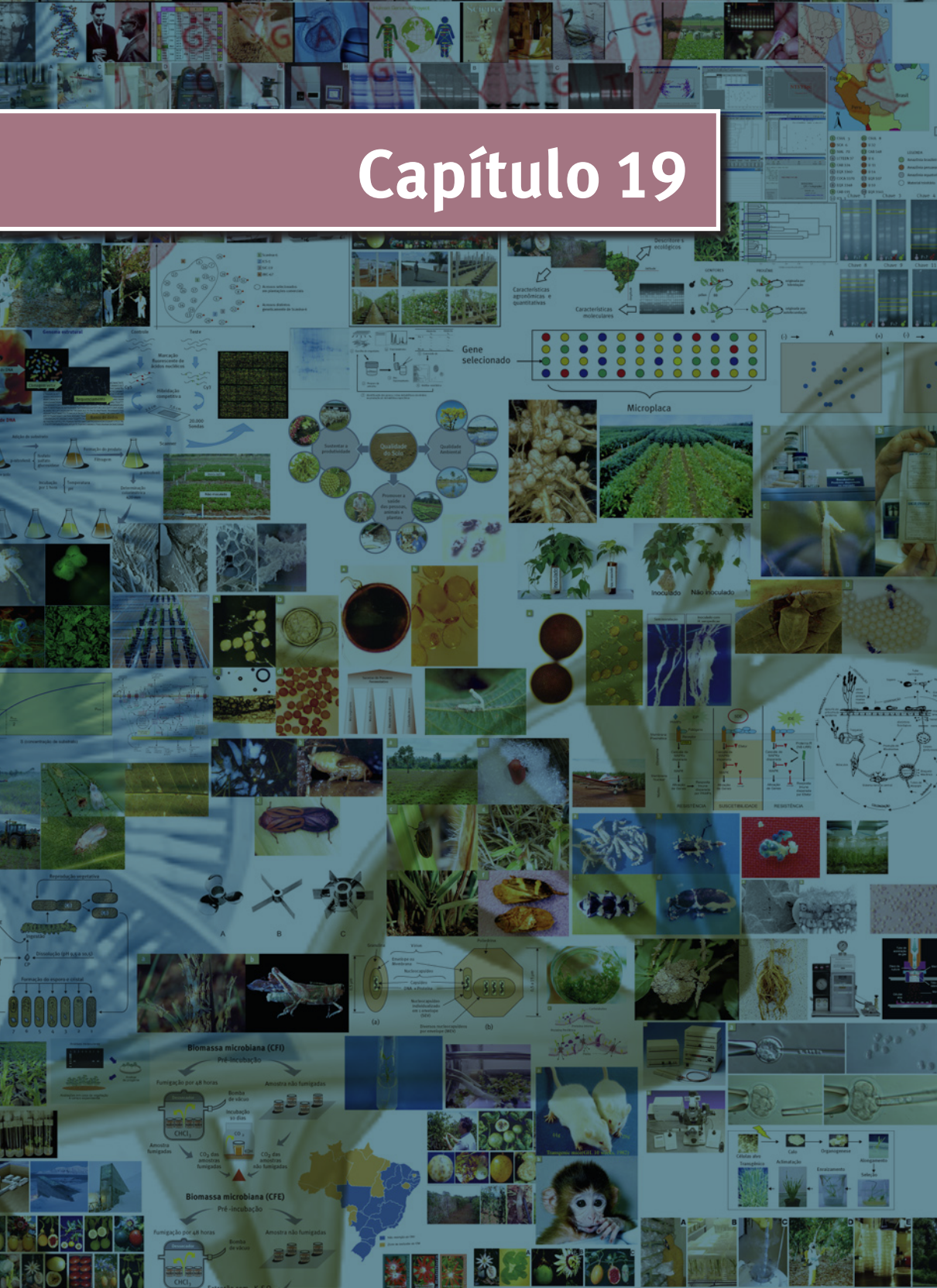
Bibliografia Complementar

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

FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L.; RIBEIRO JÚNIOR, W. Q. **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento**: estratégias e desafios. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2008. 184 p.

SASSON, A. **Plant and agricultural biotechnology:** achievements, prospects and perceptions. Monterrey, UNU-IAS/ Coordination of Science and Technology of the State of Nuevo León, 2006, 444 p.

Capítulo 19


Gene selecionado
Microplaca
Inoculado
Não inoculado
Biomassa microbiana (CFI)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas
Biomassa microbiana (CFE)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas

Análise genômica aplicada a produção animal

Artur Jordão de Magalhães Rosa
Rodrigo da Rocha Fragoso

Introdução

O genoma bovino consiste de 30 pares cromossômicos homólogos, dos quais 29 são autossômicos e 1 é sexual. O genoma de machos é heterogamético XY e o de fêmeas homogamético XX, com aproximadamente 3.000 cM no total. Os cromossomos são classificados de acordo com a posição do centrômero como metacêntricos, submetacêntricos ou acrocêntricos, e numerados segundo o tamanho. O segmento curto do cromossomo é denominado "p" e o longo "q". Por meio de coloração com Ginsa, é possível visualizar os cromossomos com um padrão de bandas característico, que são então numerados (Banda-G). Um determinado *loci* em um cromossomo pode ser localizado no genoma pelo número do cromossomo, o segmento (p ou q) e número da banda-G (FRIES et al., 1993) (Figura 1). Dessa forma, o gene do hormônio do crescimento está localizado no 19q17, o gene da Beta-lactoglobulina no 11q28 e o da kapa-caseína no 6q26.

A partir da década de 1980, a genômica bovina progrediu de mapeamento sintênico de genes codificadores de proteínas ao sequenciamento completo do genoma. O genoma bovino serve como um protótipo para estudos em outros bovídeos como cabras, ovelhas e búfalos, que possuem os genomas altamente conservados em nível citogenético (WOMACK, 2006; DALRYMPLE, 2006), e ainda mais importante para o entendimento da evolução e funcionamento dos genomas de mamíferos, especialmente o humano (GIBBS et al., 2002; ADELSON, 2008).

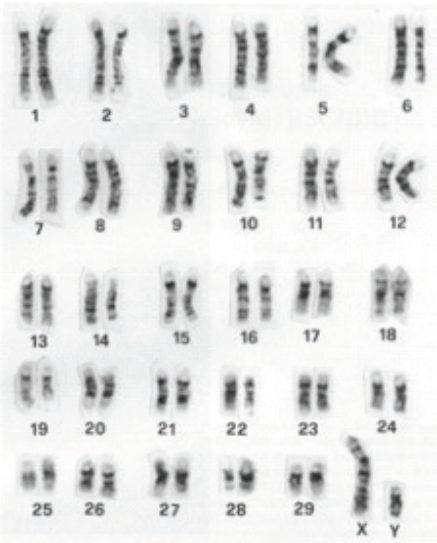


Figura 1. Cariótipo de bovinos. Fotografia dos cromossomos colorados com Ginsa. São 60 cromossomos, metade herdado do pai e metade da mãe. Os cromossomos são arranjados em pares (um de cada progenitor), 1 a 29 e os X e Y.

Fonte: Adaptado de Kayser, 2001.

Para tanto, o genoma bovino foi sequenciado, possuindo, em 2009, uma cobertura de aproximadamente 7,5X, objetivando melhorar a compreensão da biologia e a evolução dos mamíferos. Ele possui um total de aproximadamente 2,86 x10^9 pares de base, pelo menos 22.000 genes, sendo 14.345 ortólogos em sete espécies de mamíferos, dos quais 1.217 estão ausentes em genomas de não-Euterianos (marsupial ou monotremata). Alterações cromossômicas específicas de bovinos como duplicações e enriquecimento com elementos repetitivos, assim como SNPs espécie-específicos, podem ser encontrados em maior densidade em genes relacionados à lactação e ao sistema imune. Genes envolvidos com metabolismo são geralmente mais conservados, apesar de que cinco genes metabólicos ortólogos a humanos estão ausentes ou divergiram significativamente (ADELSON, 2008; BURT, 2009; CONNELLY et al., 2009; ELSIK et al., 2009; LEMAY et al., 2009; LIU et al., 2009; TELLAM et al. 2009; ZIMIN et al., 2009) (Figura 2).

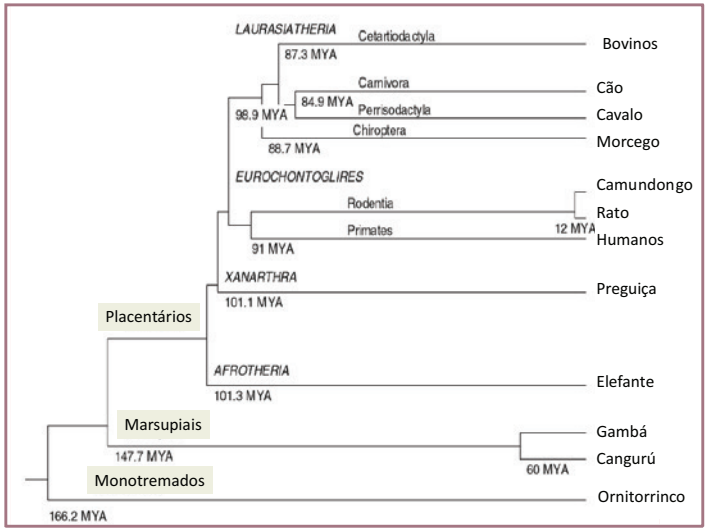


Figura 2. Árvore Filogenética simplificada ilustrando espécies de mamíferos existentes. Estimativas em milhões de anos atrás (MYA). As duas separações iniciais estabeleceram os monotrematas (166.2 MYA), e marsupiais e placentários (147.7 MYA). Por aproximadamente 50 milhões não foi originado nenhum grupo com descendentes vivos, então as quatro superordens de mamíferos surgiram em somente 2,4 milhões de anos.

Neste capítulo, serão abordados os recentes avanços das análises genômicas no entendimento da evolução e funcionamento do genoma bovino e suas aplicações ligadas ao aumento da produção animal com ênfase no melhoramento genético. A utilização de análises genômicas na seleção assistida e em estudos filogenéticos e populacionais com implicações na conservação e manejo de recursos genéticos também será discutida.

Sequenciamento genômico

Com o início do projeto genoma humano, no início dos anos 1990, as sequências do DNA do genoma humano e de diversas espécies experimentais foram determinadas. Desde então, os projetos de sequenciamento incluíram também animais domésticos de impor-

tância para a agropecuária. O genoma de galinha foi completado em 2004 (WALLIS et al., 2004), o de bovinos em 2006 (GAO et al., 2007), e o de suínos está em progresso (Tabela 1).

Tabela 1. Status dos projetos genomas de animais domésticos até 2007.

Espécie	Mapa Genético		Projeto BAC FPC	Mapa RH	Seq. Genômica	ESTs	UniGene
	Marcadores	Nome do Mapa					
Galinha	2110	WUR, NCBI	Cobertura de 20X	ChickRH6	6.6X	625.790	33.713
Porco	1283	USDA-MARC, NCBI	Cobertura de 15,3X	INRA-UMN, UNR, UIUC	Desenvolvimento	887.593	38.782
Vaca	3925	USDA-MARC, NCBI	6604 contigs	SUNbRH, TXAM_RH, COMRAD	7.7X	1.506.587	41.891
Ovelha	1411	Sheepmap4.7, NCBI	Cobertura de 5,4X	USUoRH500	Planejamento	187.701	12.142
Pato	155	CAU	NA	Planejamento	NA	2.990	NA
Coelho	745	INRA	NA	NA	NA	49.300	6.413

Fonte: Adaptado de Hu et al., 2009. http://www.ncbi.nlm.gov/Genomes/

A primeira versão da sequência do genoma bovino foi publicada em banco de dados público em 2004. A segunda versão, Btau_2.0, com uma cobertura de 6,2X, foi gerada pela montagem de sequências "ShotGun". Em 2006, a terceira versão Btau_3.1, com cobertura 7,15X montado a partir da combinação de sequências geradas por "ShotGun" e "Bac library", foi publicado pela NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/cow/) (GAO et al., 2007).

A sequência do genoma bovino está disponível ao público on line no web site http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/cow/, http://www.ensembl.org/Bos_taurus/index.html, http://genome.ucsc.edu/ e http://bovinegenome.org/, onde está conectada a banco de dados com informações relacionadas à estrutura dos genes (localização, regiões codificadoras e regulatórias) e função (bioquímica, biológica, regulatória e interações com outros genes) (Gene Ontology – GO), QTL para as diferentes características, famílias de proteínas, o mapa integrado e outros recursos.

A última montagem Btau_3.1 possui 2,87 $10x^9$pb gerados a partir de 26 milhões de sequências "shotgun" e "BAClibrary". Mais do que 1 milhão de "Expressed Sequence Tags" (ESTs) podem ser posicionados no genoma, o que indica a qualidade da montagem. No web site citada anteriormente, estão descritos aproximadamente 23.800 genes e 24.800 modelos gênicos (WHEELER et al., 2007) e podem ser visualizados no site http://bovinegenome.org/. Características adicionais e anotações (GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2006) associadas à sequência de DNA, transcritos não-codificadores, famílias de proteínas, ESTs, regiões repetitivas, polimorfismos e QTL também estão disponíveis (Figura 3) (GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2006; UNIPROT CONSORTIUM, 2007; ADELSON, 2008).

A informação gerada pelos projetos genomas (sequência completa de DNA do genoma de diferentes indivíduos das diversas espécies) pode agora ser mais bem utilizada em investigação científica em genética/genômica com a disponibilidade, em abundância, de sequência de DNA, anotação estrutural e funcional, mapas de SNPs (polimorfismos pontuais de DNA) (SNPs chip) e sondas de oligonucleotídeos (expressão gênica, microarray), respectivamente, para se melhorar o entendimento da contribuição dos componentes genéticos, ambientais e suas interações na determinação das características de herança complexa (Figura 4). A genômica aplicada ao melhoramento genético permitirá avaliar o efeito da seleção natural e artificial sobre as populações de animais domésticos, inferir a variabilidade genética entre indivíduos ou raças, com implicações sobre o controle de endogamia e conservação de diversidade genética, diagnóstico e controle de doenças genéticas, assim como obter ganho genético superior por seleção auxiliada por marcadores (Figura 5).

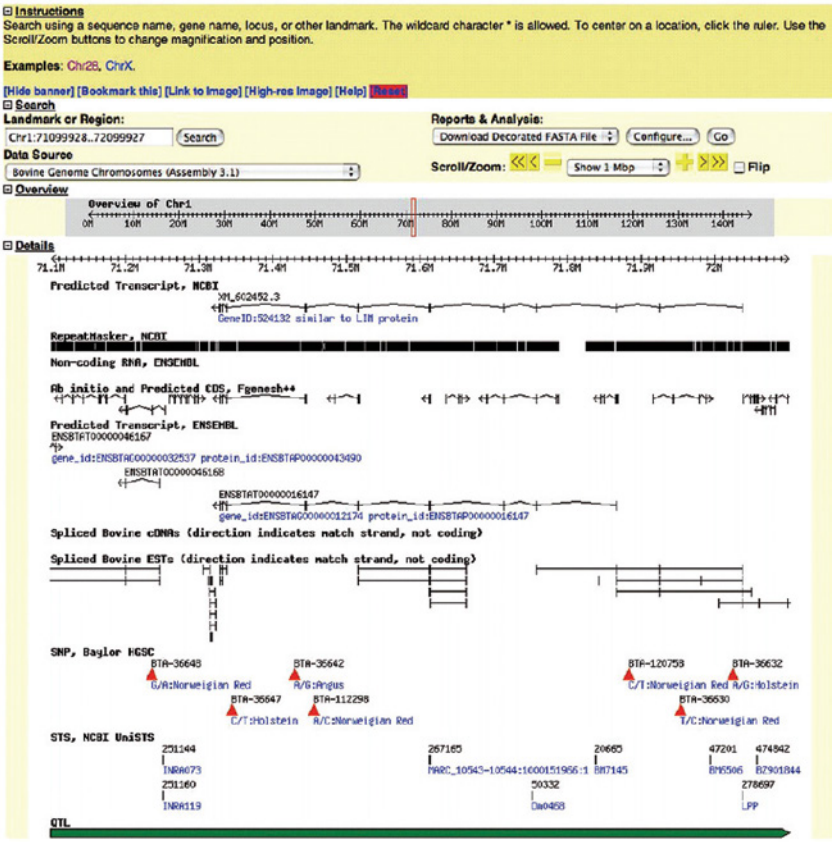


Figura 3. Informações disponíveis para uma região de 1x10^{6}pb do cromossomo bovino 1. Vários recursos e anotações são visíveis, inclusive modelos de gene, regiões repetitivas, polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), "*sequence tagged sites*" (STS) (principalmente microssatélites) e de *loci* de características quantitativas (QTL). Outros recursos não estão exibidos

ara melhor visualização. Note que variantes "splicing" de "*expressed sequence tags*" ESTs são altamente informativos ao se decidir qual modelo gênico utilizar para continuação do estudo.

Fonte: Adaptado de Adelson, 2008.

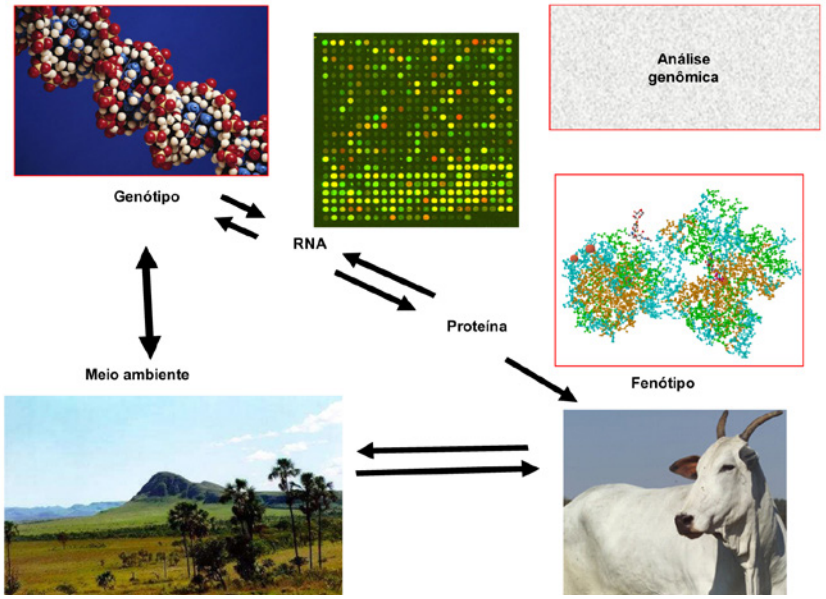


Figura 4. Análise genômica aplicada a produção animal .

Genômica para melhoristas
• Avaliação da variabilidade genética entre indivíduos, raças ou espécies (controle de endogamia e conservação de diversidade).
• Estudos evolucionários (taxonomia, seleção natural e artificial).
• Controle de pedigree, teste de paternidade (Matriz de Parentesco–BLUP).
• Diagnóstico e controle de doenças genéticas.
• Ganho genético superior por GAS, MAS e GS.

Figura 5. Aplicações da genômica para melhoristas.

Mapas de SNPs, Expressão Gênica e QTL

Em razão da frequência e importância dos SNPs, a segunda fase do projeto genoma bovino é o projeto HapMap (KAPPES et al., 2006). Esse projeto tem por objetivo a identificação de centenas de milhares de SNPs, a partir dos quais podem ser selecionados aproximada-

mente 60.000 SNPs para desenvolvimento de plataformas de genotipagem de alta escala. Até o presente, existem aproximadamente 1.728.285 SNPs no genoma bovino. O projeto HapMap bovino vem validando uma coleção de SNPs para propósitos de genotipagem, de maneira que a disponibilidade de marcadores não é mais uma limitação. Apesar dos custos ainda serem elevados e da ausência de consenso a respeito do número de indivíduos necessários para estudos de associação (WANG et al., 2005), essa tecnologia já se mostrou eficiente em mapear diversas características em humanos (BILLARS et al., 2007; GARCIA-CLOSAS et al., 2007; GUDBJARTSSON et al., 2007; GUDMUNDSSON et al., 2007; HELGADOTTIR et al., 2007; LIU et al., 2007; SCHYMICK et al., 2007; STEER et al., 2007; STEINTHORSDOTTIR et al., 2007), sugerindo sua aplicabilidade para outras espécies.

Um microarray "Illumina BovineSNP50 Beadchip" foi desenvolvido e avaliado por Wiggans et al. (2009) contendo aproximadamente 57.000 SNPs. Após genotipagem de 12.591 touros e vacas, diversos SNPs foram excluídos por serem monomórficos (6.572), problemas de genotipagem (3.213), frequência alélica inferior a 2% (3.649) e outros 660 por diversas razões, restando 40.874 SNPs. Após verificação de parentesco entre diversos indivíduos, e o compartilhamento de alelos, a concordância estimada atingiu 99,96% a 100% dos genótipos. A acurácia obtida para as genotipagens com o microarray Illumina "BeadChip" fornece a base para avaliações genômicas como estudos de associação com características de importância econômica em gado de corte e leite (WIGGANS et al., 2009).

Apesar de experimentos visando caracterizar a expressão gênica empregando microarrays de cDNA e oligonucleotídeos de primeira geração terem sido conduzidos (SMITH et al., 2005; CORCORAN et al., 2006; EL-SAYED et al., 2006; SOMERS et al., 2006), a disponibilidade de microarrays mais abrangentes e melhor anotados certamente proverá informação adicional para se entender o programa normal de controle da expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário de bovinos. Além dos impactos esperados na agricultura, como clonagem, produção e transferência de embriões e seleção auxiliada por marcadores (MAS), também aumentará o valor de bovinos

e ovinos como modelos biomédicos para desenvolvimento, uma vez que estes fornecerão estrutura conceitual para a construção de redes regulatórias de expressão gênica, que são bastante conservados entre mamíferos (ADELSON, 2008; BURT, 2009; ELSIK et al., 2009; LEMAY et al., 2009; LIU et al., 2009; TELLAM et al., 2009; ZIMIN et al., 2009).

Mapeamento genético

Quando diferentes genes estão localizados próximos no mesmo cromossomo, diz-se que esses *loci* estão em ligação. O processo da recombinação ou permuta, que ocorre durante a meiose, é responsável pela troca de segmentos cromossômicos entre homólogos. A frequência de recombinação é proporcional à distância entre os *loci*. As distâncias são medidas em função da frequência de recombinação na progênie e expressas em centiMorgan (cM). Um centiMorgan equivale a aproximadamente 10^6 pares de base (EMERY; MALCON, 1995).

O mapa genético é construído a partir da frequência de recombinação gênica na progênie (FRIES, 1993) estimada por meio da análise de segregação de polimorfismos genéticos em famílias informativas, em que um parental é heterozigoto para os dois loci (população referência) (WELLER et al., 1990) (Figura 6). O mapeamento genético também pode ser efetuado pela análise de espermatozoides, avaliando a frequência de recombinação diretamente nos gametas, com impacto, especialmente, em espécies que possuem intervalo entre gerações muito longo ou outras restrições à geração de famílias estruturadas (ARNHEIN et al., 1994).

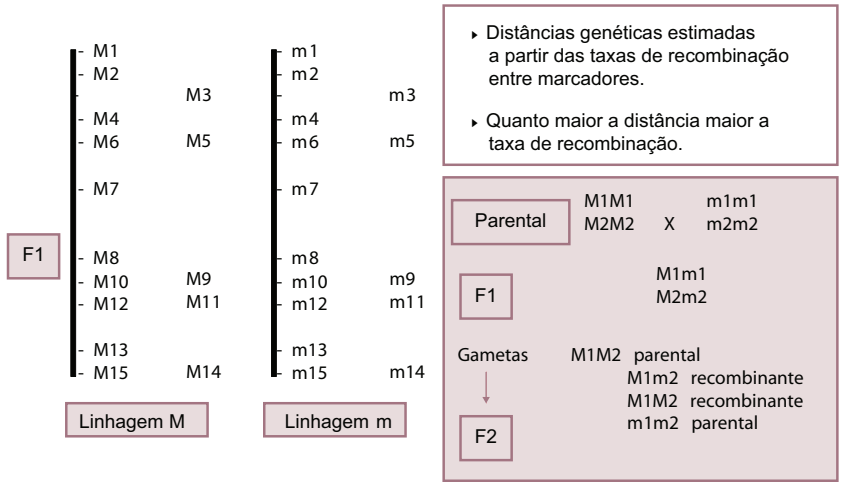


Figura 6. Análise de ligação entre marcadores (Mapa Genético).

Um mapa genético ilustra a ordem dos genes ou marcadores genéticos em um cromossomo, assim como a distância relativa entre os mesmos. Esse mapa consiste de marcadores altamente polimórficos, distantes, no máximo, 40 cM um do outro, de modo que qualquer *locus* possua uma distância inferior a 20 , cm do marcador (LANDER; BOTSTEIN, 1989). Três marcadores por cromossomo (90 marcadores no total) seria um número inicial suficiente para cobrir, com baixa densidade, todo o genoma bovino (FRIES et al., 1989).

Uma vez que a localização um *locus* em um mapa genético depende da segregação de marcadores, os mapas genéticos possuem preponderância de marcadores polimórficos, e foram inicialmente construídos primariamente com marcadores microssatélites. Os Microssatélites apresentam, em geral, ampla distribuição e frequência no genoma, alto nível de polimorfismo, além da facilidade de detecção através de "PCR". Essas características fizeram dos microssatélites os marcadores escolhidos para construção de mapas de ligação (LITT; LUTY, 1989; TAUTZ, 1989; WEBER; MAY, 1989; BECKMANN; SOLLER, 1990; LUTY et al.,1990).

O conteúdo de polimorfismo informativo, conhecido por "PIC" para um determinado marcador, refere-se à porção da progênie em que é possível determinar exatamente a transmissão dos alelos parentais.

O PIC é dependente no número de alelos por *locus* e das frequências dos alelos (BOTSTEIN et al., 1980). O polimorfismo encontrado em populações endogâmicas é geralmente menor do que em populações não endogâmicas (COWAN et al., 1990). Entretanto, a variação encontrada em diversas raças bovinas é suficiente para o mapeamento genético (SOLLER, 1990; GEORGES; MASSEY, 1991).

O primeiro mapa genético publicado para animais domésticos foi o de galinha (*Gallus gallus*) (BUMSTEAD; PALYGA, 1992; GROENEN et al., 1998, 2000), e posteriormente para diversas espécies como de bovinos (*Bos taurus*) por Bishop et al. (1994) com 306 marcadores genéticos, dos quais 290 microssatélites, e Barendse et al. (1994) com mais de 200 *loci* descritos, cobrindo praticamente todo o genoma; suínos (*Sus scrofa*) (ROHRER et al., 1994; ROHRER et al., 1996); ovinos (*Ovis aries*) (CRAWFORD et al., 1995; MAURÍCIO et al., 1998; MADDOX et al., 2001); caprinos (*Capra hircus*) (VAIMAN et al., 1996); coelhos (CHANTRY-DARMON et al., 2006) e patos (*Anas platyrhynchos*) (HUANG et al., 2006).

Em virtude dos avanços obtidos em genômica e automatização, mapas genéticos de alta densidade estão disponíveis para diversas espécies. A disponibilidade de mapas genéticos pode fornecer informações importantes a respeito da organização e localização de genes clonados, assim como estrutura para identificação de regiões cromossômicas que interferem em características de importância econômica "QTL" (CRITTENDEN et al., 1993).

Identificação de *loci* que influenciam características quantitativas "QTL "

Características quantitativas são aquelas sob controle poligênico, e frequentemente apresentam variação fenotípica entre e dentro de populações. Essas características são determinadas por vários genes, assim como fatores ambientais, sendo que cada gene contribui com uma pequena porção da variação genética (FALCONER; MACKAY, 1996).

O principal objetivo da aplicação da genética molecular ao melhoramento genético animal consiste em identificar e mapear os genes

que interferem na expressão de características quantitativas de importância econômica, visando melhorar a compreensão do controle genético de características complexas como desenvolvimento ponderal, idade ao primeiro parto, ganho de peso pós-desmama, rendimento e qualidade de carcaça, resistência a doenças, adaptação e longevidade.

Os dois principais procedimentos utilizados com o propósito de mapeamento de polimorfismos genéticos associados à variação fenotípica em características quantitativas são o do Gene Candidato ou do Scan Genômico, com base em mapa genético ou ligação (SCHWERIN et al., 1995, ANDERSSON, 2001; HU et al., 2009). Os resultados obtidos das pesquisas em genômica e mapeamento de QTL foram compilados por Rocha et al. (2002) e Khatkar et al. (2004) para bovinos; Rothschild (2003, 2004), Buske et al. (2006), Chen et al. (2007) e Otto et al. (2007) para suínos; e Abasht et al. (2006) e De Koning et al. (2007) para galinhas.

Abordagem do gene candidato

O procedimento do gene candidato refere-se ao estudo da relação entre polimorfismos em genes relacionados a proteínas-chave de vias metabólicas de importantes processos fisiológicos e diferenças no desempenho animal, visando à geração de marcadores tipo I, ou seja, polimorfismos determinantes de variação fenotípica (ANDERSSON, 2001) (Figura 7). A implementação da abordagem do gene candidato consiste nas seguintes fases: (1) coleta ou geração de população referência; (2) coleta de dados fenotípicos de interesse; (3) seleção de genes candidatos; (4) genotipagem dos animais e (5) análise dos dados fenotípicos e genotípicos (KADARMIDEEN et al., 2006). Apesar do progresso alcançado pelo uso dessa abordagem (MACLENNAN et al., 1990; TAYLOR et al., 1998; LIU; LAMONT, 2003; WANG et al., 2005; GUYONNET-DUPERAT et al., 2006), suas limitações são evidentes.

Abordagens para desenvolvimento de ferramentas para MAS	
Genes candidatos para bovinos	**Polimofismos genéticos causativos de variação**
• Crescimento - Eixo Hipotalâmico-hipofisário do hormônio do crescimento (GH, RGH, SST, IGF-1, IGF-1R, IGF-2 e PIT1). • Qualidade de carcaça - GH, Esteróides, Calpaina, Calpastatina e Miostatina, Tiroglobulina, Leptina (Gene Star Quality Gradee Tenderness, Igenity Tender Gene). • Produção de leite Ccomponentes - GH, KpCn, B-LGB, Albumina, DGAT. • Fertilidade - GnRH, FSH, LH, ESR, PRL, PRLR, PMSG, Leptina. • Doenças genéticas - BLAD, Dumps, Citrulinemia, Weaver... • Doenças infecciosas - MHC (Bola), Imunoglobulinas.	

Figura 7. Genes candidatos para bovinos.

Essa abordagem requer conhecimento da fisiologia da característica de interesse, que pode não estar disponível ou estar incompleto na maioria das vezes. Em geral, existem diversos genes candidatos para todas as características quantitativas, e pode ser difícil a seleção dos candidatos para estudos. Além disso, genes que não são parte de importantes processos fisiológicos conhecidos podem ter efeito significativo sobre a expressão das características. Por outro lado, a abordagem do gene candidato é eficiente somente quando ele apresenta a variação genética causativa de variação fenotípica. Os resultados devem ser interpretados com cautela, uma vez que associações significativas podem ser obtidas por desequilíbrio de ligação "Linkage disequilibrium" (LD) com genes causativos adjacentes (ANDERSSON, 2001).

Antes da disponibilidade da sequência completa do genoma das diversas espécies, genes candidatos eram selecionados por Análise Comparativa entre espécies, com sérias limitações, as quais se acentuam quanto maior a distância filogenética entre as mesmas. Com a disponibilização de informação genômica, especialmente mapas de SNPs, muitas dessas limitações serão suplantadas (HU et al., 2009).

Desenvolvimento ponderal e qualidade da carne

O desenvolvimento ponderal, a eficiência alimentar, a maciez da carne e a marmorização são algumas das principais características

avaliadas. Os avanços da Genética Molecular permitem avaliar com maior profundidade os genes e sistemas genéticos envolvidos nas vias metabólicas relacionadas ao crescimento animal e repartição de nutrientes para os diferentes tecidos (SCHWERIN et al., 1995).

Os animais com hipertrofia muscular (musculatura dupla) apresentam baixo conteúdo de gordura na carcaça e elevação da eficiência alimentar. Essa característica é determinada por um *locus* autossômico com herança parcialmente recessiva (HANSET; MICHAUX, 1985). Georges et al. (1988) identificaram uma banda de "DNA Fingerprinting" correlacionada com o fenótipo da hipertrofia.

O hormônio do crescimento "GH", por intermédio do IGF-I, desempenha importante função na regulação do crescimento (SCHLEE et al., 1994). O gene PIT-I codifica para fator ativador da pituitária necessário para secreção do GH. A somatostatina, potente inibidor do GH, também pode ser considerada um gene candidato (THUE; SCHMUTZ, 1994). Os genes Kapa-caseína, Beta-lactoglobulina são expressos nos leite, podendo afetar o potencial de produção de leite, expresso como habilidade materna em gado de corte, além de características organolépticas do queijo (MOODY et al., 1996).

Beever et al. (1990) avaliaram o efeito de grupos sanguíneos B, C e F, transferrina sérica e proteína carreadora de vitamina D, além de marcadores genéticos antígeno leucocitário bovino -A "BoLA-A" em características de carcaça (n=146) na raça Aberdeen Angus. Efeitos significativos entre grupo sanguíneo B e peso ajustado para 205 dias, aos 365 dias, ganho diário pré-desmama e espessura da camada de gordura, além de Bola e área de olho de lombo, foram obtidos pelos autores.

O efeito dos genes GH, hormônio paratireoidiano, prolactina, osteonectina e keratina foram avaliados em características de desempenho ponderal e conformação em 677 animais puros e cruzados entre as raças Aberdeen Angus, Brahman, Hereford, Holandês e Jersey. Os resultados evidenciaram uma associação entre alelos B, C e D do GH e decréscimo do peso ao nascimento de 1,0 desvios-padrão nas raças Brahman, cruzados Angus-Brahman e Brahman-Hereford e associações significativas entre hormônio paratireoidiano e peso a desmama e tamanho corporal. Os autores sugerem que outros estudos deveriam ser conduzidos com um número maior de animais para validar os resultados.

Associações entre polimorfismos dos genes Kapa-caseína, Beta-lactoglobulina, GH, receptor do GH, PIT-I, IGF-I e prolactina "PRL" com características de crescimento e habilidade materna em bovinos da raça Hereford foram avaliadas por Moody et al. (1996). Os resultados obtidos indicaram efeito da K-caseína no peso ao nascimento e ganho de peso pré-desmama, representando 15% e 8% da variação total para essas características respectivamente.

A qualidade da carne é influenciada por diversos fatores genéticos e ambientais, além da idade e sexo do animal e processamento "post-mortem". A maturação do músculo em carne ocorre por ação de sistemas enzimáticos proteolíticos. A enzima calpaína afeta a proteólise post-mortem determinando aumento na maciez final da carne. A regulação da atividade da protease calpaína é efetuada pelo inibidor de protease calpastatina, proteína endógena que coexiste em todas as células, configurando outro gene candidato para qualidade de carcaça. O efeito de polimorfismos do gene calpastatina sobre força de cisalhamento foi avaliado por Green et al. (1994), o que gerou resultados significativos.

Produção e qualidade do leite

As caseínas – principais proteínas do leite –, albuminas, lactoglobulinas e também proteínas séricas são consideradas genes candidatos para produção de leite, seus componentes e, consequentemente, também para características de habilidade materna como peso à desmama.

A caseína dos bovinos é subdividida em quatro grupos: Alfa, Beta1, Beta2 e Kapa- caseínas (FLORES; RICHARDSON, 1988). A Kapa-caseína é responsável pela estabilidade dos micelos, importante determinante das propriedades organolépticas dos produtos lácteos (KEMENES, 1996). O alelo B da Kapa-caseína está relacionado a rendimento e qualidade do queijo, provavelmente como resultado de maior velocidade de coagulação produzindo coágulos mais firmes e evitando perda de gordura (RAMPILLI et al., 1988). Está associado à maior concentração de proteína e redução na produção total de leite (BOVENHUIS et al., 1992). Os alelos A e B possuem frequência 0,92 e 0,08, respectivamente, na raça Nelore (KEMENES, 1996; DEL LAMA, 1996).

A Beta-lactoglobulina representa outra fonte de aminoácidos para os lactantes, possuindo dois alelos principais (A e B) (KEMENES, 1996). Efeitos positivos do genótipo BB na concentração de gordura e negativos na concentração de proteína e quantidade total de leite foram encontradas por Bovenhuis et al. (1992). Esses autores demonstraram que o alelo B está associado a uma maior concentração de Kapa-caseína. Kemenes (1996) e Del Lama (1996) encontraram as frequências semelhantes também para Beta-lactoglobulina, 0,33 para o alelo 1 (A) e 0,77 para o 2 (B) na raça Nelore.

Os resultados encontrados na literatura nem sempre são consistentes, podendo ser contraditórios. Efeito significativo na produção de leite, proteína e gordura somente para interação entre os *loci* em gado holandês de Israel foi observado por Ron et al. (1993). Velmala et al. (1995) não encontraram associação significativa entre haplótipos de caseína com nenhuma característica de produção.

O efeito de substituição do polimorfismo obtido por restrição do gene GH com a enzima de restrição *Alu* I em diversas raças de gado de leite foi estudado por Lucy et al. (1993). Os resultados indicaram indicação de superioridade do genótipo LL na produção de leite em gado Holandês, entretanto, na raça Jersey, o genótipo VV estava associado a uma maior produção. Schlee et al. (1994) encontraram frequência 0,8 e 0,71 do alelo L (leucina) em gado Holandês e Simental respectivamente. Frequências de 1,0, 0,93, 0,92 e 0,56 foram obtidas em Pardo-Suísso, Holandês, Guernsey e Jersey respectivamente (LUCY et al., 1993).

Polimorfismo de conformação de fita simples "SSCP" foi utilizada para identificar variantes do GH encontrados em animais da raça Holandesa criada em Israel, além de animais de diversas raças zebuínas e taurinas, e testar associações com produção de leite e seus componentes (LAGSIEL et al., 1996). Um dos haplótipos encontrados, de origem zebuína, apresentou efeito significativo na concentração de proteína.

O gene DGAT1 (acylCoA:diacylglycerol Oacyltransferase) codifica uma enzima catalítica responsável pela produção de triglicerídios. Seu potencial como gene candidato ficou evidente em estudos com camundongos deficientes (Knockout) nas duas cópias do gene

DGAT1 (SMITH et al., 2000). DGAT1 foi recentemente identificado em um QTL para produção de leite em bovinos, e diversas mutações já foram identificadas em diferentes posições do gene, sendo que a substituição, lisina/alanina na posição 232 da proteína (K232A) possui efeito significativo na produção e composição do leite (GRISART et al., 2002). Diversos estudos indicaram forte associação entre K232A e aumento na porcentagem de gordura do leite e redução da produção de leite (WINTER et al., 2002; SPELMAN et al., 2002; HORI-OSHIMA; BARRERAS-SERRANO, 2003; KOMIZAREK et al., 2004).

Outro gene candidato para produção de leite é o gene Pit-1, em razão de sua função em mecanismos fisiológicos relacionados com crescimento. Esse é responsável pela regulação da expressão do gene GH, e sua deficiência determina uma redução da proliferação das céluas produtoras de GH (MCCORMICK et al., 1990). Uma mutação (A/G) no exon VI, auterando o sítio de restrição da *Hinf*I, foi observada gerando dois alelos (WOOLLARD et al., 1994). Renaville et al. (1997) observou associação entre esse polimorfismo e produção de leite, assim como Hori-Oshima e Barreras-Serrano (2003), que observaram efeito significativo em produção de leite, além de iteração com genótipos de DGAT.

Fertilidade

O melhoramento genético para fertilidade é especialmente importante em bovinos por possuírem baixa prolificidade e alto custo de manutenção das vacas em relação ao custo total do sistema produtivo. No entanto, o ganho genético anual esperado é menor do que para características de desenvolvimento ponderal, rendimento de carcaça ou produção de leite devido, entre outros fatores, expressão limitada ao sexo, baixa herdabilidade e correlação negativa com outras características. A seleção para fertilidade, normalmente, é efetuada objetivando a redução da idade da vaca ao primeiro parto e intervalo entre partos, além de características conformacionais (tipo), como, por exemplo, distância entre ísquios e úbere para vacas e aprumos para touros, e ausência de doenças reprodutivas (SCHWERIN et al., 1995).

A abordagem do gene candidato para estudos de fertilidade tem sido utilizada para identificação de marcadores genéticos. Os princi-

pais genes selecionados para estudos de associação são os hormônios do eixo hipotalâmico-hipofisário como: hormônio liberador de gonadotropinas "GnRH", prolactina, fator inibidor da prolactina "PIF", hormônio folículo estimulante "FSH", hormônio luteinizante "LH", ocitocina, gonadotrofina sérica de égua prenhe "PMSG", seus respectivos receptores e enzimas das vias de biossíntese (HAFEZ, 1988).

Bindon e Piper (1986) descreveram o fenótipo conhecido por "Boroola" em ovinos associado a um aumento no índice de fertilidade de aproximadamente 20%. Associação entre polimorfismo do gene receptor de estrogênio "ESR" e tamanho de leitegada foi evidenciado em suínos com efeito de substituição de 0,8-1,0 leitões por leitegada (ROTHSCHILD et al., 1994).

A associação entre antígenos do complexo principal de histocompatibilidade "MHC" e fertilidade de bovinos da Noruega foi estudada por Mejdell et al. (1994). Os autores obtiveram efeito significativo de alelos BoLA-A no aparecimento de cio. Os autores sugerem que esse efeito é devido a desequilíbrio de ligação entre MHC e a enzima 21-hidroxilase, relacionada com a biossíntese de glicocorticoides e mineralocorticoides a partir de progesterona.

Doenças hereditárias

A utilização de técnicas de biologia molecular está aumentando o entendimento da contribuição genética em doenças hereditárias de diversas espécies de animais. O procedimento do gene candidato para uma doença tem por objetivo clonar e sequenciar para identificar variantes genéticas que a determina, e, quando não estiverem disponíveis genes candidatos, as mutações podem ser mapeadas utilizando-se de marcadores como os microssatélites (HOLMES, 1994). A identificação de animais portadores de doenças genéticas é possível antes da produção de descendentes, evitando assim que o gene deletério seja transmitido às próximas gerações.

Associação entre produção de leite e a doença mieloencefalopatia degenerativa progressiva "Weaver disease", caracterizada em bovinos da raça Pardo-suiço por paresia progressiva dos membros pélvicos e ataxia, foi descrita por Hoeschele e Meinert (1990). Georges et al. (1994) mapearam esse gene próximo ao microssatélite TGLA-116, o

que possibilitará avaliar se essa associação é devido à pleiotropia ou ligação genética.

A deficiência na adesão de leucócitos em bovinos "BLAD" é resultado da substituição de uma glicina por um ácido aspártico na posição 128 da região extracelular da Integrina-Beta-2. Pode ser diagnosticada por meio de "PCR-RFLP" utilizando iniciadores específicos e enzima de restrição *Taq*-I. A frequência gênica supera os 15%, em populações de gado holandês, ocasionando perdas da ordem de 5 milhões de dólares nos EUA (SHUSTER et al., 1992; HEALY; DENNIS, 1994, KEHRLI et al., 1994).

A glicogenólise generalizada, conhecida por "Pompe's disease", é uma doença autossômica recessiva causada por uma insuficiência da enzima Beta-glucosidase ácida, levando a um acúmulo de glicogênio nos tecidos. Essa doença foi citada primeiramente em humanos e posteriormente em bovinos da raça Brahman por Jolly et al. (1977). A doença se manifesta, geralmente, ao redor dos 6 meses de idade com aumento progressivo de fraqueza muscular e falta de coordenação e morte ocorrendo aos 9-12 meses (REICHMANN et al., 1994).

Outras doenças hereditárias mapeadas são: (1) Citrulinemia – ineficiência da argininasuccinato sintetase (DENNIS et al., 1989), manifesta-se pelo aumento da concentração de amônia e diminuição de arginina no plasma sanguíneo ao redor de 24 horas após o nascimento, com morte até uma semana de vida. A frequência gênica observada na raça australiana "Friesien" foi F(g) = 0,10 (SHANKS et al., 1995); (2) Deficiência da Uridina Monofosfato Sintetase, "Dumps", descrita por Schwenger et al. (1993), é resultado de uma mutação pontual gerando um "códon" terminal; (3) Deficiência na coagulação sangüínea devido a uma deleção de 20 pares de base no gene Fator XI mapeado no cromossomo 17 (OVERTON et al., 1996).

Resistência a doenças infecciosas

O Complexo Principal de Histocompatibilidade "MHC -Major Histocompatibility Complex", também conhecido por Antígenos Leucocitários "BoLA -Bovine Leukocyte Antigen" em bovinos ou por "HLA -Human Leukocyte Antigen" em humanos, desempenha importante papel no sistema imunológico de vertebrados, incluindo mamí-

feros, aves, répteis, anfíbios e peixes. Atuam no reconhecimento de moléculas ou microrganismos estranhos ao organismo. A sua função é se ligar a peptídeos derivados do metabolismo proteico extracelular e apresentá-los aos linfócitos T, desencadeando a resposta imunológica (ANDERSON, 1994).

Os antígenos MHC de bovinos, constituídos por 105 genes contidos em 4.000 Kb, são, geralmente, subdivididos em Classe I, apresentando 45 *loci* expressos em praticamente todos os tecidos; Classe II expressos em células do sistema imune (macrófagos e células B); Classe III, envolvidos com comunicação intercelular e biossíntese de esteroides; e Classe IV, presente em aves (KAUFMAN et al., 1990).

O polimorfismo nesses *loci*, aparentemente, deve ser mantido por seleção balanceada "balancing selection", uma vez que são observadas: (1) frequências alélicas melhor distribuídas do que o esperado para alelos neutros; (2) frequência relativa de substituições não sinônimas (com alteração da sequência de aminoácidos da proteína) superior às substituições sinônimas (HUGHES; NEI, 1988, 1989); e (3) tempo de persistência dos alelos MHC, excede o esperado para alelos seletivamente neutros (TAKAHATA; NEI, 1990).

O balanceamento das frequências alélicas pode ser determinado por interações com patógenos. Dois mecanismos são utilizados por Andersson (1994) para explicar esse tipo de seleção: (1) sobredominância, a frequência de heterozigotos superior ao esperado; (2) valor adaptativo dependente das frequências alélicas (vantagem seletiva é inversamente proporcional a frequência alélica populacional); e (3) acasalamento preferencial, evitando o cruzamento entre indivíduos aparentados.

Andersson (1994) publicou uma revisão sobre polimorfismos de MHC e associação com resistência a doenças infecciosas, em que os haplótipos Classe I estão frequentemente associados a um aumento na resistência, e os Classe II a uma maior resposta à vacinação. Associação entre polimorfismo do BoLA-A e valor genético estimado para resistência a mastite e ketose em gado da Noruega foi avaliada por Mejdell et al. (1994). Associação entre o haplótipo 1 de DRB e mastite por *Staphylococcus aureus* foi observada por Berryere et al. (1994).

Associação entre suscetibilidade a linfocitose persistente e Bola-DRB3 foi apresentada por Xu et al. (1993).

O aumento do valor genético para resistência a diversas doenças simultaneamente, por meio da seleção de alelos específicos MHC, é improvável, uma vez que a superioridade relativa de um determinado genótipo varia entre famílias e raças, assim como entre cepas dos patógenos. Além disso, a seleção de determinados alelos poderá aumentar a resistência a uma doença em particular, podendo acarretar em diminuição da resistência para outras, e a perda de diversidade de MHC necessitaria de milhões de anos para ser restaurada. Esses argumentos demonstram a importância de se conservar a diversidade do MHC (ANDERSSON, 1994; MEJDELL et al., 1994). A melhor compreensão da função e mecanismos dos BoLA permitirá o desenvolvimento de vacinas mais eficientes (ANDERSSON, 1994).

Associação entre uma banda de 16 Kb do agrupamento genético da lisozima e sua atividade enzimática em bovinos da Noruega foi identificada por Olsaker et al. (1993). Essa enzima está presente no soro sanguíneo e colostro e possui ação bactericida uma vez que degrada a camada peptidoglicana da parede celular bacteriana estimulando a resposta imunológica (JOLLÈS; JOLLÈS, 1984).

Abordagem do scan genômico

No procedimento baseado em mapa genético, ou de ligação, diversos marcadores moleculares polimórficos (geralmente considerados seletivamente neutros) são empregados para identificar *loci* que interferem em características quantitativas, conhecidos por "QTL" (Quantitative Trait *Loci*), ou ainda Economic Traits *Loci* (ETL). Em outras palavras, a abordagem do scan genômico analisa a relação entre a variância de uma característica fenotípica e a segregação de marcadores selecionados devido às suas posições ao longo do genoma (ANDERSSON, 2001) e permitirá localizar no mapa genético *loci* que afetam a expressão da característica.

Esses são chamados de marcadores tipo II, ou seja, polimorfismos em ligação com marcadores tipo I (O'BRIEN, 1991). A primeira publicação de mapeamento de QTL utilizando marcadores moleculares distribuídos ao longo de todo o genoma foi publicado por Paterson et al.

(1988). Posteriormente, um mapeamento por intervalo para populações experimentais foi desenvolvido por Lander e Botstein (1989).

A implementação da abordagem do scan genômico consiste nas seguintes fases: (1) coleta ou geração de população referência; (2) coleta de dados fenotípicos de interesse; (3) seleção de marcadores; (4) genotipagem dos animais; (5) construção de mapas de ligação; e (6) análise dos dados fenotípicos e genotípicos (KADARMIDEEN et al., 2006).

Uma população referência é uma população gerada para realização de investigação científica com dados fenotípicos e suficiente quantidade de DNA para genotipagem. Geralmente são geradas pelo cruzamento entre linhagens contrastantes ou por possuírem alguma característica interessante com variação genética. Alternativamente, populações em programas de melhoramento genético que empregam inseminação artificial em larga escala, como é o caso de bovinos leiteiros, geram delineamentos experimentais conhecidos por delineamentos de netas e delineamento de filhas (Daughter e Grand-Daughter designs), interessantes para aproveitar dados fenotípicos na identificação de QTL.

Uma vez que o intercruzamento de linhagens contrastantes é o desenho experimental mais poderoso na identificação de QTL, este tem sido amplamente utilizado para gerar populações referência, como, por exemplo: suínos Large White e javalis (KNOTT et al., 1998; JEON et al., 1999; NII et al., 2005, 2006), raças asiáticas e europeias de suínos (JUNGERIUS et al., 2004; STRATIL et al., 2006) e bovinos Angus (Bos taurus) e Brahman (Bos indicus) (JEON et al., 2003). Métodos eficientes e robustos que empregam regressão linear múltipla foram desenvolvidos para o mapeamento de QTL em pedigrees simples ou complexos (HALEY; KNOTT, 1992; HALEY et al., 1994; VISSCHER et al., 1996; SEATON et al., 2002).

O banco de dados de QTL de animais "Animal Quantitative Trait *Loci* (QTL) database (AnimalQTLdb)" contém toda a informação, disponível ao público, de animais de importância agropecuária da última década, relacionada a localização do QTL, marcadores adjacentes, testes estatísticos, magnitude de efeito do QTL e características associadas. Até maio de 2007, havia 846 QTLs de 55 publicações represen-

tando 91 diferentes características de bovinos (Tabela 2), 1.675 QTL de 110 publicações representando 281 diferentes características de suínos e 657 QTL de 45 publicações sobre 112 diferentes características de galinha (http://www.animalgenome.org/QTLdb/) (HU et al., 2007). Uma observação interessante é que QTL identificados para porcentagem de gordura no leite em bovinos leiteiros estão localizados nas mesmas regiões que os QTL identificados para gordura corporal em bovinos de corte (Figura 8). Isso não é de forma alguma inesperado, e acentua a ideia de que a arquitetura genética controla a expressão das características e interfere em diversos processos fisiológicos.

Tabela 2. Número de QTL para algumas características de bovinos.

Característica	QTL	Característica	QTL
Score de marmoreio	33	Peso vivo	9
Rendimento em carne	16	Gordura ajustada	4
Peso da carcaça quente	23	Gordura do rim, pelvis e coração	7
Ganho pós-desmama	1	Característica Leiteira	1
Maciez da carne	5	Qualidade de aprumos e pernas	4
Expessura de gordura	2	Qualidade do úbere	1
Rendimento de carcaça	14	Angularidade	2
Área de olho de lombo	5	Ligamentos posteriores do úbere	4
Ganho pré-desmama	13	Ligamentos anteriores do úbere	3
Peso a um ano	12	Estatura	3
Rendimento em leite	71	Tamanho de tetas	6
Rendimento de gordura no leite	59	Colocação de tetas	4
Rendimento de proteína no leite	55	Profundidade do úbere	4
Porcentagem de gordura no leite	58	Velocidade de ordenha	5
Porcentagem de proteína no leite	62	Temperamento	4
Duração d evida produtiva	2	Taxa de gêmeos	9
Score de células somáticas	20	Peso ao abate	7
Peso ao nascimento	37	Resistencia a tripanossonomiase	3
Taxa de ovulação	6	Distocia (Efeito direto)	3
Maciez da carne	3	Taxa de não retorno aos 90 dias	2

Fonte: Adaptado de Adelson, 2008.

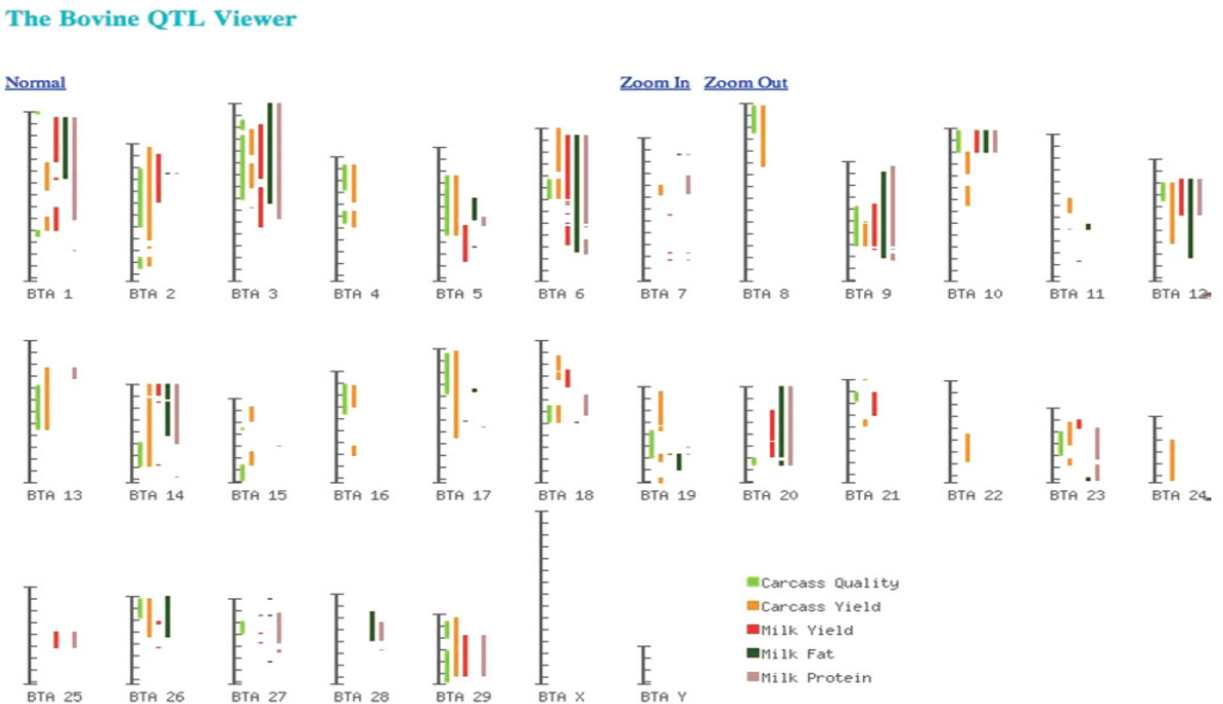


Figura 8. Resultado de QTL para bovinos de leite e corte relacionados a produção de gordura. Note que, na maioria dos casos, QTL para carcaça e leite se sobrepõem.

Fonte: Adaptado de Adelson, 2008.

Diversos pesquisadores vêm buscando identificar marcadores tipo I e tipo II, resultantes da aplicação das abordagens do gene candidato e scan genômico, em características como produção de leite, desenvolvimento ponderal, rendimento de carcaça, marmorização e maciez da carne, idade ao primeiro parto, intervalo entre partos, resistência a doenças e estresse, entre outras. Apesar de o mapeamento de QTL ter identificado centenas de regiões cromossômicas contendo genes causadores de doenças genéticas ou que afetam diversas características de herança simples em animais domésticos, o número de polimorfismos genéticos determinantes de variação fenotípica (mutações causais) em características quantitativas detectados permanece bastante reduzido, além de explicar apenas uma fração pequena da variação genética (Tabela 3). Um scan genômico pode detectar QTL para a característica de interesse, se possuir marcadores distribuídos ao longo de todo o genoma, mas ainda é bastante difícil detectar *loci* com efeitos pequenos ou separar os efeitos de genes em desequilíbrio de ligação forte (GODDARD; HAYES, 2009; HU et al., 2009).

Tabela 3. Lista de QTL com mutação causal conhecida em animais domésticos.

Gene	Espécie	Característica	Mutação
KIT	Porco	Branco dominante	Duplicação
RYR1	Porco	Gene do alotano	R614C
PRKAG3	Porco	RN^-	R200Q
IGF2	Porco	Desenvolvimento e composição de carcaça	Transição G/A
DGAT	Vaca	Porcentagem de gordura no leite	K232A
MSTN	Vaca	Musculatura dupla	Diversas
CLPG	Ovelha	Musculatura dupla	Substituição A/G
IGF1	Cachorro	Tamanho corporal	Diversas
MITF	Cachorro	Coloração de pelagem	Inserção SINE
CBD103	Cachorro	Coloração negra	Deleção de 3pb
PMEL17	Galinha	Branco dominante	Inserção/deleção de 9-15pb
MC1R	Galinha	Coloração de pluamagem	E92K
SLC45A2	Galinha	Coloração de pluamagem	106delT

Fonte: Adaptado de Hu et al., 2009.

Análise de associação "genome-wide "

Análise de Associação com cobertura ampla do Genoma "Genome-wide association analysis" (GWA) é uma abordagem que utiliza alta densidade de marcadores localizados ao longo de todo o genoma para a identificação de regiões cromossômicas associadas com um determinado fenótipo, sem conhecimento da mutação causal da variação genética. GWA está baseada na suposição de que uma mutação causativa para um determinado fenótipo está em desequilíbrio de ligação com marcadores adjacentes nas diversas famílias de uma população, mesmo após diversas gerações de recombinação. Para se capturar todos os segmentos cromossômicos em LD fraco e (ou) com pequeno efeito, faz-se necessário um mapa de alta densidade, isto é, grande número de marcadores localizados a pequenas distâncias. Entretanto, esses marcadores estão hoje disponíveis, tornando GWA possível. Apesar de GWA ter sido desenvolvida há pouco tempo, diversos estudos já foram publicados (DUERR et al., 2006; SAXENA et al., 2007; SCOTT et al., 2007, VAN TASSELL et al., 2008; GODDARD; HAYES, 2009).

GWA pode contribuir para abrir novas fronteiras no entendimento de características de herança complexa (HIRSCHHORN; DALY, 2005), uma vez que existam populações com grande número de indivíduos e muitas gerações de recombinação que permitem o mapeamento fino de QTL empregando SNPs para gerar um mapa genético de altíssima densidade (KARLSSON et al., 2007; ADELSON et al., 2009).

Predições genômicas combinam dados genotípicos, fenotípicos e pedigree com o intuito de aumentar a acurácia de seleção. A avaliação genética tradicional emprega somente dados fenotípicos e probabilidades de compartilhamento de genes idênticos por descendência "IBD" gerados a partir do pedigree. Marcadores espaçados ao longo do genoma com baixa densidade permitiam a identificação somente de regiões cromossômicas muito longas que podem conter dezenas de genes ou famílias de genes, mas não permitiam a detecção de genes de pequeno efeito, muito menos separa os efeitos individuais dos diversos *loci* dentro do segmento cromossômico. Marcadores genotipados para milhares de *loci* ao longo de todos os cromossomos, utilizando platafomas de genotipagem de alta densidade de SNPs desenvolvidas recentemente, podem gerar estimativas mais preci-

sas (MEUWISSEN, 2007; VAN TASSELL et al., 2008; GODDARD; HAYES, 2009).

A abordagem GWA foi empregada em bovinos leiteiros dos EUA e Canadá por Van Raden et al. (2009) para se avaliar o ganho em acurácia em predições genéticas em comparação a avaliação tradicional genético-quatitativa. Os autores utilizaram genótipos para 38.416 marcadores e avaliações genéticas de Janeiro de 2003 de 3.576 touros (touros preditores) Holandeses nascidos antes de 1999 para efetuar a análise de associação. Os efeitos dos segmentos genômicos estimados nos touros preditores foram testados em touros nascidos de 1999 a 2002 (touros preditos). A informação obtida foi utilizada para se predizer os valores genéticos genômicos de animais nascidos em Janeiro de 2008, filhos(as) do touros preditos, e comparar com a acurácia estimada como a média dos valores genéticos dos progenitores, isto é, valor genético estimado sem incorporação de dados fenotípicos de descendentes.

O DNA foi obtido a partir de sêmen coletado e estocado ao longo dos anos, e fornecido por centrais de inseminação dos EUA e Canadá, além do Centro Nacional de Preservação de Germoplasma dos EUA. Os genótipos foram gerados com a utilização do microarray de SNPs "Illumina BovineSNP50 BeadChip". As predições genéticas para 5 características de produção, 5 de adaptação e 16 características conformacionais; além do mérito total, foram calculadas empregando modelo não-linear e distribuição a priori "heavy tailed" para considerar a presença de genes principais "major genes".

As predições genéticas obtidas com a utilização de informação genômica foram mais acuradas do que a avaliação tradicional para todas as 27 características. Os coeficientes de determinação (R2) foram de 0,05 a 0,38 superiores com predições genômicas não-lineares, com uma média de 23%. O ganho em acurácia foi equivalente à incorporação de dados relativos a 11 progênies. Os maiores benefícios entre as predições genômicas ocorreram para porcentagem de gordura no leite devido ao conhecimento de um gene principal. As acurácias aumentaram mais pela adição de indivíduos do que pela incorporação de marcadores. Os autores concluem que as acurácias das predições genéticas foram superiores devido ao acompanhamento da segregação de alelos durante a herança de genes, mesmo dos de pequeno efeito e recomendam o início da utilização de GS para tourinhos e novilhas a partir de 2009 (VAN RADEN et al., 2009).

Seleção auxiliada por marcadores moleculares – MAS

O melhoramento genético de bovinos de corte tem sido realizado para características de importância econômica como desenvolvimento ponderal, fertilidade, rendimento e qualidade de carcaça, utilizando avaliação fenotípica detalhada e princípios de genética quantitativa. A teoria dos índices de seleção, com ênfase em seleção dentro de rebanhos em sua grande maioria, foi empregada até meados de 1980. Posteriormente, a estimação do valor genético dos animais, expresso em termos de Diferença Esperada Na Progênie (DEP), ou "Estimated Breeding Value" (EBV), utilizando a metodologia dos modelos mistos, começou a ganhar grande destaque (HENDERSON, 1988; QUASS; POLLAK, 1980).

Entretanto, apesar dos resultados positivos, que podem ser observados na conformação e desempenho dos touros campeões nacionais dos EUA em 1960 e 1990 (Figura 9), algumas restrições limitam o ganho genético anual em diversas características. A eficiência de seleção é bastante baixa em características de baixa herdabilidade (fertilidade), de difícil mensuração ou que não podem ser diretamente mensuradas (resistência a doenças, rendimento de carcaça e eficiência alimentar), ou que apresentam correlações genéticas negativas (ganho de peso pós-desmama e idade ao primeiro parto) (Figura 10).

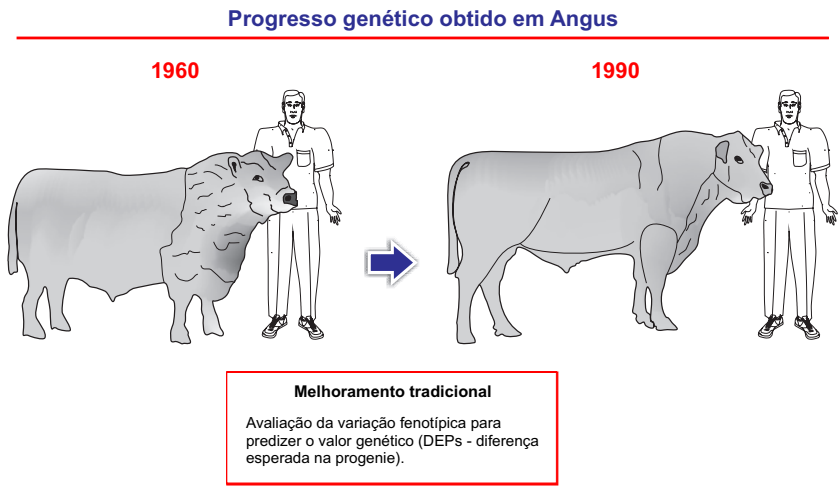


Figura 9. Melhoramento genético tradicional.

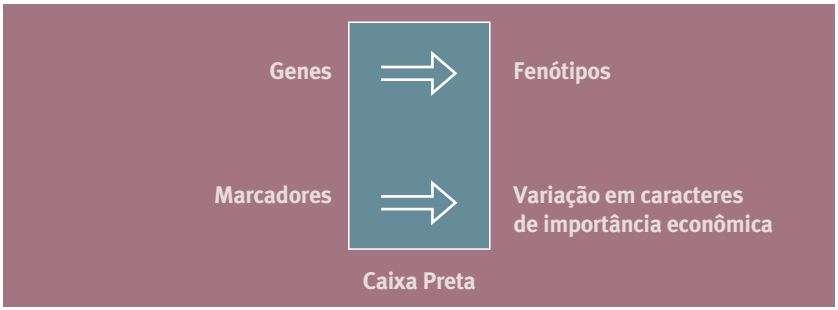
MAS – Vantagens para bovinos de corte

Interessante para características de:

- Média-baixa herdabilidade (ex.: fertilidade).
- Limitadas ao sexo (ex.: produção de leite).
- Avaliação tardia (ex.: intervalo entre partos).
- Avaliação Post-Morten (ex.: qualidade e rendimento de carcaça).
- Avaliação difícil/cara (resistência a doenças, eficiência alimentar).

Figura 10. Características interessantes para aplicação de MAS.

A aplicação da genética molecular poderá contribuir para suplantar algumas dessas limitações. A capacidade de dissecar características complexas em entidades mendelianas e estimar os efeitos desses segmentos cromossômicos (QTL), ou genes mapeados, permitirá aumentar a eficiência de seleção pela utilização dessas informações em programas de Seleção Assistida por Marcadores "MAS" (Marked Assisted Selection) na predição do valor genético (Figura 11).



Para se utilizar MAS é necessário identificar variação genotípica determinante ou associada a variação fenotípica em características de importância econômica.

Figura 11. Seleção auxiliada por marcadores.

O ganho genético anual poderia ser elevado tanto pelo aumento da acurácia quanto pela redução do intervalo de geração (Figura 12). A

acurácia dos valores genético preditos poderia ser incrementada pelo ao aumento na quantidade e qualidade de informação, especialmente para o caso de irmãos completos gerados por transferência de embriões, enquanto o intervalo poderia ser reduzido pela seleção precoce dos animais ou até de embriões (Figura 13).

Seleção Auxiliada por Marcadores

ΔG = Ganho genético anual

$$\uparrow \Delta G = \frac{\uparrow \sum^{j} R_j}{\downarrow \sum^{j} L_j} = \frac{\sum^{j} ir_{IH}\ \sigma_H}{\sum^{j} L}$$

r = Acurácia de seleção (informação)
L = Intervalo de geração (pré-seleção ou seleção em idade jovem)

Figura 12. Incremento no ganho genético anual pelo aumento da acurácia ou redução do intervalo entre gerações.

MAS - Vantagens para bovinos de corte

- Aumento da acurácia (mais informação) especialmente para animais jovens sem dados de desempenho próprio ou progênie.
- Pre-seleção para redução do intervalo de geração e (ou) redução de custos.
- Seleção de tourinhos jovens para teste de progênie.
- Novilhas (pré-puberes) para FIV.
- Embriões (biópsia, genotipagem e transplante).
- Irmãos completos (suínos, aves, FIV, TE).

Figura 13. Aplicação de MAS para aumentar ganho genético anual.

Novas possibilidades para seleção concomitante para características correlacionadas, implementação de sistemas de acasalamento para otimizar componentes genéticos não-aditivos (dominância e epistasia), introgressão de genes desejáveis a partir de outras raças ou bancos de germoplasma (SOLLER; BECKMANN, 1983; BEEVER et al., 1990; ROCHA et al., 1992; BINK; ARENDONK, 1994), utilização de marcadores genéticos em gado de corte (RUSSO; KLEIN, 2007) e seleção genômica em gado de leite (WIGGANS et al., 2009) estão sendo avaliadas por diversos pesquisadores.

O termo "Ilusão Aditiva" foi utilizado por Rocha et al. (1994) ao se referir a um otimismo exagerado com relação à possibilidade de utilização de MAS. Esses autores afirmam que os fenômenos biológicos, na maioria das vezes, não são aditivos, ou seja, genes não devem ser classificados como bons ou ruins. Somente o genótipo pode ser classificado dessa forma e, ainda assim, somente em relação à determinada condição ambiental. A inconsistência de resultados obtidos de associação entre características importância econômica dá suporte a esse ponto de vista.

A utilização de marcadores moleculares deve ser avaliada distinguindo os tipos I e os II. A seleção de polimorfismos genéticos com efeito direto na característica de interesse (marcadores tipo I), gerados pela utilização do procedimento do gene candidato, é conhecida por seleção auxiliada por genes (GAS). Esta possui potencial maior de aplicação em relação aos marcadores tipo II, conhecido por "MAS verdadeira", com efeito indireto devido à ligação entre o marcador e o "QTL" (NOTTER, 1995).

Algumas limitações ao uso de "MAS verdadeira" são:

1) Complexidade das metodologias estatísticas;
2) A associação entre um alelo marcador e o "QTL" pode variar entre e dentro de populações, e, por essa razão, a "MAS verdadeira" deve ser empregada primordialmente dentro de família em que a associação foi avaliada (NOTTER, 1995);
3) O marcador deve estar distante do "QTL" entre 1 cM e 2 cM, para evitar indivíduos recombinantes. Quanto mais distante o marcador, maior a necessidade de verificação da associação a cada geração (SMITH; SMITH, 1993);

4) As características de importância econômica possuem herança poligênica, ou seja, são controladas por um grande número de "QTL", de pequeno efeito cada. Entretanto, uma quantidade considerável da variabilidade genética pode ser determinada por um número relativamente pequeno de "QTL" de grande efeito, também conhecidos por "Major Genes". Exemplos incluem o gene Miostatina causativo da musculatura dupla (hipertrofia muscular) em algumas raças bovinas (NOTT; ROLLINS, 1979), gene DGAT para componentes do leite e gene boroola em ovinos (PIPER; BINDON, 1988).

Apesar das limitações, GAS está sendo empregada para identificar genótipos superiores e detectar portadores de doenças hereditárias, como a Síndrome do Estresse em Suínos "PSS" (RASMUNSEN; CHRISTIAN, 1976), Deficiência de Adesão Leucocitária "BLAD" (SHUSTER et al., 1992), resistência a doenças infecciosas, como tripanossonomíase (DELESPAUX et al., 2003) em bovinos. Características de herança simples, determinadas por um número pequeno de *loci*, como presença de chifres e coloração de pelagem, também vêm sendo avaliadas por meio de marcadores (GEORGES et al., 1993 a, b; SCHMUTZ et al., 1995), assim como para características de herança complexa de importância econômica em que GAS já começa a ser utilizada em suínos com a disponibilização de marcadores como RyR1– receptor do alotano, RN – Rendement Napole, ESR– receptor de estrógeno, MCR4– receptor da melanocortina 4 e HFABP– proteína do tipo cardíaco acopladora de ácido graxo (Tabela 4) (MATHUR, 2003); em bovinos com a disponibilização de marcadores, como, por exemplo Miostatina (MSTN), Calpastatina (CALP) e Tiroglobulina para melhoramento da maciez e marmorização da carne (BROBET et al., 1997, 1998; RUSSO; KLEIN, 2007) DGAT para componentes do leite (GROBET et al., 1998, 1997) e GS para 27 características de interesse em bovinos leiteiros (VANRADEN et al., 2009).

Tabela 4. Marcadores para suínos.

RYR1 (Alotano)	6	Qualidade de carne (magra e PSS)
RN (Rendement Napole)	15	Glicogênio, pH, perda de água cozimento
ESR (Rec. de Estrógeno)	1	Tamanho de leitegada
PRLR (Rec. de Prolactina)	16	Tamanho de leitegada, habilidade materna
Retino Binding Prot.	14	Tamanho de leitegada

Continua...

Tabela 4. Continuação.

RYR1 (Alotano)	6	Qualidade de carne (magra e PSS)
MC4R (Rec. Melanocortina 4)	1	Apetite e deposição de gordura
IGF-2	2	Leitegada e rendimento de carcaça
HFABP	6	Gordura intramuscular
C-KIT rec.	8	Coloração de pelagem

Fonte: Mathur et al., 2003.

Seleção genômica

Seleção Genômica (Genomic Selection–GS) se refere à seleção de reprodutores com base somente em valores genéticos genômicos (Genomic Estimated Breeding Values– GEBV) e está revolucionando o melhoramento de gado de leite. Os GEBVs são calculados como a soma dos efeitos dos marcadores, ou haplótipos desses marcadores, distribuídos ao longo do genoma com altíssima densidade, e, dessa forma, permite, teoricamente, a captura de todos os QTL, contribuindo para a variância genética de uma característica. Os efeitos dos QTL, inferidos a partir dos marcadores ou haplótipos, são primeiramente estimados em grandes populações referência com dados fenotípicos e genotípicos coletados. Somente dados genotípicos são necessários para as gerações subsequentes. As acurácias dos GEBVs preditos por GWA foram avaliadas em experimentos nos EUA, Nova Zelândia, Austrália e Holanda utilizando populações referência de 650 a 4.500 touros com teste de progênie e genótipos de aproximadamente 50.000 marcadores. Os resultados indicam acurácias para GEBV para tourinhos jovens, sem teste de progênie, variando de 20% a 67% e são dependentes das herdabilidades das características, do número de touros na população referência e do método estatístico. As acurácias dos GEBV foram significativamente superiores a valores genéticos estimados como a média dos EBVs dos progenitores, que é o critério utilizado para seleção de tourinhos para entrar em teste de progênie, gerando uma expectativa que a utilização de GS poderá aumentar ganho genético anual em mais de 100%.

Métodos tradicionais de seleção, como as predições Best Linear Unbiased Prediction (Blup) a partir de meio-irmãos e irmãos completos, que aumentam o ganho genético pelo aumento da acurácia, leva-

ram também a um aumento na taxa de endogamia por geração. Esse não é necessariamente o caso para a GS, que também aumenta o progresso genético pelo aumento da acurácia. A GS gera acurácias mais elevadas para os valores genéticos a partir de melhores predições dos componentes mendelianos (segmentos cromossômicos segregando nas diversas progênies da população) dos valores genéticos. Com isso há um aumento na capacidade de diferenciação entre irmãos e, consequentemente, redução na cosseleção desses e no aumento da taxa de endogamia por geração. A alta acurácia da GS deve reduzir a variância entre famílias e re-ponderar os valores genéticos dos indivíduos em direção a segregação dos componentes mendelianos. Além disso, as correlações intraclasse de irmãos induzida pela estimação devem ser menores em GS levando a uma maior redução da cosseleção de irmãos quando comparada a seleção com Blup. Os autores concluem que a predição de GEBV permite um ganho genético mais elevado e ao mesmo tempo reduzem o aumento na taxa de endogamia por geração, quando comparada à seleção com Blup (DAETWYLER et al., 2007).

Diversos desafios da GS e sua implementação continuam presentes, incluindo o aumento das acurácias das GEBV, integração das informações genômicas e aumento da população referência, planejamento de ganho genético no longo prazo e integração com biotecnologias da reprodução para se maximizar o ganho proveniente da sua utilização (HAYES et al., 2009; GODDARD; HAYES, 2009).

Introgressão genética e velogenética

Marcadores moleculares podem ser utilizados para realizar introgressão genética, reduzindo o número de gerações necessárias para isolar o gene "exógeno" de interesse no genoma que se deseja melhorar, além do intervalo entre gerações (TANKSLEY; RICK, 1980; COUTINHO; REGITANO, 1995). Introgressão genética foi proposto por Hillel et al. (1990), empregando "DNA- fingerprinting" com sondas minissatélite, retrocruzamentos e seleção dos reprodutores que possuam máxima semelhança no padrão de bandas para a linhagem receptora.

Introgressão Auxiliada por Marcadores, "Marker Assisted Introgression" (MAI) foi conduzida por Koudandé et al. (2003) para se transferir três

QTL para tolerância a tripanossonomíase de uma linhagem doadora de ratos (C57BL/6) em uma linhagem recipiente (A/J) e avaliar a eficiência do método no tempo de sobrevivência dos animais. Uma população F2 foi gerada por retrocruzamento por quatro gerações para o QTL da linhagem doadora. Após essa fase, indivíduos portadores dos QTL de interesse foram acasalados por intercruzamentos para a seleção de homozigotos tolerantes. Posteriormente, os animais foram agrupados de acordo com os genótipos dos QTL nos cromossomos 1, 5 e 17 e desafiados com *Trypanosoma congolens*. Animais que possuíam os QTL favoráveis apresentaram melhor tempo de sobrevivência em comparação à linhagem receptora, mas nenhuma delas atingiu o nível de tolerância da linhagem doadora. Os efeitos estimados para os QTL após introgressão foram aproximadamente 30% inferiores que a população original em que as associações foram estimadas (Figuras 14 e 15).

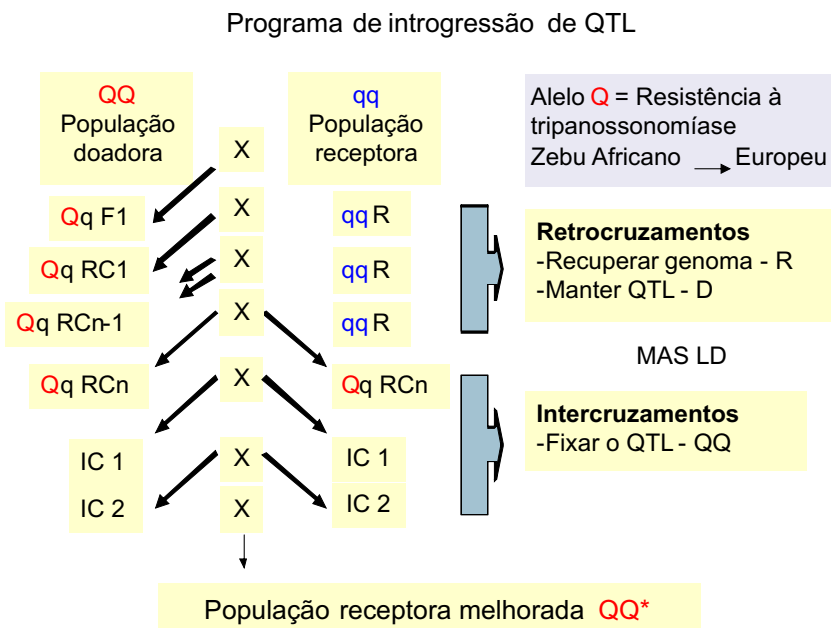


Figura 14. Programa de introgressão de QTL.

Fonte: Adaptado de Koudandé et al., 2003.

Programa de introgressão de QTL					
		Genótipos		Genótipos	
Cruzamento	Progênie	Progênie	Freq. Q	Selecionados	% Genoma R
D X R	F1	Qq	0,5	Qq	50
F1 X R	BC1	Qq/qq	0,5	Qq	75
BC1 x R	BC2	Qq/qq	0,5	Qq	87,5
BC2 x R	BC3	Qq/qq	0,5	Qq	93,75
BC3 x R	BC4	Qq/qq	0,5	Qq	96,88
BCn X BCn	IC1	QQ/Qq/qq	0,5	QQ(+Qq)	99,?
IC1 x IC1	IC2	QQ/Qq/qq	>0,5	QQ(+Qq)	99,?
ICk X ICk	ICk+1	QQ/Qq/qq	>0,5	QQ(+Qq)	99,?

População receptora melhorada QQ*

Figura 15. Cruzamentos, frequência do QTL e porcentagem do genoma da linhagem doadora.

Fonte: Adaptado de Koudandé et al., 2003.

A introgressão, seja por MAS ou GAS, assim como a GS, podem ser acelerada ainda mais com a aplicação de "velogenética" (MASSEY; GEORGES, 1992), em que embriões obtidos a partir de fetos, com aproximadamente 180-200 dias, podem ser avaliados por intermédio de técnicas de MAS, GAS ou GS, seus ovócitos coletados, maturados, fertilizados in vitro e transferidos para se repetir o ciclo. Outra possibilidade é a "whizzogenética" em que a avaliação genômica se dá em embriões que são selecionados para produção in vitro de gametas. Nesse caso, embriões selecionados por MAS, GAS ou GS são estimulados, em cultivo in vitro, para entrar em meiose e gerar gametas, que são então fertilizados e os novos embriões produzidos são novamente selecionados empregando somente informação genômica. O processo conhecido por "Whizzogenética" pode ser repetido até a obtenção do genótipo desejado quando se realiza clonagem para gerar embriões para implantação e permite a redução do intervalo entre gerações ao extremo de 7 dias (Figuras 16, 17 e 18) (HARLEY; VISSCHER, 1998).

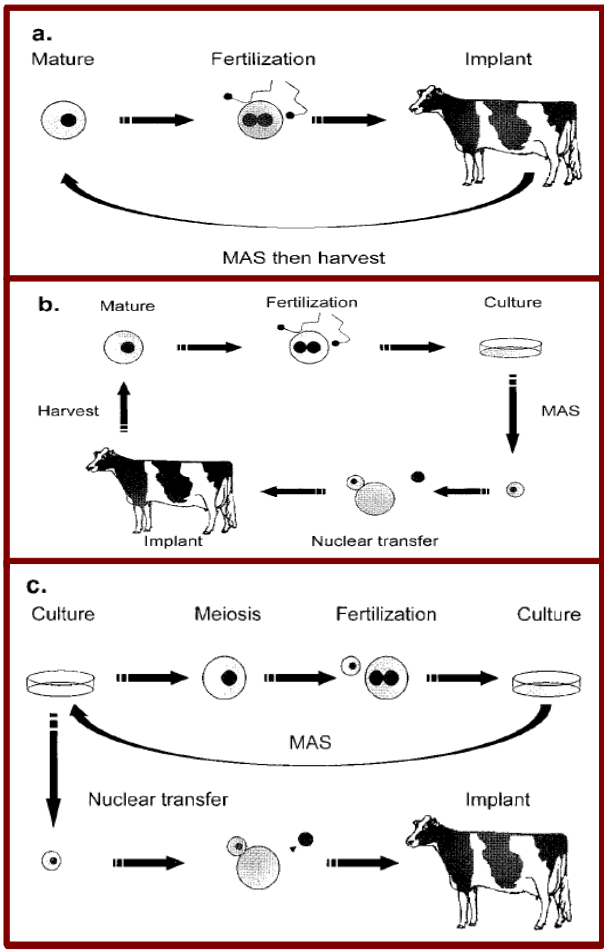


Figura 16. Cultivo celular e seleção auxiliada por marcadores. (a) Velogenética: novilhas são selecionadas in útero por MAS, ovócitos coletados, maturados e implantados e repete-se o ciclo; (b) Velogenética nuclear: embriões são cultivados in vitro e selecionados por MAS, clonados, transferidos, ovócitos coletados *in útero*, maturados, fertilizados e implantados para repetir ciclo; (c) Whizzogenética: embriões cultivados in vitro, selecionados por MAS, cultivos estimulados para entrar em meiose, gametas são então fertilizados e embriões selecionados por MAS. O processo é repetido até a obtenção do genótipo desejado quando se realiza clonagem para gerar embriões para implantação.
Fonte: Adaptado de Harley e Vischer, 1998.

Velogenética e Whizzogenética

Estimar efeito de marcadores, haplótipos, ou Segmentos Genômicos.

1ª GERAÇÃO:
1 - Genotipar Embriões
2 - Selecionar Embriões Superiores
3 - Induzir Meiose–Oócitos e espermatozoides
4 - Fertilização *in vitro*
5 - Maturação *in vitro,*

2ª GERAÇÃO:
Genotipagem, Seleção, Meiose, Fertilização, entre outros.

Quantas Gerações? Linkage e Acurácia.
Repetir estimação de efeitos de marcadores, haplótpos ou segmentos genômicos (densidade do mapa de SNPs, número de animais e gerações na família referência).

Figura 17. MAS empregando velogenética ou whizzogenética.

Redução do intervalo entre gerações

Monta natural – L = mínimo 2,5 anos (> 4-5anos)

Velogenética – L = 3 a 6 meses

Whizzogenética – L < 1 semana!!!

Figura 18. Intervalo entre gerações em bovinos em monta natural, empregando velogenética ou whizzogenética.

Estudos filogenéticos e populacionais

O conhecimento e ferramentas gerados com o progresso da genética molecular têm se mostrado muito eficientes em estudos filogenéticos e populacionais, aumentando a capacidade de identificar novas espécies, caracterizar a biodiversidade dos variados ecossistemas, assim como inferir a variabilidade genética intra e interpopulacional de animais domésticos de importância econômica, assim como de animais silvestres. Adicionalmente, esse conhecimento e ferramentas podem auxiliar no controle sobre os níveis de endogamia em determinada população. O controle da endogamia é de suma importância no planejamento de programas de conservação de espécies ou raças adaptadas, ou em programas de melhoramento genético animal que visem também ao ganho genético no longo prazo.

A análise de variação genética empregando métodos de genética molecular é, em muitos casos, mais eficiente na discriminação de subdivisões populacionais intraespecíficos do que a biometria morfológica. Genes mitocondriais e Y-específico, por possuírem herança exclusivamente materna e paterna respectivamente (são transmitidos somente por fêmeas ou machos), além de apresentarem padrão de herança não Mendeliana (sofrerem eventos de recombinação), constituem interessantes marcadores genéticos em estudos filogenéticos. Esses marcadores podem fornecer informação necessária para verificação da taxonomia, estimativas de distâncias genéticas, discriminação de subpopulações, identificação de linhagens maternas e paternas, assim como para investigar a história biogeográfica de determinado táxon ou população. Por outro lado, marcadores nucleares microssatélites, em razão da alta frequência, distribuição e polimorfismo, são muito eficientes na estimação de distâncias genéticas, discriminação de subpopulações, mas, sobretudo, em estudos que envolvem segregação de alelos, como teste de paternidade e identificação individual (ERIKSSON et al., 2006; GARRIGAN; HAMMER, 2006).

O uso combinado das diversas categorias de marcadores e sofisticadas metodologias estatísticas tem se mostrado bastante eficientes na identificação de espécies, discriminação de subespécies, subpopulações ou raças, estimação de distância genética entre populações, estimação de relações parentesco entre indivíduos mantidos em cativeiro ou em vida livre, estudos evolucionários de biogeografia e padrões de migração (LOFTUS et al., 1994; ZHIVOTOVSKY; GOODMAN, 1998; JOHNS; AVISE, 1998; ARBOGAST, 1999; SEIESTAD et al., 1999; HAMMER et al., 2001; SPRINGER et al., 2001; TOZAKI et al., 2001; ICHIKAWA et al., 2001; LANDRY et al., 2002, YU; PENG, 2002; CAVALI-SFORZA; FELDMAN, 2003; DENISE et al., 2003; FOKIDIS et al., 2003; WILDER et al., 2004a; WILDER et al., 2004b; GARRIGAN; HAMMER, 2006; TORO et al., 2009).

Marcadores mitocondriais

Mitocôndrias são organelas citoplasmáticas encontradas na grande maioria dos organismos eucariotos. Elas são usualmente descritas como "casa de força" celular, visto que são responsáveis pela produção de ATP via fosforilação oxidativa. Os eucariotos surgiram da inte-

ração de comunidades de células, de maneira que essa organela pode ter surgido a partir da captura e incorporação de uma protobactéria endossimbionte por um hospedeiro eucariótico com núcleo, com semelhança a um protista (LANG et al., 1997; GRAY et al., 1999).

O DNA mitocondrial (mtDNA) de mamíferos é um genoma citoplasmático (extra nuclear), que contém, basicamente, alguns dos genes essenciais ao processo celular de fosforilação oxidativa. Os genes mitocondriais apresentam uma taxa de fixação de mutações (modificações) quatro vezes superior, quando comparados aos nucleares, além de estarem presente em quase todos os eucariotos e possuírem herança exclusivamente materna, e, por essas razões, tornaram-se comuns em estudos filogenéticos e evolucionários (MARGULIS, 1996; AVISE, 2000; GRAY et al., 2004; BULLERWELL; GRAY, 2004).

A região controle, que inclui D-loop e a sequência hipervariável (HVS), e os genes citocromo B (CytB) e citocromo C oxidase I (COI) têm sido os mais empregados na identificação de espécies, discriminação de subespécies, estudos de evolução e domesticação, caracterização de raças e alterações demográficas recentes em bovinos, suínos, aves e ovinos, entre outras espécies animais (LOFTUS et al., 1994; GIUFFRA et al., 2000; HIENDLEDER et al., 2002; LEONARD et al., 2002; BRUFORD et al., 2003; WU et al., 2003; JOSHI et al., 2004; MEADOWS et al., 2005).

Um projeto internacional conhecido "DNA Barcoding of Live" (http://www.barcoding.si.edu/DNABarCoding.htm) foi implantado recentemente com o objetivo de sequenciar 648 pb do gene citocromo C oxidase, subunidade 1 (COI) como ferramenta de auxílio na catalogação da biodiversidade e em taxonomia. Os "códigos de barra" baseados em sequências COI são eficientes na identificação de espécies, uma vez que esse gene está presente em praticamente todos os organismos eucariotos, é bastante conservado entre organismos dos mais diversos táxons, e suficientemente diferenciado entre espécies para apresentam padrão de sequência "barcode" espécie-específicos (TAUTZ et al., 2003; WILSON, 2003; BLAXTER et al., 2005; SCHINDEL et al., 2005; RUBINOFF et al., 2006).

Por esses motivos, além de ferramenta para a catalogação de espécies, os códigos de barra de DNA podem ser úteis na identificação de

espécies em qualquer estágio de desenvolvimento e na separação de espécies "crípticas" ou com taxonomias complexas ou pouco estudadas (HEBERT et al., 2003b; MONAGHAN et al., 2005; SAVOLAINEN et al., 2005; WITT et al., 2006, FOUQUET et al., 2007; TAVARES; BAKER, 2008), como possivelmente é o caso do veado mateiro (*Mazama americana*) e do caititu (*Pecari tajacu*) (GROVES; GRUBB, 1993; GONGORA et al., 2006; DUARTE et al., 2008).

O desenvolvimento tecnológico, por outro lado, possibilitou também um incremento significativo na escala de geração de dados, com a avaliação de um número maior de amostras com redução de custos e tempo, possibilitando avanço importante em estudos de dinâmica populacional em resposta a diversos estímulos ambientais. Os códigos de barras vêm sendo utilizados inclusive para avaliar a dinâmica populacional de peixes, insetos bentônicos, minhocas e crustáceos, entre outros, em resposta à contaminação do solo e água por resíduos de herbicidas, fungicidas e mineração, com o objetivo de identificação de bioindicadores para monitoramento ambiental, por exemplo (GASTON; O'NEIL, 2004; MARKMANN; TAUTZ, 2005; MONAGHAN et al., 2005; HERRERA et al., 2007; FICETOLA et al., 2008; BERKOV, 2009; OTOMO et al., 2009; VALENTINI et al., 2009).

A análise da sequência completa dos genomas mitocondriais de bovinos taurinos e zebuínos permitiu a identificação de 237 polimorfismos e estimação de um tempo de divergência de aproximadamente 1,7–2,0 milhões de anos entre essas espécies (HIENDLEDER et al., 2008).

Quatro linhagens maternas de bovinos foram identificadas a partir da análise combinada de 248 sequências "D-loop" de diversas raças, além de 32 exemplares arqueológicos do bovino primitivo auroque (*Bos primigenius*). Diversos eventos de domesticação e um status de subespécie para as raças taurinas (*Bos primigenius taurus*) e raças indianas (*Bos primigenius indicus*) foram inferidas a partir das distâncias genéticas estimadas.

Marcadores de mtDNA foram utilizados por Meireles et al. (1999) para analisar a contribuição de gado taurino na formação das raças zebuínas Gir, Nelore e Brahman. Participação majoritária de matriarcas de origem taurina na formação do Zebu PO americano foi demonstrada pelos autores, uma vez que 79% dos animais Nelore,

73% Gir e 100% Brahman analisados apresentaram mtDNA de origem taurina. Os resultados são condizentes com a raça ter sido formada por cruzamentos absorventes mediados por machos zebuínos acasalados com fêmeas de origem Ibérica. O mesmo não se pode dizer dos resultados de 26% e 25% de mtDNA taurino obtidos para animais Nelore e Gir POI, respectivamente, raças supostamente de origem exclusivamente zebuína.

Comparação de sequências de mtDNA foi aplicada a praticamente todas as principais espécies domésticas de produção (ex.: FERNÁNDEZ et al., 2006; LARSON et al., 2007; MEADOW et al., 2007; KANGINAKUDRU et al., 2008; NADERI et al., 2008). Foram identificados cinco agrupamentos de haplótipos maternos (A, B, C, D e E) em ovinos. Haplótipos A foram identificados, sobretudo, em raças asiáticas, haplótipos B predominantemente em europeias e os haplogrupos restantes em menor frequência no continente asiático (HIENDLEDER et al., 2002; WU et al., 2003; GUO et al., 2005; MEADOWS et al., 2005; PEDROSA et al., 2005 e MEADOWS et al., 2007), apesar de que alto nível de migração ser observado entre as raças de diversas regiões (MEADOWS et al., 2005).

Três linhagens principais de ovinos (A, B e C), já descritas anteriormente, foram identificadas pela Análise do mtDNA, D-loop e HVS, de 48 raças, e, além dessas, foi identificada uma quarta linhagem "D" (TAPIO et al., 2006). Paiva et al. (2005) observaram a presença das quatro linhagens maternas principais no Cáucaso, três (A, B e C) na Ásia central, duas (A e B) na Europa ocidental. Os autores puderam concluir que a linhagem "A" foi a primeira a ser domesticada no oriente médio, migrando posteriormente para todas as outras regiões. A expansão do haplótipo "B" envolveu populações da Europa ocidental aproximadamente 3.000 anos após domesticação de "A". A distribuição de "A" indica que o Oriente Médio foi a origem de domesticação dos ovinos. Haplótipos "B" podem ser observados em ovinos selvagens europeus "mouflon", sugerindo domesticação independente ou sua introgressão em populações domésticas. Os haplogrupos "C" e "D", provavelmente, foram introduzidos posteriormente, mas uma amostragem maior é necessária para se inferir a origem geográfica.

Cromossomo Y

Os cromossomos sexuais dos mamíferos são bastante divergentes e heteromórficos. O cromossomo X é mais longo e denso em genes em comparação com o cromossomo Y, que é curto e degenerado. A teoria atualmente mais aceita é que o Y descende de um protocromossomo Y, homólogo ao X. A falta de recombinação entre estes é considerada o fator determinante da perda de genes pelo cromossomo Y (degeneração) (GVOZDEV et al., 2005; ELLIS; AFFARA, 2006; GRAVES, 2006).

O cromossomo Y é consideravelmente menor do que os outros cromossomos (60Kb) e contém 178 genes em humanos (SKALETSKY et al., 2003), sendo 45 destes codificadores de proteínas, em que a maioria controla funções macho-específicas como espermatogênese, e vários pseudogenes (LAHN; PAGE, 1997). Ele possui sequência de DNA altamente repetitiva, múltiplas cópias do mesmo gene arranjados em sequência (*in tandem*) e regiões palindrômicas (TOURE et al., 2005; BACHTROG, 2006; GRAVES, 2006). Segmentos sequenciados em diversos mamíferos apresentaram baixo nível de diversidade nucleotídica (HELLBORG; ELLEGREN, 2004; MEADOWS et al., 2004; MEADOWS et al., 2006).

A identificação de linhagens paternas, estudos de dinâmica populacional e biogeografia são facilitados, entre outros fatores, pela avaliação do estado haploide dos alelos e na ausência de recombinação X-Y. Marcadores Y-específcos se mostraram eficiente em estudos globais de expansão e dispersão de populações humanas (DENG et al., 2004). Análise de mtDNA e cromossomo Y foi utilizada por Eriksson et al. (2006) para avaliar a magnitude da dispersão efetiva de machos e fêmeas e investigar a história demográfica de bonobos. Foi observada uma diferenciação maior do cromossomo Y em relação ao mtDNA, o que é esperado para espécies em que a dispersão é mediada principalmente por fêmeas.

A investigação de linhagens paternas é também importante em espécies domésticas, uma vez que a taxa reprodutiva é muito mais elevada em machos, e já revelou aspectos fascinantes relacionados à domesticação dos animais. Sondas Y-específico desenvolvidas por Bradley et al. (1994) permitiram a discriminação entre raças bovinas zebuínas e taurinas. Microssatélites localizados no cromossomo Y que

apresentam alelos específicos para zebu, e consequentemente apropriados para estudos evolutivos em gado e espécies relacionadas foram desenvolvidos por Edwards et al. (2000). A utilização desses marcadores evidenciou padrões de introgressão mediadas por machos em populações de gado da África (MACHUGH et al., 1997; HANOTTE et al., 2000; FREEMAN et al., 2004). Mannen et al. (2004) também observaram padrão similar de introgressão mediada por machos na formação de várias raças Japonesas, Coreanas e da Mongólia.

Marcadores microssatélites

Microssatélites, também conhecidos por "STRs- short tandem repeats" ou "VNTRs- variable number of tandem repeats", são regiões do genoma extremamente repetitivas e polimórficas (MIESFELD et al., 1981; HAMADA et al., 1982; JEFFREYS et al., 1985a; JEFFREYS et al., 1985b; GEORGES et al., 1988). Microssatélites autossômicos, por causa de sua heterozigosidade, dispersão no genoma e facilidade de genotipagem por PCR, foram muito empregados em estudos que envolvem a análise da transmissão de alelos de marcadores ou haplótipos. Mapas genéticos contendo milhares de marcadores já estão disponíveis para diversas espécies, incluindo ovinos (VAIMAN et al., 1996; MADDOX et al., 2001; BERALDI et al., 2006), bovinos (BISHOP et al., 1994; BARENDSE et al., 1997; KAPPES et al., 1997) e suínos (ARCHIBALD et al., 1995; ROHRER et al., 1996; GUO et al., 2009).

Esses marcadores moleculares continuam sendo extensivamente utilizados em estudos de diversidade genética, na identificação/ rastreabilidade, testes de paternidade, assim como no mapeamento de caracteres quantitativos de importância econômica (ARRANZ et al., 1998; DIEZ-TASCON et al., 2000; ARRANZ et al., 2001; COLTMAN et al., 2001; MCRAE et al., 2002; DENISE et al., 2003; ALVAREZ et al., 2004; BARRILET et al., 2005; TAPIO et al., 2005; ALVAREZ et al., 2006; UZUN et al., 2006).

O polimorfismo de 14 marcadores microssatélites foi avaliado, em 238 animais, para inferir as relações históricas e as contribuições existentes entre seis raças de ovinos do norte da Espanha (ALVAREZ et al., 2004). Os autores observaram uma população bastante estruturada em razão da origem ancestral distinta e da pequena taxa de migração recente. As raças Black-faced, Latxa e Churra, independentemente da

similaridade fenotípica, apresentaram perfis genéticos característicos, indicando origem ancestral independente. As raças Blonde-faced Latxa, Rubia Del Molar e Xalda, provavelmente mais relacionadas, apresentaram coeficientes admixture negativos, indicando origem comum e divergência recente.

Microssatélites foram utilizados por Tapio et al. (2005) para avaliar a contribuição de populações nativas para a diversidade genética, diversidade de alelos e distância genética entre raças de ovinos do norte da Europa, assim como o efeito da endogamia na contribuição de cada raça para a variabilidade genética total. Os resultados indicaram uma população fundadora fragmentada em populações isoladas e um tamanho efetivo populacional (Ne) decrescente ao logo do tempo especialmente para as raças Grey Finnish Landrace e Ruhnu. Os autores sugeriram que porção considerável das raças com contribuição para diversidade genética acima da média são raças locais e periféricas com tamanho máximo de 1.000 ovelhas. Esse resultado indica que a conservação dessas raças seria a maneira mais eficiente de se manter a diversidade genética total.

As relações genéticas entre cinco raças de ovinos da Turquia foram avaliadas por Uzun et al. (2006) a partir do polimorfismo observado em 225 animais. Os autores observaram alta variabilidade inter e intrarracial com separação evidente das raças "fat tail" Tuj, Morkaraman (Red Karaman) e Akkaraman (White Karaman) em relação às outras raças estudadas. Outra interessante inferência foi proporcionada pela análise conjunta do mtDNA obtida de outros experimentos e microssatélites. As raças Morkaraman e Akkaraman apresentaram haplótipos de mtDNA distintos, mas perfil de microssatélites muito similares. A raça Akkaraman, nativa da Turquia, apresentou predominância do haplótipo "C", enquanto, na Morkaraman, prevaleceu o haplótipo mtDNA "A" (haplótipo asiático). Esses resultados indicam uma população fundadora distinta (origem materna), e cruzamentos posteriores mediados por machos. As raças Tuj e Hemsin, por outro lado, diferiram com relação às frequências dos microssatélites, mas apresentaram haplótipos de mtDNA semelhantes. A origem materna deve ser similar, o que está de acordo com a localização geográfica, mas a raça Tuj deve ter recebido considerável introgressão de outras raças "fat tail", além de raças caucasianas, por cruzamentos mediados por

machos. Os autores concluem que os microssatélites e mtDNA fornecem informações complementares e, quando utilizados em combinação, podem ajudar na correta avaliação da origem e relações genéticas entre as raças modernas de ovinos.

Mariante et al. (2009) avaliaram diversas raças brasileiras de espécies domésticas de produção e pode observar uma alta variabilidade genética das raças naturalizadas em relação às raças comerciais/especializadas, além de endogamia superior para as espécies suínas e equinas, quando comparadas as demais (Tabela 5).

Tabela 5. Diversidade Genética observada em cinco estudos com raças naturalizadas e comerciais brasileiras a partir de marcadores microssatélites.

Espécie	N	Nº raças (raças naturalizadas)	Nº Locos	He	AM	FIS	Amova (%)
Bubalinos	382	05	14	0.686	10.07	0.224	11.91*
Bovinos	915	10 (8)	22	0.816	13.18	0.086	11.87
Eqüinos	328	07 (05)	11	0.875	14.36	0.204	12.37*
Ovinos	383	10 (05)	19	0.775	10.84	0.015	11.76*
Suínos	182	05 (03)	24	0.702	10.00	0.114	15.73*

* p<0.001.

N= número indivíduos; He= heterozigosidade esperada; AM= número médio de alelos; FIS= coeficiente de endogamia intrapopulacional; Amova (%)= Análise variância molecular, porcentagem de variação entre as raças analisadas em cada espécie.

Fonte: Adaptado de Mariante et al. (2009).

SNPs

Variações pontuais na cadeia de nucleotídeo (SNPs) são polimorfismos considerados muito promissores para estudos evolucionários, ecológicos ou de conservação, uma vez que informação sobre a sequência genômica se torne disponível para um número maior de espécies (SEDDON et al., 2005; MARRIS et al., 2009).

Por serem marcadores geralmente bi-alélicos, SNPs são menos polimórficos do que microssatélites, entretanto SNPs são extremamente freqüentes e, consequentemente, existe um aumento substancial no número de *loci* disponíveis para as diversas espécies (BRUMFIELD et al., 2003). Além disto, a dinâmica mutacional mais simples dos SNPs gera uma taxa menor de homoplasia, e, por outro lado, podem ser geno-

tipados a baixo custo e em larga escala (SYVÄNEN, 2001; VIGNAL et al., 2002; BRUMFIELD et al., 2003; CHEN; SULLIVAN, 2003; SCHLÖTTERER, 2004).

O estudo de SNPs em populações de organismos não modelo, como animais silvestres, é relativamente recente e pouco frequente (MORIN et al., 2004). Apesar de alguns estudos terem avaliado o potencial teórico de SNPs na inferência da história biogeográfica e relações entre indivíduos (KUHNER et al., 2000; GLAUBITZ et al., 2003), a aplicação dos SNPs em estudos ecológicos ou de conservação está limitado a poucos exemplos com poucos *loci* marcadores (BENSCH et al., 2002; BELFIORE et al., 2003). Entretanto, o recente desenvolvimento de programas de sequenciamento genético que utilizam equipamentos de segunda geração vem aumentando significativamente a velocidade de sequenciamento de genomas a um custo significativamente mais baixo, o que pode levar a superação desse gargalo.

Os resultados apresentados na literatura evidenciam que marcadores moleculares diversos (microssatélites, SNPs, mtDNA e Y-específico) geram dados distintos e complementares que podem ser utilizados para inferir diferentes aspectos da evolução e funcionamento dos genomas. Esses podem ser utilizados para inferir a origem, identificar espécies, diferenciar subespécies ou raças, identificar linhagens paternas e maternas, além de permitir inferir variabilidade genética entre e intrapopulacional de animais domésticos adaptados e também em vida livre.

Conservação e manejo de recursos genéticos

A conservação de raças ou espécies ameaçadas é dependente primordialmente da obtenção de taxa reprodutiva adequada, e pode ser maximizada pelo correto acasalamento entre indivíduos, dentro de subespécie ou raça, objetivando maximizar a diversidade total da espécie, e, ao mesmo tempo, minimizar o parentesco entre os mesmos e consequentemente, a endogamia nos descendentes (FAO, 1998a; RICHARDSON et al., 2004; RUSSELLO; AMATO, 2004; CSILLERY et al., 2006; PEMBERTON, 2008; TORO et al., 2009). Diversas biotecnologias reprodutivas foram desenvolvidas e aperfeiçoadas em humanos e animais domésticos, e vêm sendo aplicadas ao melhoramento

genético e conservação de recursos genéticos. Exemplos incluem inseminação artificial, fertilização in vitro, transferência de embriões, monitoramento hormonal não invasivo, clonagem, formação de bancos de germoplasma, entre outras (FAO, 1998b; POPE, 2000; PUKAZHENTHI; WILDT, 2004 e PUKAZHENTHI et al., 2006).

Não obstante a tecnologia reprodutiva adotada, o correto manejo reprodutivo visando ao controle da endogamia é crucial na manutenção da diversidade genética e conservação do germoplasma no longo prazo. Este deve, necessariamente, considerar a estrutura característica de cada raça ou população e sua diversidade genética (TORO; CABALLERO, 2005; FERNANDEZ et al., 2008; TORO et al., 2009).

Os recentes avanços da genética molecular geraram ferramentas para estudos populacionais e avaliação da variabilidade genética inter e intrapopulacional. Métodos moleculares utilizados para análise de variação genética são mais eficientes na discriminação de subdivisões populacionais intraespecíficos, do que a biometria morfológica tradicional. Genes mitocondriais e Y-específico, que possuem herança exclusivamente materna e paterna respectivamente (são transmitidos somente por fêmeas ou machos), além de padrão de herança não Mendeliana (não sofrer eventos de recombinação), podem servir como marcadores genéticos, fornecendo informação necessária para discriminação de subpopulações, estimação de distâncias genéticas, assim como identificação de linhagens maternas e paternas. Por outro lado, marcadores microssatélites, em razão da alta frequência, distribuição no genoma e polimorfismo, são muito interessantes para estimação de distâncias genéticas, discriminação de subpopulações, mas, sobretudo, em estudos que envolvem segregação de alelos, identificação individual e teste de paternidade (ERIKSSON et al., 2006; GARRIGAN; HAMMER, 2006).

O uso combinado desses marcadores associado às sofisticadas metodologias estatísticas tem se mostrado bastante eficiente para estimar variabilidade genética, discriminar subpopulações, inferir distância genética entre populações, inferir parentesco (corrigir ou reconstruir pedigree) entre indivíduos mantidos em cativeiro ou em vida livre, estudos de biogeografia e padrões de migração (LOFTUS et al., 1994; ZHIVOTOVSKY; GOODMAN, 1998; JOHNS; AVISE,

1998; ARBOGAST, 1999; SEIESLTAD et al., 1999; HAMMER et al., 2001; SPRINGER et al., 2001; TOZAKI et al., 2001; ICHIKAWA et al., 2001; LANDRY et al. 2002; YU; PENG, 2002; CAVALI-SFORZA; FELDMAN, 2003; DENISE et al., 2003; FOKIDIS et al., 2003; WILDER et al., 2004a; WILDER et al., 2004b; GARRIGAN; HAMMER, 2006; TORO et al., 2009).

Teste de paternidade

O parentesco inequívoco entre os indivíduos de uma população é pré-condição para um programa de melhoramento genético eficiente (VAN VLECK, 1970; GELDERMANN et al., 1986; GLOWATSKI-MULLIS et al., 1995). A estimação dos parâmetros genéticos populacionais e a predição do valor genético dos indivíduos são dependentes de genealogia indubitável (RON et al., 1995), uma vez que dados de desempenho de animais aparentados são utilizados para solucionar um modelo misto gerando valores genéticos com propriedades (Best Linear Unbiased Prediction – Blup), além dos efeitos prejudiciais no controle da endogamia.

Testes de paternidade em gado bovino, usando grupos sanguíneos e proteínas do leite, evidenciaram uma alta frequência de paternidade incorreta em países como Israel (5%), Alemanha (4% a 23%), Dinamarca (8% a 30%), Holanda (8%) e Irlanda (20%), justificando a sua utilização em programas de melhoramento genético (GELDERMANN et al., 1986; BEECHINOR; KELLY, 1987; RON et al., 1995).

Erros de identificação geram estimativas tendenciosas de parâmetros genéticos populacionais (VAN VLECK, 1970). Por outro lado, Geldermann et al. (1986) estimaram uma perda de 8,7% a 16,9% no ganho genético anual em bovinos de leite com 15% de erro de identificação. Ron et al. (1995) sugerem que um aumento de aproximadamente 5% no ganho genético anual poderia ser obtido ao realizar teste de paternidade na progênie dos 50 touros testados anualmente em Israel.

As relações de parentesco podem ser examinadas utilizando diversas categorias de marcadores genéticos. Se o genótipo de um provável touro for incompatível com o genótipo da progênie, este é excluído de paternidade, ou seja, a progênie deve apresentar um dos alelos

paternais. Por outro lado, se os genótipos forem compatíveis existem duas possibilidades: (1) o touro é o genitor biológico; (2) o touro possui genótipo compatível por acaso. A probabilidade de se encontrar um genótipo incompatível é denominada probabilidade de exclusão (PE). Em outras palavras, a PE é a probabilidade de um touro selecionado aleatoriamente ser excluído de paternidade de uma progênie também escolhida ao acaso (DODDS et al., 1996). A Probabilidade de Exclusão utilizando marcadores codominantes autossômicos foi primeiramente calculada por Jamielson (1965) e posteriormente por diversos autores (CHAKRABORTY et al., 1974; CRAWFORD et al., 1993; JAMIELSON, 1994).

Diversos marcadores moleculares vêm sendo aplicados com o intuito de se inferir probabilidade de paternidade, cada um com suas vantagens e desvantagens. Os RFLPs fornecem baixo conteúdo de polimorfismo informativo e baixa heterozigose (LITT; LUTY, 1989). Impressões Digitais do DNA "DNA fingerprinting" geradas pelo uso de sondas minissatélites multilocais são geralmente bastante informativas, sendo, entretanto, de difícil interpretação por apresentarem dominância e, além disso, alguns casos apresentam bandas de diferentes *loci* com peso molecular semelhante e consequentemente comigração (JEFFREYS et al., 1991; PENA; CHAKRABORTY, 1994).

O parentesco avaliado pela utilização de microssatélites *locus* específico suplanta muitas das dificuldades inerentes a outros tipos de marcadores. Esses marcadores geralmente apresentam uma heterozigose superior à fornecida por RFLPs, sendo de interpretação mais simples do que os padrões de bandas geradas impressões digitais de DNA por minissatélites multilocais (JAMIELSON, 1994; USHA et al., 1995). As vantagens associadas aos microssatélites são codominância, alto polimorfismo, boa distribuição, além de facilidade de serem genotipados por PCR, o que facilita a padronização de protocolos entre os diversos laboratórios (GLOWATZKI- MULLIS et al., 1995).

A abordagem *locus* específico com microssatélites vem sendo empregada na maior parte dos laboratórios que realizam teste de paternidade em humanos nos EUA (PENA; CHAKRABORTY, 1994). Microssatélites são utilizados para esse fim em animais domésticos como bovinos (GLOWATZKI-MULLIS et al., 1995; USHA et al., 1995;

VANKAN et al., 1994), suínos (HOHENHÖRST et al., 1994), caninos (DOSTÁL; STRATIL, 1994), caprinos (AMIGUES et al., 1994) e ovinos (ROSA et al., 2011).

Paternidade, empregando marcadores moleculares, pode ser avaliada a partir do índice de paternidade (PI), que é calculado pelo método de inferência estatística da razão de verossimilhança entre as hipóteses: (1) Ho: O candidato é o pai verdadeiro e (2) H1: o pai verdadeiro é um macho não relacionado da mesma população, considerando a herança dos alelos marcadores, descrito em humanos por Pena e Chakraborty (1994). O PI pode ser calculado para indivíduos com genótipo materno conhecido (BRENNER, 1997), e também para indivíduos com genótipo materno desconhecido (BRENNER, 1993; MARSHALL et al., 1998; KALINOWSKI et al., 2007).

Perspectivas

Diversas abordagens genômicas, que incluem Genômica Estrutural (sequenciamento genômico e mapas de SNPs), Funcional (Transcriptômica, Proteômica, Glicômica e Metabolômica e outras "Ômicas") e Comparativa (Comparação de Sequência de DNA, RNA, Proteína, Metabólitos, etc.), devem ser utilizadas, de forma sistemática e integradas, para se elucidar os mecanismos genéticos controlando a expressão de características de importância econômica, uma vez que podem ser reguladas em qualquer dos níveis de um sistema biológico (Figura 19). Esse conhecimento servirá de base ou contribuirá para o desenvolvimento de diversas áreas de pesquisa, das quais se destacam: Estudos de Fertilidade/Reprodução, Nutrição/Alimentação, Comportamento/Manejo e Adaptação/Rusticidade de animais domésticos e silvestres, caracterização da biodiversidade e diversidade genética, assim como em estudos de Taxonomia, Evolução, Desenvolvimento, Simbiose e Ecologia.

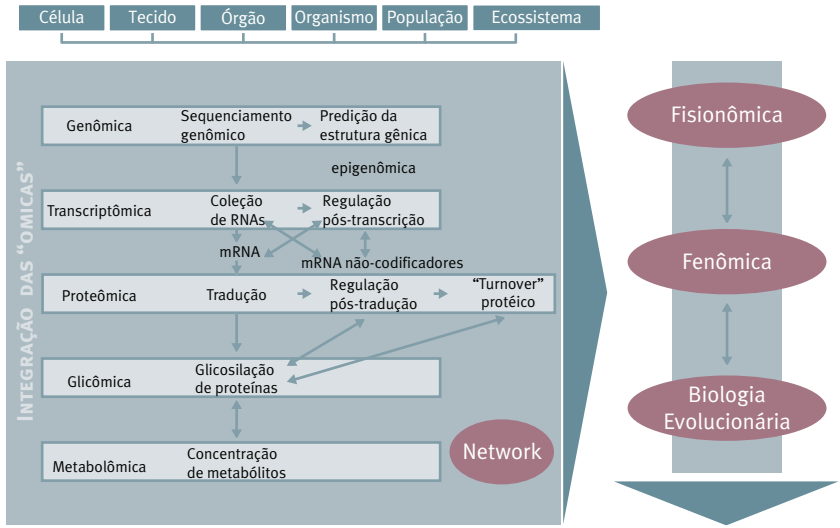


Figura 19. Abordagens genômicas (sistemáticas e integradas) para melhorar o conhecimento da base genética dos fenótipos, nos diversos níveis de um sistema biológico.

Fonte: Adaptado de Hu et al., 2009.

Estudos avançados em Genômica Comparativa, Metagenômica e Biologia de Sistemas poderão auxiliar, por exemplo, no melhor entendimento da evolução do sistema digestivo de artiodátilos, seu desenvolvimento embrionário e funcionamento, assim como das complexas interações entre a microbiota do sistema digestivo e hospedeiro; e evolução da glândula mamária em mamíferos, desenvolvimento embrionário, fisiologia da lactação e resistência a doenças como mastite. O genoma bovino serve, portanto, como modelo animal para o entendimento da evolução de mamíferos assim como fornece subsídios para o aumento da produtividade de leite e carne (WOMACK, 2006; ADELSON, 2008; ELSIK et al., 2009; TELLAM et al., 2009).

As investigações científicas devem ser integradas e sistemáticas para se acessar, refinar e estender o conhecimento dos mecanismos moleculares, controlando a formação, desenvolvimento e funcionamento do organismo como um todo, integrado a um sistema produtivo ou ecossistema no caso de organismos silvestres. A visão integrada/holística da Biologia de Sistemas auxiliará no aprofundamento

do entendimento de características complexas como desenvolvimento ponderal, qualidade de carcaça, produção de leite, reprodução e resistência a doenças.

Essas tecnologias genômicas empregadas como ferramentas suplementares no melhoramento abriram grandes oportunidades para se aumentar significativamente o ganho genético pelo aumento da acurácia e, além disso, permitem um melhor controle sobre os níveis de endogamia e consequentemente mantém o potencial de ganho genético assim como a capacidade de adaptação. Por outro lado, informação genômica pode ser empregada para predizer o fenótipo que um determinado genótipo produzirá com implicações em práticas de manejo que visem desenvolver ou aumentar a eficiência produtiva e sustentabilidade dos sistemas produtivos existentes (Figura 20).

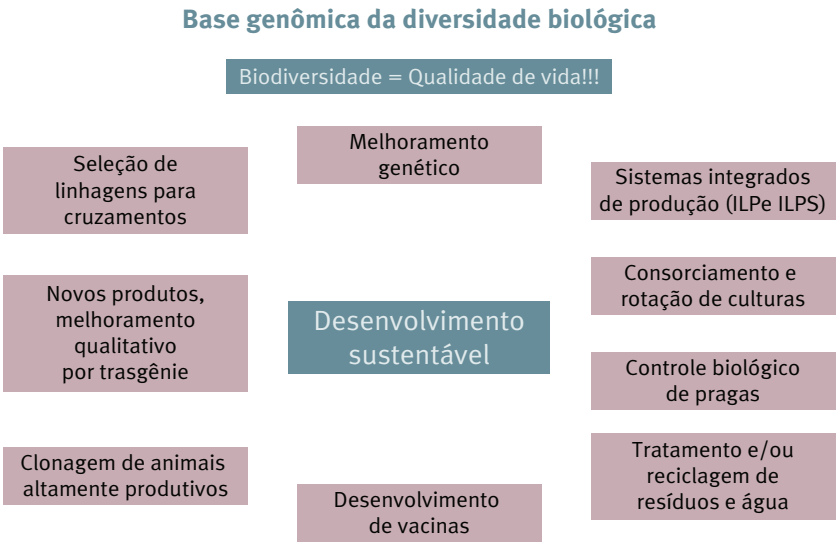


Figura 20. Biotecnologia e desenvolvimento sustentável.

Como resultados dos esforços internacionais, genes ou marcadores em associação com efeito em características importantes vêm sendo identificados e utilizados em programas de melhoramento que empregam MAS para genes como MC4R, DGAT, CAST. Mais recentemente, os progressos obtidos a partir do sequenciamento do genoma bovino, análise de associação "Genome Wide" e seleção genômica em bovinos

de leite fazem jus às enormes esperanças depositadas na Genômica e apontam perspectivas associadas a outras biotecnologias extremamente promissoras não somente no Melhoramento Genético, mas também em Biotecnologias da Reprodução (Figura 21), em alimentação com a Nutrigenômica e no manejo profilático e sanitário com a Farmacogenômica (Figura 22).

Aplicações associadas à outras biotecnologias

- FIV-TE (maturação de oócitos, cultivo e congelamento de embriões, etc) e clonagem.
- Seleção e multiplicação de indivíduos jovens (tourinhos, novilhas pré-púberes ou ainda mais jovem – velogenetics e WhizzoGenetics!!!!).
- Cruzamentos (otimização de herança não aditiva, seleção de linhagens para cruzamentos).

Figura 21. Biotecnologias da reprodução e MAS.

Genômica animal aplicada á produção animal

- MAS – Seleção auxiliada por marcadores.
- Nutrigenômica (efeito dos alimentos sobre o genoma).
- Farmacogenômica (produção de vacinas para carrapato, desenvolvimento defarmacêuticos não antibióticos e outros).
- Pré e probióticos, microorganismos metanogênicos e outros.
- Promotores decrescimento (hormônios, b-agonistas e outros).
- Identificação de patógenos (antibiograma molecular);
- Fertilidade/reprodução (foliculogênese, oogênese: taxa de ovulação, sincronização, FIV, clonagem e outros).
- Identificação individual/rastreabilidade.
- Transgênicos (biofábricas - imunoglobulinas e outros).

Figura 22. Genômica animal aplicada à produção animal.

Referências

ABASHT, B.; DEKKERS, J. C.; LAMONT, S. J. Review of quantitative trait loci **identified in the** chicken. **Poultry Science**, v. 85, p. 2079–2096, 2006.

ADELSON, D. L. Insights and applications from sequencing the bovine genome. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 54–60, 2008.

ALVAREZ, I.; ROYO, L. J.; FERNANDEZ, I.; GUTIERREZ, J. P.; GOMEZ, E.; GOYACHE, F. Genetic relationships and admixture among sheep breeds from Northern Spain assessed using microsatellites. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 8, p. 2246-52, 2004.

ALVAREZ, L.; GUTIERREZ-GIL, B.; SAN PRIMITIVO, F.; DE LA FUENTE, L. F.; ARRANZ, J. J. Influence of prion protein genotypes on milk production traits in Spanish Churra sheep. **Journal Dairy Science**, v. 89, n. 5, p. 1784-91, 2006.

AMIGUES, Y.; BRATHWAITE.; LEPIN, L.; et al. Use of microsatellites as an alternative to blood typing in goat parentage control. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR ANIMAL GENETICS, 24., 1994. **Proceedings...** v. 25, n. 2, p. 27.

ANDERSSON, L. Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, p. 130–138, 2001. doi:10.1038/35052563

ANDERSSON, L. The role of MHC polymorphism in disease/parasite resistance. Proccedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 21, p. 177-182, 1994.

ARBOGAST, B. S. Mitochondrial DNA phylogeography of the new word flying squirrel (Glaucomys): Implications for pleistocene biogeography. **Journal of Mammalogy**, v. 80, n. 1, p. 142-156, 1999.

ARCHIBALD, A. L.; HALEY, C. S.; BROWN, J. F. et al. The PiGMaP consortium linkage map of the pig (Sus scrofa). **Mammalian Genome**, v. 6, p. 157–75, 1995.

ARNEHEIN, N.; LI, H.; CUI, X. Genetic mapping by single sperm typing. Proceedings of the 24th Conference of the International Society for Animal Genetics, v. 25, n. 2, p. 105-124, 1994.

ARRANZ, J. J.; BAYON, Y.; SAN PRIMITIVO, F. Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellites. **Genetics Selection Evolution**, v. 33, n. 5, p. 529-42, 2001.

ARRANZ, J. J.; BAYON, Y.; SAN PRIMITIVO, F. Genetic relationships among Spanish sheep using microsatellites. **Animal Genetics**, v. 29, n. 6, p. 435-40, 1998.

AVISE, J. C. **Phylogeography:** the History and Formation of Species. Cambridge: Harvard, 2000. 447 p.

BACHTROG, D. A dynamic view of sex chromosome evolution. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 16, p. 578–585, 2006.

BARENDSE, W.; ARMITAGE, S. M.; KOSSAREK, L. M.; SHALOM, A.; KIRKPATRICK, B. W.; RYAN, A. M.; CLAYTON, D.; LI, L.; NEIBERGS, H. L.; ZHANG, N.; GROSSE, W. M.; WEISS, J.; CREIGHTON, P.; MCCARTHY, F.; RON, M.; TEALE, A. J.; FRIES, R.; MCGRAW, R. A.; MOORE, S. S.; GEORGES, M.; SOLLER, M.; WOMACK, J. E.; HETZEL, D. J. S. A genetic linkage map of the bovine genome. **Nature Genetics**, v. 6, p. 227- 235, 1994.

BARENDSE, W.; VAIMAN, D.; KEMP, S. J. A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. **Mammalian Genome**, v. 8, n. 1, p. 21-28, 1997.

BARRILET, F.; ARRANZ, J. J.; CARTA, A. Mapping quantitative trait *loci* for milk production and genetic polymorphisms of milk proteins in dairy sheep. **Genetics Selection Evolution**, v. 37, p. S109–S123 S109, 2005. Supplement 1.

BECKMAN, J. S.; SOLLER, M. Toward a unified approach to genetic mapping of eukarotes based on sequence tagged microsatellites sites. **Biotechnology**, v. 8, p. 930- 932, 1990.

BEECHINOR, J. G.; KELLY, E. P. Errors of identification amongst cattle presented of some bulls used in the artificial insemination service in Ireland. **Irish Veterinary Journal**, v. 41, p. 348, 1987.

BEEVER, J. E.; GEORGE, P. D.; FERNANDO, R. L.; Stormont, C. J.; Lewin, H. A. Associations between genetic markers and growth and carcass traits in a paternal half-sig family of Angus cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 337-344, 1990.

BELFIORE, N. M.; HOFFMAN, F. G.; BAKER, R. J.; DEWOODY, J. A. The use of nuclear and mitochondrial single nucleotide polymorphisms to identify cryptic species. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 2011–2017, 2003.

BENSCH, S.; ÅKESSON, S.; IRWIN, D. E. The use of AFLP to find an informative SNP: genetic differences across a migratory divide in willow warblers. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 2359–2366, 2002.

BERALDI, D.; MCRAE, A. F.; GRATTEN, J.; SLATE, J.; VISSCHER, P. M.; PEMBERTON, J. M. Development of a linkage map and mapping of phenotypic polymorphisms in a free-living population of Soay sheep (Ovis aries). **Genetics**, v. 173, n. 3, p. 1521-37, 2006.

BERKOV, A. The impact of redefined species limits in Palame (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae: Acanthocinini) on assessments of host, seasonal, and stratum specificity. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 76, n. 2, p. 195-209, 2009.

BERRYERE, T. G.; MUGGLI-COCKETT, N.; ROBBINS, J. W.; SCHMUTZ, S. Molecular studies of DRB relative to Staphylococcus aureus mastitis. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5., 1994, Ontario. **Proccedings...** Ontario: University of Guelph, 1994. v. 21, p. 187-190.

BILLARS, L.; HICKS, A.; BLIWISE, D.; SIGMUNDSSON, T.; SIGURDSSON, A.; KRISTJANSSON, K.; GULCHER, J.; STEFANSSON, K.; RYE, D. Hypertension risk and PLMS in restless legs syndrome. **Sleep**, v. 30, p. A297–A298, 2007. Suplement.

BINDON, B. M.; PIPER, L. R. Boorola (F) gene: major gene affecting ovine ovarian function. In: EVANS, J. W.; HOLLAENDER, A. (Ed.). **Genetic Engeneering of Animals**: an Agriculture Perspective. New York: Plenum Press, 1986. p. 678-693.

BINK, C. A. M.; VAN ARENDONK, J. A. M. Marker-assisted prediction of breeding values in dairy cattle populations. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5., 1994, Ontario. **Proccedings...** Ontario: University of Guelph, 1994. v. 21, p. 233-236.

BISHOP, M. D.; KAPPES, S. M.; KEELE, J. W.; STONE, R. T.; SUNDEN, S. L.; HAWKINS, G. A.; TOLDO, S. S.; FRIES, R.; GROSZ, M. D.; YOO, J. A genetic linkage map for cattle. **Genetics**, v. 136, n. 2, p. 619-39, 1994.

BLAXTER, M.; MANN, J.; CHAPMAN, T.; THOMAS, F.; WHITTON, C.; FLOYD, R.; ABEBE, E. 2005. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Science**, v. 360, n. 1462, p. 1935-43, 2005.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of genetic linkage maps in man using restriction fragment length polymorphism. **The American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314–331, 1980.

BOVENHUIS, H.; ARENDONK, J. A. M.; KORVER, S. Associations between milk protein polymorphism and production traits. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2549-2559, 1992.

BRADLEY, D. G.; MACHUGH, D. E.; LOFTUS, R.; SOW, R. S.; HOSTE, C. H.; CUNNINGHAM, E. P. Zebu-taurine variation in Y chromosomal DNA: a sensitive assay for genetic introgression in Western African tyranotolerant cattle populations. **Animal Genetics**, v. 15, p. 7–12, 1994.

BRAGA, M. L. de S. As políticas desenvolvimentistas e ambientais brasileiras e seus impactos na região dos cerrados. In: DUARTE, M. L. G.; BRAGA, M. L. de S. (Org.). **Tristes cerrados**: sociedade e biodiversidade. Brasília, DF: Paralelo 5, 1998. p. 93-123.

BRENNER, C. H. A note on paternity computation in cases lacking a mother. **Transfusion**, v. 33, n. 1, p. 51-54, 1993.

BRENNER, C. H. Symbolic kinship program. **Genetics**, v. 145, p. 535–542, 1997.

BRUFORD, M. W.; BRADLEY, D. G.; LUIKART, G. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 11, p. 900-10, 2003.

BRUMFIELD, R. T.; BEERLI, P.; NICKERSON, D. A.; EDWARDS, S. V. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, p. 249–256, 2003.

BULLERWELL, C. E.; GRAY, M. W. Evolution of the mitochondrial genome: protist connections to animals, fungi and plants. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 528-34, Oct. 2004.

BUMSTEAD, N.; PALYGA, J. A preliminary linkagee map of the chicken genome. **Genomics**, v. 13, p. 690–697, 1992. doi:10.1016/0888-7543 (92)90143-G

BURT, D. W. The cattle genome reveals its secrets. **Journal of Biology**, v. 8, n. 36, 2009. DOI:10.1186/JBIOL137.

BUSKE, B.; STERNSTEIN, I.; BROCKMANN, G. QTL and candidate genes for fecundity in sows. **Animal Reproduction Science**, v. 95, p. 167–183, 2006. doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.12.015

CARDENAS, M.; HIGGINBOTHAM, J.; CARTER, J.; MCGRANE, R.; GAIGE, T.; MEAD, K.; WALKER, J.; ALBRACHT, D.; DAVITO, J.; YANG, S-P.; LEONG, S.; CHINWALLA, A.; SEKHON, M.; WYLIE, K.; DODGSON, J.; ROMANOV, M. N.; CHENG, H.; DE JONG, P. J.; OSOEGAWA, K.; NEFEDOV, M.; ZHANG, H.; MCPHERSON, J. D.; KRZYWINSKI, M.; SCHEIN, J.; HILLIER, L.; MARDIS, E. R.; WILSON, R. K.; WARREN, W. C. A physical map of the chicken genome. **Nature**, v. 432, p. 761–764, 2004. doi:10.1038/nature03030

CAVALI-SFORZA, L. L.; FELDMAN M. W. The application of molecular genetic approaches to the study of human evolution. **Nature Genetics**, v. 33, p. 5266-5275, 2003.

CEPICA, S.; WOLF, J.; HOJNÝ, J.; Vacková, I.; Schröffel JUNIOR, J. Relations between genetic distance of parental pig breeds and heterozygosity of their F1 crosses measured by genetic markers. **Animal Genetics**, v. 26, p. 135- 140, 1995.

CHAKRABORTY, R.; SHAW, M.; SCHULL, W. J. Exclusion of paternity: The current state of the art. **American Journal of Human Genetics**, v. 26, p. 477-488, 1974.

CHANTRY-DARMON, C.; URIEN, C.; DE ROCHAMBEAU, H.; ALLAIN, D.; PENA, B.; HAYES, H.; GROHS, C.; CRIBIU, E. P.; DERETZ-PICOULET, S.; LARZUL, C.; SAVE, J. C.; NEAU, A.; CHARDON, P.; ROGEL-GAILLARD, C. A firstgeneration microsatellite-based integrated genetic and cytogenetic map for the European rabbit (Oryctolagus cuniculus) and localization of angora and albino. **Animal Genetics**, v. 37, p. 335–341, 2006. doi: 10.1111/j.1365-2052.2006.01462.x

CHEN, K.; BAXTER, T.; MUIR, W. M.; GROENEN, M. A.; SCHOOK, L. B. Genetic resources, genome mapping and evolutionary genomics of the pig (Sus scrofa). **International Journal of Biological Science**, v. 3, p. 153–165, 2007.

CHEN, X.; SULLIVAN, P. F. Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput. **Pharmacogenomics Journal**, v. 3, p. 77–96, 2003.

COLTMAN, D. W.; WILSON, K.; PILKINGTON, J. G.; STEAR, M. J.; PEMBERTON, J. M. A microsatellite polymorphism in the gamma interferon gene is associated with resistance to gastrointestinal nematodes in a naturally-parasitized population of Soay sheep. **Parasitology**, v. 122, p. 571-582, 2001.

Connelly, t.; Aerts, J.; Law, A.; Morrison, W. I. Genomic analysis reveals extensive duplication within the bovine TRB *lócus*. **BMC Genomics**, v. 10, p. 192, 2009.

CORCORAN, D.; FAIR, T.; PARK, S.; RIZOS, D.; PATEL, O. V.; Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in *in vitro* compared with in vivo cultured bovine embryos. **Reproduction**, v. 131, p. 651– 660, 2006. doi:10.1530/REP.1.01015

COUTINHO, L. L.; REGITANO, L. C. A. O uso de marcadores moleculares na indústria animal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 1995. v. 1, p. 195-205.

COWAN, C. M.; DENTINE, M. R.; AX, R. L.; Schuler, L. A. Structural variation around prolactin gene linked to quantitative traits in elite Hostein sire family. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 79, p. 566-582, 1990.

CRAWFORD, A. M.; DODDS, K. G.; EDE, A. J.; PIERSON, C. A.; MONTGOMERY, G. W.; GARMONSWAY, H. G.; BEATTIE, A. E.; DAVIES, K.; MADDOX, J. F.; KAPPES, S. W.; STONE, R. T.; NGUYEN, T. C.; PENTY, J. M.; LORD, E. A.; BROOM, J. E.; BUITKAMP, J.; SCHWAIGER, W.; EPPLEN, J. T.; MATTHEW, P.; MATTHEWS, M. E.; HULME, D. J.; BEH, K. J.; MCGRAW, R. A.; BEATTIE, C. W. An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. **Genetics**, v. 140, p. 703–724, 1995.

CRAWFORD, A. M.; TATE, M. L.; MCEWAN, M. L.; Kumaramanickavel, G.; McEwan, K. M.; Dodds, K. G.; Swarbrick, P. A.; Thompson, P. How reliable are sheep pedigrees? **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 53, p. 363- 366, 1993.

CRITTENDEN, L. B.; PROVENCHER, L.; SANTANGELO, L.; LEVIN, I.; ABPLANALP, H.; BRILES, R.W.; BRILES, W. E.; DODGSON, J. B. Characterization of a red jungle fowl by white leghorn backcross reference population for molecular mapping of the chicken genome. **Poultry Science**, v. 72, p. 334– 348, 1993.

CSILLERY, K.; JOHNSON, T.; BERALDI, D.; CLUTTON-BROCK, T.; COLTMAN, D.; HANSSON, B.; SPONG, G.; PEMBERTON, J. M Performance of Marker-Based relatedness estimators in natural populations of outbred vertebrates. **Genetics**, v. 173, p. 2091- 2101, 2006.

DALRYMPLE, B. **Virtual Sheep Genome**. 2006. Disponível em: <http://www.livestockgenomics.csiro.au/sheep/vsheep.php>. Acesso em: 1 ago. 2007.

DE KONING, D. J.; CABRERA, C. P.; HALEY, C. S. Genetical genomics: combining gene expression with marker genotypes in poultry. **Poultry Science**, v. 86, p. 1501–1509, 2007.

DEL LAMA, S. N.; ZAGO, M. A. Identification of the Kapa-casein and Beta-lactoglobulin genotypes in Brasilian Bos indicus and Bubalus bubalis populations. **Brasilian Journal of Genetics**, v. 19, p. 73-77, 1996.

DELESPAUX, V.; AYRAL, F.; GEYSEN, D.; GEERTS, S. PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification: applicability for the diagnosis of mixed infections with different trypanosome species in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 3, p. 185-193, 2003.

DENG, W.; SHI, B.; HE, X.; ZHANG, Z.; XU, J.; LI, B.; YANG, J.; LING, L.; DAI, C.; QIANG, B.; SHEN, Y.; CHEN, R. Evolution and migration history of the Chinese population inferred from Chinese Y-chromosome evidence. **Journal of Human Genetics**, v. 49, p. 339–348, 2004.

DENISE, S.; JOHNSTON, E.; HALVERSON, J.; MARSHALL, K.; ROSENFELD, D.; MCKENNA, S.; SHARP, T.; EDWARDS, J. Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American kennel club breeds using 17 canine microsatellite markers. **Animal Genetics**, v. 35, p. 14- 17, 2003.

DENNIS, J. A.; HEALY, P. J.; BEAUDET, A. L.; O'Brien, W. E. Molecular definition of bovine arginiosuccinate synthetase deficiency. **Proceedings of the National Academy of Science-USA**, v. 86, p. 7947-7951, 1989.

DIEZ-TASCON, C.; LITTLEJOHN, R. P.; ALMEIDA, P. A.; CRAWFORD, A. M. Genetic variation within the Merino sheep breed: analysis of closely related populations using microsatellites. **Animal Genetics**, v. 31, n. 4, p. 243-51, 2000.

DOSTÁL, J.; STRATIL, A. Polymorphic markers as tolls for paterity control in dogs. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR ANIMAL GENETICS, 24., Prague, 1994. **Proceedings...** Animal Genetics, 1994. v. 25, p.13.

DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, p. 17–22, 2008.

DUERR, R. H.; TAYLOR, K. D.; BRANT, S. R.; RIOUX, J. D.; SILVERBERG, M. S.; DALY, M. J.; STEINHART, A. H.; ABRAHAM, C.; REGUEIRO, M.; GRIFFITHS, A.; DASSOPOULOS, T.; BITTON, A.; YANG, H.; TARGAN, S.; DATTA, L. W.; KISTNER, E. O.; SCHUMM, L. P.; LEE, A. T.; GREGERSEN, P. K.; BARMADA, M. M.; ROTTER, J. I.; NICOLAE, D. L.; CHO, J. H. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. **Science**, v. 314, p. 1461–1463, 2006. doi:10.1126/science.1135245

EDWARDS, C. J.; GAILLARD, C.; BRADLEY, D. G.; MACHUGH, D. E. Y-specific microsatellites polymorphisms in a range of bovid species. **Animal Genetics**, v. 31, p. 127-130, 2000.

ELLIS; P. J.; AFFARA, N. A. Spermatogenesis and sex chromosome gene content: an evolutionary perspective. **Human fertility (Cambridge, England)**, v. 9, p. 1, p. 1-7, 2006.

EL-SAYED, A.; HOELKER, M.; RINGS, F.; SALILEW, D.; JENNEN, D.; THOLEN, E.; SIRARD, M. A.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. **Physiological Genomics**, v. 28, p. 84–96, 2006. doi:10.1152/PHYSIOLGENOMICS.00111.2006

ELSIK, C. G.; TELLAM, R. L.; WORLEY, K. C.; GIBBS, R. A.; The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium. The Genome Sequence of Taurine Cattle: A Window to Ruminant Biology and Evolution. **Science**, v. 324, p. 522-528, 2009.

EMERY, A. E. H.; MALCON, S. An introduction to recombinant DNA in medicine. Hoboken: John Willey, 1995.

ERIKSSON, J.; SIEDEL, H.; LUKAS, D.; KAYSER, M.; ERLER, A.; HASHIMOTO, C.; HOHMANN, G.; BOESCH, C.; VIGILANT, L. Y-chromosome analysis confirms highly sex-biased dispersal and suggests a low male effective population size in bonobos (Pan paniscus). **Molecular Ecology**, v. 15, n. 4, p. 939-949, 2006.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4th. ed. Harlow: Longmans Green, 1996.

FAO. New developments in biotechnology and their implications for the conservation of farm animal genetic resources: reversible DNA quiescence and somatic cell cloning. Report on a joint workshop of FAO and Istituto Sperimentale per la Zootechnia Monterotondo. Rome, 1998b.

FAO. **Secondary Guidelines for Development of National Farm Animal Genetic Resources Management Plans**. Management of Small Populations at Risk. Rome, 1998a.

FERNÁNDEZ, H.; HUGHES, S.; VIGNE, J.-D.; HELMER, D.; HODGINS, G.; MIQUEL, C.; HÄNNI, C.; LUIKART, G.; TABERLET, P. Divergent mtDNA lineages of goats in an Early Neolithic site, far from the initial domestication areas. **Proceedings of the National Academy of Sciences-USA**, v. 103, p. 15375–15379, 2000.

FERNANDEZ, J.; TORO, M. A.; CABALLERO, A. Management of Subdivided Populations in Conservation Programs: Development of a Novel Dynamic System. **Genetics**, v. 179, p. 683–692, 2008.

FICETOLA, G. F.; MIAUD, C.; POMPANON, F.; TABERLET, P. Species detection using environmental DNA from water samples. **Biology Letters**, v. 4, p. 423-425, 2008.

FLORES, R.; RICHARDSON, T. Genetic engineering o the caseins to modify the behavior of milk during processing a review. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 2640-2654, 1988.

FOKIDIS, H. B.; SCHABLE, N. A.; HAGEN, C.; GLENN, T. C.; RISCH, T. S. Characterization of microsatellite DNA *loci* for the southern flying squirrel (Glaucomys volans). **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 616- 618, 2003.

FOUQUET, A.; GILLES, A.; VENCES, M.; MARTY, C.; BLANC, M.; GEMMELL, N.J. Underestimation of species richness in neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. **PLoS One,** v. 2, n. 10, p. e1109, 2007.

FRANZ LANG, B.; BURGER, G.; O'KELLY, C. J.; CEDERGREN, R.; GOLDING, G. B.; LEMIEUX, C.; SANKOFF, D.; TURMEL, M.; GRAY, M. W. An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. **Nature**, v. 387, p. 493 – 497, 1997.

FREEMAN, A. R.; MEGHEN, C. M.; MACHUGH, D. E.; LOFTUS, R. T.; ACHUKWI, M. D.; BADO, A.; SAUVEROCHE, B.; BRADLEY, D. G. Admixture and diversity in West African cattle populations. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 11, p. 3477-87, 2004.

FRIES, R.; EGGEN, A.; WOMACK, J. E. The bovine genome map. **Mammalian Genome**, v. 4, p. 405-428, 1993.

FRIES, G.; BECKMANN, J. S.; GEORGES, M.; SOLLERO, M.; WOMACK, J. The bovine gene map. **Animal Genetics**, v. 20, n. 2, p. 3-29, 1989.

FRIES, R. Mapping the bovine genome: Methodological aspects and strategy. **Animal Genetics**, v. 24, p. 111-116, 1993.

GAO, Y.; ZHANG, R.; HU, X. X.; LI, N. Application of genomic technologies to the improvement of meat quality of farm animals. **Meat Science**, v. 77, p. 36–45, 2007. doi:10.1016/j.meatsci.2007.03.026

GARCIA-CLOSAS, M.; MALATS, N.; REAL, F. X.; YEAGER, M.; WELCH, R.; SILVERMAN, D.; KOGEVINAS, M.; DOSEMECI, M.; FIGUEROA, J.; CHATTERJEE, N.; TARDÓN, A.; SERRA, C.; CARRATO, A.; GARCÍA-CLOSAS, R.; MURTA-NASCIMENTO, C.; ROTHMAN, N.; CHANOCK, S. J. Large-scale evaluation of candidate genes identifies associations between VEGF polymorphisms and bladder cancer risk. **PLoS Genetics**, v. 3, p. 287–293, 2007. doi:10.1371/JOURNAL.PGEN.0030029

GARRIGAN, D.; HAMMER; M. F. Reconstructing human origins in the genomic era. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, p. 669-690, 2006.

GASTON, K. J.; O'NEILL, M. A. Automated species identification: why not? **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 359, p. 655-667, 2004.

GELDERMANN, H.; PIEPER, U.; WEBER, W. E. Effect of misidentification on the estimation of breeding value and heritability in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 63, p. 1759- 1768, 1986.

GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. The Gene Ontology (GO) project in 2006. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. D322–D326, 2006. doi:10.1093/NAR/GKJ021

GEORGES, M.; DIETZ, A. B.; MISHRA, A.; Nielsen, D. L.; Sargeant, S.; Sorensen, A.; Steele, M. R.; Zhao, X.; Leipold, H.; Womack, J. E. Microsatellite mapping of the gene causing weaver disease in cattle will allow the study of an associated quantitative triat *locus*. **Proceedings of the National Academy of Science-USA**, v. 90, p. 1058-1062, 1993a.

GEORGES, M.; DRINKWATER, R.; KING, T.; Mishra, A.; Moore, S. S.; Nielsen, D.; Sargeant, L. S.; Sorensen, A.; Steele, M. R.; Zhao, X. Microsatellite mapping of the gene affecting horn development in Bos taurus. **Nature Genetic**, v. 4, p. 206-208, 1993b.

GEORGES, M.; LATHOROP, M.; BOUQUET, Y.; Hilbert, P.; Marcotte, A.; Schwers, A.; Roupain, J.; Vassart, G.; Hanset, R. Linkage relationships among 20 genetics markers in cattle. Evidence for linkage between two pairs of blood group systems: B-Z and S-F/V respectively. **Animal Genetics**, v. 21, p. 95-105, 1990.

GEORGES, M.; LEQUARRE, A. S.; CASTELLI, M.; Hanset, R.; Vassart, G. DNA fingerprinting in domestical animals using four diferent minisatellite probes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 47, p. 127-131, 1988.

GEORGES, M.; LEQUARRE, A. S.; CASTELLI, M.; HANSET, R.; VASSART, G. DNA fingerprinting in domestical animals using four diferent minisatellite probes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 47, p. 127-131, 1988.

GEORGES, M.; MASSEY, J. M. Velogenetics, or the synergistic use of marker assisted selection and germ-line manipulation. **Theriogenology**, v. 35, p. 151-159, 1991.

GEORGES, M.; NIELSEN, D.; MACHINNON, M.; A. MISHRA, R.; OKIMOTO, A. T.; PASQUINO, L. S.; SARGEANT, A.; SORENSEN, M. R.; STEELE, X.; ZHAO, J. E.; WOMACK; HOESCHELE, I. Mapping quantitative trait *loci* controling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. **Genetics**, v. 139, p. 907-920, 1995.

GIBBS, R.; WEINSTOCK, G.; KAPPES, S.; SCHOOK, L.; SKOW, L.; WOMACK, J. E. **Bovine genomic sequencing initiative:** cattleizing the human genome. 2002. Available at http://www.genome.gov/Pages/Research/Sequencing/SeqProposals/BovineSEQ.pdf [Verified 1 August 2007].

GIUFFRA, E.; KIJAS, J. M.; AMARGER, V.; CARLBORG, O.; JEON, J. T.; ANDERSSON, L. The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. **Genetics**, v. 154, n. 4, p. 1785-1791, 2000.

GJERTSON, D. W.; MORRIS, J. W. Assessing probability of paternity and the product rule in the DNA systems. **Genetica**, v. 96, p. 89-98, 1995.

GLAUBITZ, J. C.; RHODES JUNIOR, O. E.; DEWOODY, J. A. Prospects for inferring pairwise relationships with single nucleotide polymorphisms. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 1039–1047, 2003.

GLOWATSKI-MULLIS, M. L.; GAILLARD, C.; WIGGER, G.; FRIES, R. Microsatellite-based parentage control in cattle. **Animal Genetics**, v. 26, n. 1, p. 7-12, 1995.

GODDARD, M. E.; HAYES, B. J. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 381 -391, 2009.

GONGORA, J.; MORALES, S.; BERNAL, J. E.; MORAN, C. Phylogenetic divisions among Collared peccaries (Pecari tajacu) detected using mitochondrial and nuclear sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 41, p. 1–11, 2006.

GOODMAN, S. J. Patterns of extensive genetic differentiation and variation among European harbor seals (Phoca vitulina vitulina) revealed using microsatellite DNA polymorphisms. **Molecular Genetics and Evolution**, v. 15, n. 2, p. 104- 118, 1998.

GRAVES, J. A. Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. **Cell**, v. 124, n. 5, p. 901-14, 2006.

GRAY, M. W.; BURGER, G.; FRANZ LANG, B. Mitochondrial Evolution. **Science**, v. 283, p. 1476-1481, 1999.

GRAY, M. W.; LANG, B. F.; BURGER, G. Mitochondria of protists. **Annual Review of Genetics**, v. 38, p. 477-524, 2004.

GREEN, R. D.; COCKETT, N. E.; MILLER, M. F.; Hancock, D. L.; Bidwell, C.; Barrett, L. S.; Morgan, J. B.; Tatum, J. D. Characterization of Taq I polymorphisms in the bovine calpastatin gene. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5., 1994. **Proccedings...** p. 450-453.

Grisart, B.; Coppieters, W.; Farnir, F.; Karim, L.; Ford, C.; Berzi, P.; Cambisano, N.; Mni, M.; Reid, S.; Simon, P.; Spelman, R.; Georges, M.; Snell, R. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: Identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. **Genome Research**, v. 12, p. 222- 231, 2002.

GROBET, L.; MARTIN, L. J.; PONCELET, D.; PIROTTIN, D.; BROUWERS, B.; RIQUET, J.; SCHOEBERLEIN, A.; DUNNER, S.; MENISSIER, F.; MASSABANDA, J.; FRIES, R.; HANSET, R.; GEORGES, M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. **Nature Genetics**, v. 17, p. 71–74, 1997.

GROBET, L.; PONCELET, D.; ROYO, L. J.; BROUWERS, B.; PIROTTIN, D.; MICHAUX, C.; MENISSIER, F.; ZANOTTI, M.; DUNNER, S.; GEORGES, M. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. **Mammalian Genome**, v. 9, p. 210–213, 1998.

GROENEN, M. A. M.; CHENG, H. H.; BUMSTEAD, N.; BENKEL, B. F.; BRILES, W. E.; BURKE, T.; BURT, D. W.; CRITTENDEN, L. B.; DODGSON, J.; HILLEL, J.; LAMONT, S.; DE LEON, A. P.; SOLLER, M.; TAKAHASHI, H.; VIGNAL, A. A consensus linkage map of the chicken genome. **Genome Research,** v. 10, p. 137–147, 2000.

GROENEN, M. A. M.; CROOIJMANS, R. P. M. A.; VEENENDAAL, A.; CHENG, H. H.; SIWEK, M,; VAN DER POEL, J. J. A comprehensive microsatellite linkage map of the chicken genome. **Genomics**, v. 49, p. 265–274, 1998. doi: 10.1006/geno.1998.5225

GROVES, C. P.; GRUBB, P. The suborder Suiformes. In: OLIVER, W. L. R. (Ed.). **Pigs, Peccaries and Hippos IUCN**. Gland: The World Conservation Union, 1993. p. 1–4.

GUDBJARTSSON, D. F.; ARNAR, D. O.; HELGADOTTIR, A.; GRETARSDOTTIR, S.; HOLM, H.; Sigurdsson, A., Jonasdottir, A.; Baker, A.; Thorleifsson, G.; Kristjansson, K.; Palsson, A. Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25. **Nature,** v. 448, p. 353–357, 2007. doi:10.1038/NATURE06007

GUDMUNDSSON, J.; SULEM, P.; MANOLESCU, A.; AMUNDADOTTIR, L. T.; GUDBJARTSSON, D.; Helgason, A.; Rafnar, T.; Bergthorsson, J. T.; Agnarsson, B. A.; Baker, A. Genome-wide association study identifies a second prostate cancer susceptibility variant at 8q24. **Nature Genetics,** v. 39, p. 631–637, 2007. doi:10.1038/NG1999

GUO, J.; DU, L. X.; MA; Y. H.; GUAN, W. J.; LI, H. B.; ZHAO, Q. J.; LI, X.; RAO, S. Q. A novel maternal lineage revealed in sheep (Ovis aries). **Animal Genetics**, v. 36, n. 4, p 331-336, 2005.

GUO, Y.; MAO, H.; REN, J.; YAN, X., DUAN, Y., YANG, G., REN, D., ZHANG, Z., YANG, B., OUYANG, J., BRENIG, B., HALEY, C., HUANG, L. A linkage map of the porcine genome from a large-scale White Duroc X Erhualian resource population and evaluation of factors affecting recombination rates. **Animal Genetics**, v. 40, p. 47–52, 2009.

GUYONNET-DUPERAT, V.; GEVERINK, N.; PLASTOW, G. S.; EVANS, G.; OUSOVA, O.; CROISETIERE, C.; FOURY, A.; RICHARD, E.; MORMEDE, P.; MOISAN,M. P. Functional implication of an Arg307Gly substitution in corticosteroid-binding globulin, a candidate gene for a quantitative trait*locus* associated with cortisol variability and obesity in pig. **Genetics**, v. 173, p. 2143–2149, 2006. doi:10.1534/genetics.105.053983

GVOZDEV, V. A.; KOGAN, G. L.; USAKIN, L. A. The Y chromosome as a target for acquired and amplified genetic material in evolution. **Bioessays**, v. 27, n. 12, p. 1256-62, 2005.

HABERFELD A.; DUNNINGTON, E. A.; SIEGEL, P. B.; HILLEL J. Heterosis and DNA fingerprinting in chickens. **Poultry Science**, v. 75, p. 951- 953, 1996

HAFEZ, I. S. E. **Reprodução animal**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1988. 720 p.

HAIG S.M. Molecular Contributions to Conservation. **Ecology**, v. 79, p. 413-425, 1998.

HALEY, C. S.; KNOTT, S. A. A simple regression method for mapping quantitative trait *loci* in line crosses using flanking markers. **Heredity**, v. 69, p. 315–332, 1992.

HALEY, C. S.; KNOTT, S. A.; ELSEN, J. M. Mapping quantitative trait *loci* in crosses between outbred lines using least squares. **Genetics**, v. 136, p. 1195–1207, 1994.

HALEY, C. S.; VlSSCHER, P. M. Strategies to Utilize Marker-Quantitative Trait *Loci* Associations. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 2, p. 85-97, 1998.

HAMADA, H.; PETRINO, M.; KAKUNAGA, T. A novel repeated element with Z-DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, p. 6465-6469, 1982.

HAMMER, M. F.; KARAFET, T. M.; REDD, A. J.; JARJANAZI, H.; SANTACHIARA-BENERECETTI, S.; SOODYALL, H.; ZEGURA, S. L. Hierarchical patterns of global human Y-chromosome diversity. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 7, p. 1189-203, 2001.

HANOTTE, O.; TAWAH, C. L.; BRADLEY, D. G.; OKOMO, M.; VERJEE, Y.; OCHIENG, J.; REGE, J. E. Geographic distribution and frequency of a taurine Bos taurus and an indicine Bos indicus Y specific allele amongst sub-saharan African cattle breeds. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 4, p. 387-396, 2000.

HANSET, R.; MICHAUX, C. On the genetic determinism of muscular hypertophy in the Belgian White and Blue cattle breed. Il. Population data. **Genetics Selection and Evolution**, v. 17, p.3, n. 269-386, 1985.

HAYES, B. J.; BOWMAN, P. J.; CHAMBERLAIN, A. C.; GODDARD, M. E. Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 433–443, 2009.

HEALY, P. J.; DENNIS, J. A. Inherited diseases in beef cattle in Australia. WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5., 1994. **Proccedings...** v. 21, p. 183-184.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, p. S96–S99, 2003b.

HELGADOTTIR, A.; THORLEIFSSON, G.; MANOLESCU, A.; GRETARSDOTTIR, S.; BLONDAL, T.; Jonasdottir, A.; Jonasdottir, A.; Sigurdsson, A.; Baker, A.; Palsson, a.; A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. **Science**, v. 316, p. 1491–1493, 2007. doi:10.1126/SCIENCE.1142842

HELLBORG, L.; ELLEGREN, H. Low levels of nucleotide diversity in mammalian Y chromosomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 1, p. 158-163, 2004.

HENDERSON, C. R. Use of an average numerator relationship matrix for multiple sire joining. **Journal of Animal Science**, v. 66, p. 1614-1621, 1988.

HERRERA, A.; HÉRY, M.; STACH, J. E. M.; JAFFRÉ, T.; NORMAND, P.; NAVARRO, E. Species richness and phylogenetic diversity comparisons of soil microbial communities affected by nickel-mining and revegetation efforts in New Caledonia. **European Journal of Soil Biology**, v. 43, p. 130-139, 2007.

HIENDLEDER, S.; KAUPE, B.; WASSMUTH, R.; JANKE, A. Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 269, n. 1494, p. 893-904, 2002.

HIENDLEDER, S.; LEWALSKI, H.; JANKE, A. Complete mitochondrial genomes of Bos taurus and Bos indicus provide new insights into intra-species variation, taxonomy and domestication. Cytogenet. **Genome Research**, v. 120, n. 1-2, p. 150-6, 2008.

HILLEL, J.; SCHAAP, T.; HABERFIELD, A.; JEFFREYS, A. J.; PLOTZKY, Y.; CAHANER, A.; DNA fingerprints applied to genome introgression in breeding programes. **Genetics**, v. 124, p. 783-789, 1990.

HIRSCHHORN, J. N.; DALY, M. J. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 95–108, 2005. doi:10.1038/nrg1521

HOESCHELE, I.; MEINERT, T.R. Association of genetic defects with yield and type traits: the weaver *locus* effect on yield. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 2503-2515, 1990.

HOHENHÖRST, J.; FRIES, R.; VÖGELI, E.; Stranzinger, G. Use of microsatellites for parentage control in pigs. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR ANIMAL GENETICS, 24., Prague, 1994. **Proceedings...** Animal Genetics, v. 25, n. 2, p. 33, 1994.

HOLMES, N. G. Microsatellite markers and the analysis of genetic disease. **British Veterinary Journal**, v. 150, p. 411-421, 1994.

Hori-Oshima, S.; Barreras-Serrano, A. Relationship between DGAT1 and Pit-1 genes polymorphism and Milk yield in holstein cattle. Journal Animal Science, v. 81, p. 253, 2003. Supplement 1. Disponível em: <http://www.asas.org/western03/data/1000757.pdf>. Acesso em: 16 jul. 2009. Proceedings, Western Section, American Society of Animal Science, v. 54, 2003.

HU, X.; GAO, Y.; FENG, C.; LIU, Q.; WANG, X.; DU, Z.; WANG, Q.; LI, N. Advanced technologies for genomic analysis in farm animals and its application for QTL mapping. **Genetica**, v. 136, p. 371–386, 2009. DOI 10.1007/s10709-008-9338-7

HU, Z. L.; FRITZ, E. R.; REECY, J. M. AnimalQTLdb: a livestock QTL database tool set for positional QTL information mining and beyond. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. D604–D609, 2007. doi:10.1093/nar/gkl946

HUANG, Y.; ZHAO, Y.; HALEY, C. S.; HU; HAO, J.; WU, C.; LI, N. A genetic and cytogenetic map for the duck (Anas platyrhynchos). **Genetics**, v. 173, p. 287–296, 2006. doi:10.1534/genetics.105.053256

HUGHES, A. L.; NEI, M. Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II *loci*: evidence for overdominance selection. **Proceedings of the National Academy of Science-USA**, v. 86, p. 958-962, 1989.

HUGHES, A. L.; NEI, M. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I *loci* reveals overdominant selection. **Nature**, v. 335, p. 167-170, 1988.

ICHIKAWA, Y.; TAKAGI, K.; TSUMAGARI, S.; ISHIHAMA, K.; MORITA, M.; KANEMAKI, M.; TAKEISHI, M.; TAKAHASHI, H. Canine parentage testing based on microsatellite polymorphisms. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 11, p. 1209- 1213, 2001.

JAMIELSON, A. The effectiveness of using co-dominant polymorphic allelic series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full-sib pair members. **Animal Genetics**, v. 25, p. 37-44, supl 1, 1994.

JAMIESON, A. The genetics of transferrins in cattle. **Heredity**, v. 20, p. 419-441, 1965.

JEFFREYS, A. J.; TURNER, M.; DEBENHAN, P. The efficiency of multi*locus* DNA fingerpriting probes for individualization and establishment of family relationships, determinaed from extensive casework. **Americam Journal of Human Genetics**, v. 48, p. 824-840, 1991.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN S. L. Hypervariable minisatellite regions in the human DNA. **Nature**, v. 314, p. 67-73, 1985a.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Individual specific "fingerprints" of human DNA. **Nature**, v. 316, p. 76- 79, 1985b.

JEON, J. T.; CARLBORG, O.; TORNSTEN, A.; GIUFFRA, E.; AMARGER, V.; CHARDON, P.; ANDERSSON-EKLUND, L.; ANDERSSON, K.; HANSSON, I.; LUNDSTROM, K.; ANDERSSON, L. A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the IGF2 *locus*. **Nature Genetics**, v. 21, p. 157–158, 1999. doi:10.1038/5938

JEON, J. T.; PARK, E. W.; JEON, H. J.; KIM, T. H.; LEE, K. T.; CHEONG, I. C. A large-insert porcine library with sevenfold genome coverage: a tool for positional cloning of candidate genes for major quantitative traits. **Molecules and Cells**, v. 16, p. 113–116, 2003.

JOHNS, G. C.; AVISE, J. C. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. **Molecular Genetics and Evolution**, v. 15, n. 11, p. 1481- 1490, 1998.

JOLLÈS, P.; JOLLÈS, J. What's new in lysozyme research? Always a model sistem, today as yesterday. **Molecular and Cellular Bioquemistry**, v. 63, p. 165-189, 1984.

JOLLY, R.D.; VAN-DE-WATER, N.S.; RICHARDS, R.B.; DORLING P.R. Generalised glycogenesis in beef shorthorn cattle- heterozygote detection. **Australian Veterinary Journal**, v. 57, p. 227-229, 1977.

JOSHI, M. B.; ROUT, P. K.; MANDAL, A. K.; TYLER-SMITH, C.; SINGH, L.; THANGARAJ, K. Phylogeography and origin of Indian domestic goats. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 3, p. 454-462, 2004.

JUNGERIUS, B. J.; VAN LAERE, A. S. T. E.; PAS, M. F.; VAN OOST, B. A.; ANDERSSON, L.; GROENEN, M. A. The IGF2-intron3-G3072A substitution explains a major imprinted QTL effect on backfat thickness in a Meishan 9 European white pig intercross. **Genetics Research**, v. 84, p. 95–101, 2004. doi:10.1017/S0016672304007098

KADARMIDEEN, H. N.; VON ROHR, P.; JANSS, L. L. From genetical genomics to systems genetics: potential applications in quantitative genomics and animal breeding. **Mammalian Genome**, v. 17, p. 548– 564, 2006. doi:10.1007/s00335-005-0169-x

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 1099–1106, 2007.

KANGINAKUDRU, S.; METTA, M.; JAKATI, R. D.; NAGARAJU, J. Genetic evidence from Indian red jungle fowl corroborates multiple domestication of modern day chicken. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 8, p. 174, 2008.

KAPPES, S. M.; KEELE, J. W.; STONE, R. T.; McGraw, R. A.; Sonstegard, T. S.; Smith, T. P. L.; Lopez-Corrales, N. L.; Beattie, c. W. A second-generation linkage map of the bovine genome. **Genome Research**, v. 7, n. 3, p. 235-249, 1997.

KARLSSON, E.; BARANOWSKA, I.; WADE, C.; SALMON HILLBERTZ, N.; ZODY, M.; ANDERSON, N.; BIAGI, T.; PATTERSON, N.; PIELBERG, G.; KULBOKAS, E. J.; COMSTOCK, K.; KELLER, E.; MESIROV, J.; VON EULER, H.; KA¨MPE, O.; HEDHAMMAR, A.; LANDER, E.; ANDERSSON, G.; ANDERSSON, L.; LINDBLAD- TOH, K. Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. **Nature Genetics**, v. 39, p. 1321–1328, 2007. doi:10.1038/ng.2007.10

KAUFMAN, J.; SKJODT, K.; SALOMONSEN, A.; SIMONSEN, M.; DU PASQUIER, L.; PARISOT, R.; RIEGERT, P. MHC like molecules in some nonmammalian vertebrates can be detected by someee cross-reactive xenoantisera. **The Journal of Immunology**, v. 144, p. 2258-2272, mar. 1990.

KAYSER, L. Gene hunting on horseback: A trip through the wild world of molecular genetics! **Cowboy Genetics**, May/June/July, 2006. Disponível em: <http://www.bovine-elite.com/CowboyGenetics.pdf>.

KEHRLI, M. E. J.; ACKERMANN, M. R.; SHUSTER, D. E.; Bovine leukocyte adhesion deficiency. WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5., 1994. **Proccedings...** v. 21, p. 157-164.

KEMENES, P. A. A quantificação das frequências dos alelos "A" e "B" dos genes Kapa-caseína e Beta-lactoglobulina em algumas raças bovinas. 1996. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

KHATKAR, M. S.; THOMSON, P. C.; TAMMEN, I.; RAADSMA, H. W. Quantitative trait *loci* mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. **Genetics Selection Evolution**, v. 36, p. 163–190, 2004. doi:10.1051/gse:200 3057

KNOTT, S. A.; MARKLUND, L.; HALEY, C. S.; ANDERSSON, K.; DAVIES, W.; ELLEGREN, H.; FREDHOLM, M. HANSSON, I.; HOYHEIM, B.; LUNDSTROM, K.; MOLLER, M.; ANDERSSON, L. Multiple marker mapping of quantitative trait *loci* in a cross between outbred wild boar and large White pigs. **Genetics**, v. 149, p. 1069–1080, 1998.

Komisarek, J.; Wa kowicz, K.; Michalak, A.; Dorynek, Z. Effects of DGAT1 variants on milk production traits in Jersey cattle. **Animal Science Papers and Reports**, v. 22, n. 3, p. 307- 313, 2004.

KOUDANDÉ, O. D.; VAN ARENDONK, J. A. M.; IRAQI, F. Marker-Assited Introgression of Trypanotolerance QTL in Mice. **Mammalian Genome**, v. 16, n. 2, p. 112-119, 2003.

KUHNER, M. K.; BEERLI, P.; YAMATO, J.; FELSENSTEIN, J. Usefulness of single nucleotide polymorphism data for estimating population parameters. **Genetics**, v. 156, p. 439–447, 2000.

LAGSIEL, A.; LIPKIN, E.; SOLLER, M. Association between SSCP haplotypes at the bovine growth hormone gene and milk protein percentage. **Genetics**, v. 142, p. 945- 951, 1996.

LAHN, B.; PAGE, D. C. Functional coherence of the human Y chromosome. **Science**, v. 278, p. 675–680, 1997.

LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, 121: 185-199, 1989.

LANDER, E.S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v. 121, p. 185– 199, 1989.

LANDRY, P. A.; KOSKINEN, M. T.; PRIMMER, C. R. Deriving evolutionary relationships among populations using microsatellites and (μ)2: All *loci* are equal, but some are more equalk than others. **Genetics**, v. 161, p. 1339- 1347, 2002.

LANG, B. F.; GRAY, M. W.; BURGER, G. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. **Annual Review of Genetics**, v. 33, p. 351-397, 1999.

LARSON, G.; ALBARELLA, U.; DOBNEY, K.; ROWLEY-CONWY, P.; SCHIBLER, J.; TRESSET, A.; VIGNE, J. D.; EDWARDS, C. J.; SCHLUMBAUM, A.; DINU, A.; BALAÇSESCU, A.; DOLMAN, G.; TAGLIACOZZO, A.; MANASERYAN, N.; MIRACLE, P.; VAN WIJNGAARDEN-BAKKER, L.; MASSETI, M.; BRADLEY, D. G.; COOPER, A. Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe. **Proceedings of the National Academy of Sciences-USA**, v. 104, n. 39, p. 15276-15281, Sep. 2007.

LEMAY D. G.; LYNN, D. J.; MARTIN, W. F.; NEVILLE, M. C.; CASEY, T. M.; RINCON, G.; KRIVENTSEVA, E. V.; BARRIS, W. C.; HINRICHS, A. S.; MOLENAAR, A. J.; POLLARD, K. S.; MAQBOOL, N. J.; SINGH, K.; MURNEY, R.; ZDOBNOV, E. M.; TELLAM, R. L.; MEDRANO, J. F.; GERMAN, J. B.; RIJNKELS, M. The bovine lactation genome: insights into the evolution of mammalian milk. **Genome Biology**, 2009. Disponível em: <http://genomebiology.com/2009/10/4/R43>. Acesso em: 12 set. 2009.

LEONARD, J. A.; WAYNE, R. K.; WHEELER, J.; VALADEZ, R.; GUILLEN, S.; VILA, C. Ancient DNA evidence for Old World origin of New World dogs. **Science,** v. 298, n. 5598, p. 1613-1616, 2002.

LITT, M; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by "*in vitro*" amplification of a dinucleotide within the cardiac muscle actin gene. **American Jounal of Human Genetics**, v. 44, p. 397-401, 1989.

LIU, Y.; QIN, X.; SONG, X. Z.; JIANG, H.; SHEN, Y.; DURBIN, K. J.; LIEN, S.; KENT, M. P.; SODELAND, M.; REN, Y.; ZHANG, L.; SODERGREN, E.; HAVLAK, P.; WORLEY, K. C.; WEINSTOCK, G. M.; GIBBS, R. A. Bos taurus genome assembly. **BMC Genomics**, v. 24, n. 10, p. 180, 2009.

LIU, P.; VIKIS, H.; LU, Y.; AND YOU, M. Large scale in silico mapping of complex quantitiative traits in inbred mice. **PLoS ONE**, v. 2, n. 7, jul. 2007. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0000651

LIU, W.; LAMONT, S. J. Candidate gene approach: potentional association of caspase-1, inhibitor of apoptosis protein-1, and prosaposin gene polymorphisms with response to Salmonella enteritidis challenge or vaccination in young chicks. **Animal Biotechnology**, v. 14, p. 61–76, 2003. doi:10.1081/ABIO-120022136

LOFTUS, R. T.; MACHUGH, D. E.; NGERE, L. O.; BALAIN, D. S.; BADI, A. M.; BRADLEY, D. G.; CUNNINGHAM, E. P. Mitochondrial genetic variation in European, African and Indian cattle populations. **Animal Genetics**, v. 25, n. 4, p. 265-271, 1994.

LUCY, M. C.; HAUSER, S. D.; EPPARD, P. J.; Krivi, G. G.; Clark, J. H.; Bauman, D. E.; Collier, R. J. Variants os somatotropin in cattle: gene frequences in major dayri breeds and associated milk production. **Domesticated Animals Endocrinology**, v. 10, p. 325-333, 1993.

LUTY, J. A.; GUO, Z.; WILLARD H. F.; Ledbetter, D. H.; Ledbetter, S.; Litt, M. Five polynorphic microsatellite VNTRs on the human X chrmossome. **American Journal of Human Genetics**, v. 46, p. 776, 1990.

MACHUGH, D. E.; SHRIVER, M. D.; LOFTUS, R. T.; CUNNINGHAM, P.; BRADLEY, D. G. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (Bos taurus and Bos indicus). **Genetics**, v. 146, p. 1071–1086, 1997.

MACLENNAN, D. H.; DUFF, C.; ZORZATO, F.; FUJII, J.; PHILLIPS, M.; KORNELUK, R. G.; FRODIS, W.; BRITT, B. A.; WORTON, R. G. Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia. **Nature**, v. 343, p. 559–561, 1990. doi:10.1038/343559a0

MADDOX, J. F.; DAVIES, K. P.; CRAWFORD, A. M.; HULME, D. J.; VAIMAN, D.; CRIBIU, E. P.; FREKING, B. A.; BEH, K. J.; COCKETT, N. E.; KANG, N.; RIFFKIN, C. D.; DRINKWATER, R.; MOORE, S. S.; DODDS, K. G.; LUMSDEN, J. M.; VAN STIJN, T. C.; PHUA, S. H.; ADELSON, D. L.; BURKIN, H. R.; BROOM, J. E.; BUITKAMP, J.; CAMBRIDGE, L.; CUSHWA, W. T.; GERARD, E.; GALLOWAY, S. M.; HARRISON, B.; HAWKEN, R. J.; HIENDLEDER, S.; HENRY, H. M.; MEDRANO, J. F.; PATERSON, K. A.; SCHIBLER, L.; STONE, R. T.; VAN HEST. B. An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 *loci*. **Genome Research**, v. 11, p. 1275–1289, 2001. doi:10.1101/gr.GR-1350R

MANNEN, H.; KOHNO; M.; NAGATA, Y.; TSUJI, S.; BRADLEY, D. G.; YEO, J. S.; NYAMSAMBA, D.; ZAGDSUREN, Y.; YOKOHAMA, M.; NOMURA, K.; AMANO, T. Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in North Eastern Asian cattle. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 32, n. 2, p. 539-544, 2004.

MARGULIS, L. Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: phylogenetic classification of life. **Proceedings of the National Academy of Sciences-USA**, v. 93, n. 3, p. 1071-1076, 1996.

MARIANTE, A. da S.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; EGITO, A. A.; MCMANUS, C.; LOPES, M. A.; PAIVA, S. R. PRESENT STATUS OF THE CONSERVATION OF LIVESTOCK GENETIC RESOURCES. **Livestock Science**, v. 120, n. 3, p. 204-212, 2009.

MARKMANN, M.; TAUTZ, D. Reverse taxonomy: an approach towards determining the diversity of meio benthic organisms based on ribosomal RNA signature sequences. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Science**, v. 360, p. 1917–1924, 2005.

MARRIS, E. The genome of the american West. **Nature**, v. 457, p. 950- 952, 2009.

MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUUK, L. E. B. Pemberton, J. M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 639–655, 1998.

MASSEY, J. M.; GEORGE, M. Genmark's approach to marker assisted selection. **Animal Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 95-110, 1992.

MATHUR, P. K. Markers Assisted Selection for the Canadian Swine Industry. NATIONAL SWINE IMPROVEMENT FEDERATION ANNUAL MEETING, Des Moines, Iowa, 2003. **Proceedings...**

MAURICO, J. D. G.; BRAD, A. F.; RACHEL, P. C.; STEVEN, M. K.; JOHN, W. K.; ROGER, T. S.; KREG, A. L.; KEN, G. D.; ALLAN, M. C.; CRAIG, W. B. A secondgeneration linkage map of the sheep genome. **Mammalian Genome**, v. 9, p. 204–220, 1998.

McCormick, A.; Brady, H.; Theill, L. E.; Karin, M. Regulations of the pituitary-specific homeobox gene GHF1 by cell autonomous and environmental cues. **Nature**, v. 345, p. 829- 832, 1990.

MCRAE, A. F.; MCEWAN, J. C.; DODDS, K. G.; WILSON, T.; CRAWFORD, A. M.; SLATE, J. Linkage disequilibrium in domestic sheep. **Genetics**, v. 160, n. 3, p. 1113-1122, 2002.

MEADOWS, J. R. S.; HAWKEN, R. J.; KIJAS, J. W. Nucleotide diversity on the ovine Y chromosome. **Animal Genetics**, v. 35, p. 379–385, 2004.

MEADOWS, J. R.; CEMAL, I.; KARACA, O.; GOOTWINE, E.; KIJAS, J. W. Five ovine mitochondrial lineages identified from sheep breeds of the near East. **Genetics**, v. 175, n. 3, p. 1371-1379, 2007.

MEADOWS, J. R.; HANOTTE, O.; DRÖGEMÜLLER, C.; CALVO, J.; GODFREY, R.; COLTMAN, D.; MADDOX, J. F.; MARZANOV, N.; KANTANEN J, KIJAS JW. Globally dispersed Y chromosomal haplotypes in wild and domestic sheep. **Animal Genetics**, v. 37, n. 5, p. 444-454, 2006.

MEADOWS, J. R.; LI, K.; KANTANEN, J.; TAPIO, M.; SIPOS, W.; PARDESHI, V.; GUPTA, V.; CALVO, J. H.; WHAN, V.; NORRIS, B.; KIJAS, J. W. Mitochondrial sequence reveals high levels of gene flow between breeds of domestic sheep from Asia and Europe. **Journal of Heredity,** v. 96, n. 5, p. 494-501, 2005.

MEIRELLES, F. V.; ROSA, A. J. M.; LÔBO, R. B.; GARCIA, J. M.; SMITH, L. C.; DUARTE, F. A.M. Is The Americam Zebu Really Bos indicus? **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 4, p. 543-546, 1999.

MEJDELL, C. M.; LIE, O.; SOLBU, H. Association of major histocompatibility complex antigens (BOLA-A) with AI bull progeny test results for mastitis, Ketosis and fertility in Norwegian cattle. **Animal Genetics**, v. 25, p. 99-104, 1994.

MIESFELD, R.; KRYSTAL, M.; ARNHEIM, N. A member of new repeated sequence family wich is conserved throughout eukaryotic evolution is found between the human - and -globulin genes. **Nucleic Acids Research**, v. 9, p. 5931, 1981.

MILLIGAN, B. G., LEEBENS-MACK, J.; STRAND A. E. Conservation genetics: beyond the maintenance of marker diversity. **Molecular Ecology**, v. 3, p. 423-435, 1994.

MONAGHAN, M. T.; BALKE, M.; GREGORY, T. R.; VOGLER, A. P. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Science,** v. 360, n. 1462, p. 1925-1933, 2005.

MOODY, D. E.; POMP, D.; NEWMAN, S.; MacNEIL, M. D. Characterization of DNA polymorphisms in three populatoins of Herefrd cattle and their associations with growth and maternal EPD in line 1 Herefords. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 1784-1793, 1996.

MORIN, P. A.; LUIKART, G.; WAYNE, R. K. and the SNP workshop Group. SNPs in ecology, evolution and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 19, p. 208–216, 2004.

NADERI, S.; REZAEI, H. R.; POMPANON, F.; BLUM, M. G.; NEGRINI, R.; NAGHASH, H. R.; BALKIZ, O.; MASHKOUR, M.; GAGGIOTTI, O. E.; AJMONE-MARSAN, P.; KENCE, A.; VIGNE, J. D.; TABERLET, P. The goat domestication process inferred from large-scale mitochondrial DNA analysis of wild and domestic individuals. **Proceedings of the National Academy of Sciences-U S A**, v. 105, n. 46, p. 17659-17664, 2008.

NEI, M. Genetic distances between populations. **American Naturalist**, v. 106, p. 283-292, 1972.

NII, M.; HAYASHI, T.; MIKAWA, S.; TANI, F.; NIKI, A.; MORI, N.; UCHIDA, Y.; FUJISHIMA-KANAYA, N.; KOMATSU, M.; AWATA, T. Quantitative trait *loci* mapping for meat quality and muscle fiber traits in a Japanese wild boar 9 Large White intercross. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 308–315, 2005.

NII, M.; HAYASHI, T.; TANI, F.; NIKI, A.; MORI, N.; FUJISHIMA-KANAYA, N.; KOMATSU, M.; AIKAWA, K.; AWATA, T.; MIKAWA, S. Quantitative trait *loci* mapping for fatty acid composition traits in perirenal and back fat using a Japanese wild boar 9 Large White intercross. **Animal Genetics**, v. 37, p. 342–347, 2006. doi:10.1111/j.1365-2052.2006.01485.x

NOTT, C. F. G.; ROLLINS, W. Effect of the mh gene for muscular hypertrophy on birth weigth and growth to one year of age in beef cattle. **Growth**, v. 43, p. 221- 234, 1979.

NOTTER, D. R. Genetic improvement of fertility using correlated traits and molecular markers. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 1995. p. 121-130, 1995.

O'BRIEN, S. J.; GRAVES, J. A. M. Report of the committee on comparative gene mapping. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 58, p. 1124-1151, 1991.

OLSAKER, I.; MEJDELL, C. M.; SORENSEN, A.; LIE, O. High lysozyme activity in a Norwegian bovine family co-segregates with a restriction fragment length polymorphism. **Animal Genetics**, v. 24, p. 421-425, 1993.

OTOMO, P. V.; VAN VUUREN, B. J.; REINECKE, S. A. Usefulness of DNA Barcoding in Ecotoxicological Investigations: Resolving Taxonomic Uncertainties Using Eisenia Malm 1877 as an Example. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, p. 261–264, 2009.

OTTO, G.; ROEHE, R.; LOOFT, H.; THOELKING, L.; KNAP, P. W.; ROTHSCHILD, M. F.; PLASTOW, G. S.; KALM, E. Associations of DNA markers with meat quality traits in pigs with emphasis on drip loss. **Meat Science**, v. 75, p. 185–195, 2007. doi:10.1016/j.meatsci.2006.03.022

OVERTON, K. M., BEEVER, J. E.; LEWIN, H. A.; ROBINSON, J. L. The gene for bovine Factor XI maps to chromosome 27. **Journal Dairy Science**, v. 79, p. 165, 1996. Supplement 1. Abstract.

PAIVA, S. R.; SILVÉRIO, V. C.; MCMANUS, C.; EGITO, A. A.; MARIANTE, A da S; CASTRO, S. T. R.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; DERGAM, J. A. Origin of the main locally adapted sheep breeds of Brasil: a RFLP-PCR molecular analysis. **Archivos de Zootecnia da Universidade de Cordoba**, Córdoba, v. 54, p. 395-399, 2005.

PATERSON, A. H.; LANDER, E. S.; HEWITT, J. D.; PETERSON, S.; LINCOLN, S. E. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. **Nature**, v. 335, p. 721–726, 1988. doi:10.1038/3357 21a0

PEDROSA, S.; UZUN, M.; ARRANZ, J.; GUTIERREZ-GIL, B.; SAN PRIMITIVO, F.; BAYON Y. Evidence of three maternal lineages in near eastern sheep supporting multiple domestication events. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 272, p. 2211–2217, 2005.

PEMBERTON, J. M. Wild Pedigrees: The way forward. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 275, p. 613- 621, 2008.

PENA, S. D. J.; CHAKRABORTY, R. Paternity in the DNA era. **Trends in Genetics**, v. 6, p. 204-209, 1994.

PIPER, L. R.; BINDON, B. M. The genetics and endocrinology of the Booroola sheep F gene. In: WEIR, B. S.; EISEN, E. J.; GOODMAN M. M.; NAMKOONG, G. (Ed.). INTERNATIONAL CONFERENCE ON QUANTITATIVE GENETICS SINAUER ASSOCIATES, 2., Sunderland, 1988. **Proccedings...** p. 270.

POPE, C. E. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. **Theriogenoly**, v. 53, p. 163-174, 2000.

PUKAZHENTHI, B. S.; WILDT, D. E. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 33- 46, 2004.

PUKAZHENTHI, B.; COMIZZOLI, P.; TRAVIS, A.J.; WILDT, D.E. Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, p. 77- 90, 2006.

QUASS, R. L.; POLLACK, E. J. Mixed model methodology for farm and ranch beef cattle testing programs. **Journal of Animal Science**, v. 51, p. 1277-1287, 1980.

RAMPILLI, M.; CAROLI, A.; BOLLA, P.; PIRLO, G. Relazioni tra gnotip lattoproteici, composizione caseinica e attitudine alla coagulazione del latte nel corso della lattazione. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, v. 39, p. 262-279, 1988.

RASMUNSEN, B. A.; CHRISTIAN, L. L. H blood types in pigs as predictors of stress suscetibility. **Science**, v. 191, p. 947- 48, 1976.

REICHMANN, K. G.; DRINKWATER, R. D.; HETZEL, D. J. S.; Hielscher, R. W.; Healy, P. J. Generalised glycogenosis (Pompe's disease) in Brhman cattle. A review of the Syndrome and its control in Australia. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5., 1994, Guelph, Canada. **Proccedings...** p. 165- 168.

Renaville, R.; Gengler, N.; Vrech, E.; Prandi, A.; Massart, S.; Corradini, C.; Bertozzi, C.; Mortiaux, F.; Burny, A.; Portetelle, D. Pit-1 gene polymorphisms, Milk yield, and conformation traits for Italian Holstein- Friesian Bulls. **Journal Dairy Science**, v. 80, p. 3431- 3438, 1997.

ROCHA, J. L.; BAKER, J. F.; WOMACK, J. E.; SANDERS, J. O.; TAYLOR, J. F. Statistical associations between restriction fragment length polymorphisms and quantitative traits in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3360-3370, 1992.

ROCHA, J. L.; POMP, D.; VAN VLECK, L. D. QTL analysis in livestock. **Methods Mol Biol**, v. 195, p. 311–346, 2002.

ROCHA, J. L.; SANDERS, J. O.; TAYLOR, J. F. Genetic markers to manipulate QTL: The additive illusion. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 250, 1994. Suplemento 1. Abstract.

ROHRER, G. A.; ALEXANDER, L. J.; HU, Z.; SMITH, T. P.; KEELE, J. W.; BEATTIE, C. W. A comprehensive map of the porcine genome. **Genome Research**, v. 6, n. 5, p. 371-391, 1996.

ROHRER, G. A.; ALEXANDER, L. J.; KEELE, J. W.; SMITH, T. P.; BEATTIE, C. W. A Microsatellite linkage map of the porcine genome. **Genetics**, v. 136, p. 231–245, 1994.

RON, M.; BAND, M.; WYLER A.; WELLER, J. I. Unequivocal determination of sire allele origin for multialleleic microsatllites when only sire and progeny are genotyped. **Animal Genetics**, v. 24, p 171-176, 1993.

RON, M.; BLANC, Y.; BAND, M.; Ezra, E.; Weller, J. I. Misidentification rate in the Israeli dairy cattle population and its implications for genetic improvement. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 676-681, 1996.

ROTHSCHILD, M. F. From a sow's ear to a silk purse: real progress in porcine genomics. **Cytogenetics Genome Research**, v. 102, p. 95–99, 2003. doi: 10.1159/000075732

ROTHSCHILD, M. F. Porcine genomics delivers new tools and results: this little piggy did more than just go to market. **Genetics Research**, v. 83, p. 1–6, 2004. doi:10.1017/S0016672303006621

ROTHSCHILD, M. F.; JACOBSON, C.; VASKE, D. A.; Tuggle, C. K.; Short, T. H.; Sasaki, S.; Eckardt, G. R.; McLaren, D. G. A major gene for litter size in pigs. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5., 1994, Guelph, Canada. **Proceedings...** p. 225-228.

RUBINOFF, D. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. **Conservation Biology**, v. 20, n. 4, p. 1026-33, 2006.

RUSSELLO, M. A.; AMATO, G. Ex situ population management in the absence of pedigree information. **Molecular ecology**, v. 13, p. 2829- 2840, 2004.

RUSSO, T. P.; KLEIN, M. **Cargill and MMI Genomics launch Tru-Marbling™ and Tru-Tenderness™ DNA based selection products**. Disponível em: <http://www.metamorphixinc.com/013107%20MMICargill.pdf>. Acesso em: 16 jul. 2009.

SAVOLAINEN, V.; COWAN, R. S.; VOGLER, A. P.; RODERICK, G. K.; LANE, R. Towards writing the encyclopaedia of life: An introduction to DNA barcoding. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Science**, v. 360, p. 1805–1811, 2005.

SAXENA, R.; VOIGHT, B. F.; LYSSENKO, V.; BURTT, N. P.; DE BAKKER, P. I.; CHEN, H.; ROIX, J. J.; KATHIRESAN, S.; HIRSCHHORN, J. N.; DALY, M. J.; HUGHES, T. E.;, GROOP, L.; ALTSHULER, D.; ALMGREN, P.; FLOREZ, J. C.; MEYER, J.; ARDLIE, K.; BENGTSSON BOSTROM, K.; ISOMAA, B.; LETTRE, G.; LINDBLAD, U.; LYON, H. N.; MELANDER, O.; NEWTON-CHEH, C.; NILSSON, P.; ORHO-MELANDER, M.; RASTAM, L.; SPELIOTES, E. K.; TASKINEN, M. R.; TUOMI, T.; GUIDUCCI, C.; BERGLUND, A.; CARLSON, J.; GIANNINY, L.; HACKETT, R.; HALL, L.; HOLMKVIST, J.; LAURILA, E.; SJOGREN, M.; STERNER, M.; SURTI, A.; SVENSSON, M.; SVENSSON, M.; TEWHEY, R.; BLUMENSTIEL, B.; PARKIN, M.; DEFELICE, M.; BARRY, R.; BRODEUR, W.; CAMARATA, J.; CHIA, N.; FAVA, M.; GIBBONS, J.; HANDSAKER, B.; HEALY, C.; NGUYEN, K.; GATES, C.; SOUGNEZ, C.; GAGE, D.; NIZZARI, M.; GABRIEL, S. B.; CHIRN, G. W.; MA, Q.; PARIKH, H;. RICHARDSON, D.; RICKE, D.; PURCELL. S. Genome-wide association analysis identifies *loci* for type 2 Diabetes and triglyceride levels. **Science**, v. 316, p. 1331–1336, 2007. doi:10.1126/science.1142358

SCHINDEL, D. E.; MILLER, S. E. DNA barcoding a useful tool for taxonomists. **Nature**, v. 435, p. 17, 2005. doi:10.1038/435017b.

SCHLEE, P.; GRAML, R.; SCHALENBERGER, E.; SCHAMS, D.; ROTTMANN, O; OLBRICHBLUDAU, A.; PIRCHNER. F. Growth hormone and insuline-like growth factor I concentrations in bulls of various growth hormone genotypes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, p. 497-500, 1994.

SCHLÖTTERER, C.; HARR, B. Single nucleotide polymorphisms derived from ancestral populations show no evidence for biased divesity estimates in Drosophila melanogaster. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 947-950, 2004.

SCHMUTZ, S. M.; MARQUESS, F. L. S.; BERRYERE, T. G.; MOKER, J. S. DNA marker-assisted selection of the polled condition in Charolais cattle. **Mammalian Genome**, v. 6, p. 710-713, 1995.

SCHWENGER, B.; SCHÓBER, S.; SIMON, D. DUMPS cattle carry a point mutation inthe uridine monophosphate synthase gene. **Genomics**, v. 16, p. 241-244, 1993.

SCHWERIN, M.; BROCKMANN, G.; VANSELOW, J.; SEYFERT, H. M. Perspectives of molecular genome analysis in livestock improvemen- An overview. **Animal Research and Development**, v. 42, p. 15-26, 1995.

SCHYMICK, J. C.; SCHOLZ, S.W.; FUNG, H.; BRITTON, A.; AREPALLI, S.; GIBBS, J.; LOMBARDO, F.; MATARIN, M.; KASPERAVICIUTE, D.; HERNANDEZ, D. Genome-wide genotyping in amyotrophic lateral sclerosis and neurologically normal controls: first stage analysis and public release of data. **Lancet neurology**, v. 6, p. 322–328, 2007. doi:10.1016/S1474-4422(07)70037-6.

SCOTT, L. J.; MOHLKE, K. L.; BONNYCASTLE, L. L.; WILLER, C. J.; LI, Y.; DUREN, W. L.; ERDOS, M. R.; STRINGHAM, H. M.; CHINES, P. S.; JACKSON, A. U.; PROKUNINA- OLSSON, L.; DING, C. J.; SWIFT, A. J.; NARISU, N.; HU, T.; PRUIM, R.; XIAO, R.; LI, X. Y.; CONNEELY, K. N.; RIEBOW, N. L.; SPRAU, A.G.; TONG, M.; WHITE, P. P.; HETRICK, K. N.; BARNHART, M. W.; BARK, C. W.; GOLDSTEIN, J. L.; WATKINS, L.; XIANG, F.; SARAMIES, J.; BUCHANAN, T. A.; WATANABE, R. M.; VALLE, T. T.; KINNUNEN, L.; ABECASIS, G. R.; PUGH, E. W; DOHENY, K. F.; BERGMAN, R. N.; TUOMILEHTO, J.; COLLINS, F. S.; BOEHNKE, M. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. **Science**, v. 316, p. 1341–1345, 2007. doi:10.1126/ science.1142382

SEATON, G.; HALEY, C. S.; KNOTT, S. A.; KEARSEY, M.; VISSCHER, P. M. QTL express: mapping quantitative trait *loci* in simple and complex pedigrees. **Bioinformatics**, v. 18, p. 339–340, 2002. doi:10.1093/bioinfor matics/18.2.339

SEDDON, J. M.; PARKER, H. G.; OSTRANDER, E. A.; ELLEGREN, H. SNPs in ecological and conservation studies: a test in the Scandinavian wolf population. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 503–511, 2005.

SEIESTAD, M.; BEKELE, E.; IBRAHIM, M.; TOURE, A.; TRAORE, M. A view of modern human origins from Y chromosome microsatellite variation. **Genome Research**, v. 9, p. 558-567, 1999.

SHANKS, R. D.; HUANG, Y. C.; ROBINSON, J. L. Citrullinemia, marker for economically important traits. WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5., 1994, Guelph, Canada. **Proccedings...** p. 319-322.

SHUSTER, D. E.; KEHRLI, M. E.; ACKERMANN, M. R. A prevalent mutation responsible for leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. **Proceedings of the National Academy of Science-USA**, v. 89, p. 9925-9929, 1992.

SKALETSKY, H.; KURODA-KAWAGUCHI, T.; MINX, P. J.; CORDUM, H. S.; HILLIER, L.; BROWN, L. G.; REPPING, S.; PYNTIKOVA, T.; ALI, J.; BIERI, T.; CHINWALLA, A.; DELEHAUNTY, A.; DELEHAUNTY, K.; DU, H.; FEWELL, G.; FULTON, L.; FULTON, R.; GRAVES, T.; HOU, S. F.; LATRIELLE, P.; LEONARD, S.; MARDIS, E.; MAUPIN, R.; MCPHERSON, J.; MINER, T.; NASH, W.; NGUYEN, C.; OZERSKY, P.; PEPIN, K.; ROCK, S.; ROHLFING, T.; SCOTT, K.; SCHULTZ, B.; STRONG, C.; TIN-WOLLAM, A.; YANG, S. P.; WATERSTON, R. H.; WILSON, R. K.; ROZEN, S.; PAGE, D. C. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. **Nature**, v. 423, n. 6942, p. 825-837, 2003.

SMITH, C.; SMITH, D. B. The need for close linkages in marker-assisted selection for economic merit in livestock. **Animal Breeding Abstracts**, v. 61, n. 4, p. 197-204, 1993.

SMITH, S. L.; EVERTS, R. E.; TIAN, X. C.; DU, F.; SUNG, L.-Y.; RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; JEONG, B.-S.; RENARD, J.-P.; LEWIN, H. A.; YANG, X. Global gene expression profiles reveal significant nuclear reprogramming by the blastocyst stage after cloning. **Proceedings of the National Academy of Sciences-USA**, v. 102, n. 17, p. 582–587, 2005. doi:10.1073/PNAS.0508952102

Smith, S. J.; Cases, S.; Jensen, D. R.; Chen, H. C.; Sande, E.; Tow, B.; Sanan, D. A.; Raber, J.; Eckel, R. H.; Farese JUNIOr, R. V. Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. **Nature Genetics**, v. 25, p. 87- 90, 2000.

SOLLER, M. Genetic mapping of the bovine genome using deoxyribonucleic acid-level markers to identify *loci* affecting quantitative traits of economic importance. **Jounal of Dairy Science**, v. 73, p. 2628-2646, 1990.

SOLLER, M.; BECKMAN, J. S. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 67, p. 25-33, 1983.

SOMERS, J.; SMITH, C.; DONNISON, M.; WELLS, D. N.; HENDERSON, H.; MCLEAY, L.; PFEFFER, P. L.. Gene expression profiling of individual bovine nuclear transfer blastocysts. **Reproduction**, v. 131, p. 1073–1084, 2006. doi:10.1530/REP.1.00967

Spelman, R. J.; Ford, C. A.; McElhinnery, P.; Gregory, G. C.; Snell, R. G. Characterization of the DGAT1 gene in the New Zealand dairy population. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 3514- 3517, 2002.

SPRINGER, M. S.; DEBRY, R. W.; DOUADY, C.; AMRINE, H. M.; MADSEN, O.; DE JONG, W. W.; STANHOPE, M. J. Mitochondrial versus nuclear gene sequences in deep-level mammalian phylogeny reconstruction. **Molecular Genetics and Evolution**, v. 18, n. 2, p. 132- 143, 2001.

STEER, S.; ABKEVICH, V.; GUTIN, A.; CORDELL, H. J.; GENDALL, K. L. Genomic DNA pooling for whole-genome association scans in complex disease: empirical demonstration of efficacy in rheumatoid arthritis. **Genes Immunology**, v. 8, p. 57–68, 2007. doi:10.1038/SJ.GENE.6364359

STEINTHORSDOTTIR, V.; THORLEIFSSON, G.; REYNISDOTTIR, I.; BENEDIKTSSON, R.; JONSDOTTIR, T.; Walters, G. B.; Styrkarsdottir, U.; Gretarsdottir, S.; Emilsson, V. A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes. **Nature Genetics**, v. 39, p. 770–775, 2007. doi:10.1038/ NG2043

STRATIL, A.; VAN POUCKE, M.; BARTENSCHLAGER, H.; KNOLL, A.; YERLE, M.; PEELMAN, L. J.; KOPECNY, M.; GELDERMANN, H. Porcine OGN and ASPN: mapping, polymorphisms and use for quantitative trait *loci* identification for growth and carcass traits in a Meishan 9 Pietrain intercross. **Animal Genetics**, v. 37, p. 415–418, 2006. doi:10.1111/ j.1365-2052.2006.01480.x

SYVÄNEN A-C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nature Genetics Reviews**, v. 2, p. 930–942, 2001.

TAKAHATA, N.; NEI, M. Allelic Genealogy Under overdominant and frequenciy-dependent selection and polymorphism of mafor histocompatibility complex *loci*. **Genetics**, v. 124, p. 967-978, 1990.

TANKSLEY, S. D.; RICK, C. M. Isozymic gene linkage map of the tomato: applications in genetics and breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 57, p. 161-170, 1980.

TAPIO, M.; MARZANOV, N.; OZEROV, M.; CINKULOV, M.; GONZARENKO, G.; KISELYOVA, T.; MURAWSKI, M.; VIINALASS, H.; KANTANEN, J. Sheep mitochondrial DNA variation in European, Caucasian, and Central Asian areas. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 9, p. 1776-1783, 2006.

TAPIO, M.; TAPIO, I.; GRISLIS, Z.; HOLM, L. E.; JEPPSSON, S.; KANTANEN, J.; MICEIKIENE, I.; OLSAKER, I.; VIINALASS, H.; EYTHORSDOTTIR, E. Native breeds demonstrate high contributions to the molecular variation in northern European sheep. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 13, p. 3951-3963, 2005.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 6463-6471, 1989.

TAUTZ, D.; ARCTANDER, P.; MINELLI, A.; THOMAS, R. H.; VOGLER, A. P. A plea for DNA taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, p. 70–74, 2003.

TAVARES E. S.; BAKER, A. J. Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds. **BMC Evolutionary Biology,** v. 9, n. 8, p. 81, 2008.

TAYLOR, J. F.; COUTINHO, L. L.; HERRING, K. L.; GALLAGHER JUNIOR, D. S.; BRENNEMAN, R. A.; BURNEY, N.; SANDERS, J. O.; TURNER, J. W.; SMITH, S. B.; MILLER, R. K.; SAVELL, J. W.; DAVIS, S. K. Candidate gene analysis of GH1 for effects on growth and carcass composition of cattle. **Animal Genetics**, v. 29, p. 194–201, 1998. doi:10.1111/j.1365-2052.1998.00317.

TELLAM, R. L.; LEMAY, D. G.; VAN TASSELL, C. P.; LEWIN, H. A.; WORLEY, K. C.; ELSIK, C. G. Unlocking the bovine genome. **BMC Genomics**, v. 10, p. 193, April 2009. doi:10.1186/1471-2164-10-193.

THE BOVINE GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM. ELSIK, C. G.; TELLAM, R. L.; WORLEY, K. C. et al. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. **Science**, v. 324, p. 522-528, 2009.

The UniProt Consortium. The Universal Protein Resource (UniProt). **Nucleic Acids Research**, v. 35, D193–D197, 2007. doi:10.1093/NAR/GKL929

THUE, T. D.; SCHMUTZ, L. Localization of somatostatin to bovine chromosome 1q23-q25 by in situ hybridization. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5., 1994, Guelph, Canada. **Proccedings...**

TORO, M. A.; CABALLERO, A. Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Science**, v. 360, p. 1367–1378, 2005.

TORO, M. A.; FERNANDEZ, J.; CABALLERO, A. Molecular characterization of breeds and its use in conservation. **Livestock Science**, v. 120, p. 179-195, 2009.

TOURE, A.; CLEMENTE, E. J.; ELLIS, P.; MAHADEVAIAH, S. K.; OJARIKRE, O. A.; BALL, P. A.; REYNARD, L.; LOVELAND, K. L.; BURGOYNE, P. S.; AFFARA, N. A. Identification of novel Y chromosome encoded transcripts by testis transcriptome analysis of mice with deletions of the Y chromosome long arm. **Genome Biology**, v. 6, n. 12, p. R102, 2005.

TOZAKI, T.; KAKOI, H.; MASHIMA, S.; HIROTA, K.; HASEGAWA, T.; ISHIDA, N.; MIURA, N.; CHOI-MIURA, N.; TOMITA, M. Population study and validation for paternity testing for thoroughbred horses by 15 microsatellite *loci*. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 11, p. 1191-1197, 2001.

USHA, A. P.; SIMPSON, S. P.; WILLIANS, J. L. Probability of randon sire exclusion using microsatellites markers for parentage verification. **Animal Genetics**, v. 26, p. 155-161, 1995.

UZUN, M.; GUTIERREZ-GIL, B.; ARRANZ, J. J.; SAN PRIMITIVO, F.; SAATCI, M.; KAYA, M.; BAYON, Y. Genetic relationships among Turkish sheep. **Genetics Selection Evolution**, v. 38, n. 5, p. 513-524, 2006.

VAIMAN, D.; SCHIBLER, L.; BOURGEOIS, F.; OUSTRY, A.; AMIGUES, Y.; CRIBIU, E. P. A genetic linkage map of the male goat genome. **Genetics**, v. 144, n. 1, p. 279-305, 1996.

VAIMAN, D.; SCHIBLER, L.; BOURGEOIS, F.; OUSTRY, A.; AMIGUES, Y.; CRIBIU, E. P. A genetic linkage map of the male goat genome. **Genetics**, v. 144, p. 279–305, 1996.

VALENTINI, A.; POMPANON, F.; TABERLET, P. DNA barcoding for ecologists. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 24, n. 2, p. 110-117, 2009.

VAN TASSELL, C. P.; SMITH, T. P. L.; MATUKUMALLI, L. K.; TAYLOR, J. F. ; SCHNABEL, R. D.; TAYLOR LAWLEY, C.; HAUDENSCHILD, C. D.; MOORE, S. S.; WARREN, W. C.; SONSTEGARD, D T. S. SNP Discovery and allele frequency estimation by deep sequencing of reduced representation libraries. **Nature Methods**, v. 5, p. 247–252, 2008.

VAN VLECK, L. D. Misidentification and sire evaluation. **Journal of Dairy Science**, v. 53, p. 1697-1703, 1970.

VANKAN, D. M.; MOORE, S. S.; BELL, K.; HETZEL, D. J. S. Evaluation of DNA microsatellites for parentage and paternity testing in cattle. In: CONFERENCE OF I.S.A.G., 24., 1994 .

VANRADEN, P. M.; VAN TASSELL, C. P.; WIGGANS, G. R.; SONSTEGARD, S.; SCHNABEL, R. D.; TAYLOR, J. F.; SCHENKEL, F. S. Invited review: Reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. **Journal Dairy Science**, v. 92, p. 16–24, 2009.

VELMALA, R.; VILKKI, J.; ELO, K.; Mäki-Tanila, A. Casein haplotypes and their association with milk production traits in the Finnish Ayrshire cattle. **Animal Genetics**, v. 26, p. 419-425, 1995.

VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, p. 275–305, 2002.

VISSCHER, P. M.; THOMPSON, R.; HALEY, C. S. Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping. **Genetics**, v. 143, p. 1013–1020, 1996.

WALLIS, J. W.; AERTS, J.; GROENEN, M. A. M.; CROOIJMANS, R. P. M. A.; LAYMAN, D.; GRAVES, T. A.; SCHEER, D. E.; KREMITZKI, C.; FEDELE, M. J.; MUDD, N. K.; CARDENAS, M.; HIGGINBOTHAM, J.; CARTER, J.; MCGRANE, R.; GAIGE, T.; MEAD, K.; WALKER, J.; ALBRACHT, D.; DAVITO, J.; YANG, S-P.; LEONG, S.; CHINWALLA, A.; SEKHON, M.; WYLIE, K.; DODGSON, J.; ROMANOV, M. N.; CHENG, H.; DE JONG, P. J.; OSOEGAWA, K.; NEFEDOV, M.; ZHANG, H.; MCPHERSON, J. D.; KRZYWINSKI, M.; SCHEIN, J.; HILLIER, L.; MARDIS, E. R.; WILSON, R. K.; WARREN, W. C. A physical map of the chicken genome. **Nature**, v. 432, p. 761–764, 2004. doi:10.1038/nature03030

WANG, W. Y. S.; BARRATT, B. J.; CLAYTON, D. G.; ANDTODD, J. A. Genomewide association studies: theoretical and practical concerns. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 109–118, 2005. doi:10.1038/NRG1522

WEBER J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 38-396, 1989.

WELLER, J. I.; KASHI, Y; SOLLER, M. Power of "daughter" and "granddaughter" designs for determining linkage between marker *loci* and quantitative trait *loci* in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 252-2537, 1990.

WHEELER, D. L.; BARRETT, T.; BENSON, D. A.; BRYANT, S. H.; CANESE, K.; Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. D5–D12, 2007. doi:10.1093/NAR/ GKL1031

WIGGANS, G. R.; SONSTEGARD, T. S.; VANRADEN, P. M.; MATUKUMALLI, L. K.; SCHNABEL, R. D.; TAYLOR, J. F.; SCHENKEL, F. S.; VAN TASSELL, C. P. Selection of single-nucleotide polymorphisms and quality of genotypes used in genomic evaluation of dairy cattle in the United States and Canada. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 3431–3436, 2009. doi:10.3168/jds.2008-1758

WILDER, J. A.; MOBASHER, Z.; HAMMER, M. F. Genetic evidence for unequal effective population sizes of human females and males. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, p. 2047- 2057, 2004a.

WILDER, J. A.; KINGAN, S. B.; MOBASHER, Z.; PILKINGTON, M. M.; HAMMER, M. F. Global patterns of human mitochondrial DNA and Y chromosome structure are not influenced by higher migration rates of females versus males. **Nature Genetics**, v. 36, p. 1122–1125, 2004b.

WILSON, E. O. The encyclopaedia of life. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, p. 77–80, 2003.

Winter, A.; Krämer, W.; Werner, F. A. O.; Kollers, S.; Kata, S.; Durstewitz, G.; Buitkamp, J.; Womack, J. E.; Thaller, G.; Fries, R. Association of the lysine-232/alanine polymorphisms in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait lócus for milk fat content. **Proceedings of the National Academy of Sciences-USA**, v. 99, p. 9300-9305, 2002.

WITT, J. D.; THRELOFF, D. L.; HEBERT, P. D. DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 10, p. 3073-3082, 2006.

WOMACK, J. E. The bovine genome. **Genome Dynamics**, v. 2, p. 69-78, 2006.

Woollard, J.; Schmitz, C. B.; Freeman, A. E.; Tuggle, C. K. Rapid communication: HinfI polymorphism at the bovine PIT1 locus. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 3267, 1994.

WU, C. H.; ZHANG, Y. P.; BUNCH, T. D.; WANG, S.; WANG, W. Mitochondrial control region sequence variation within the argali wild sheep (Ovis ammon): evolution and conservation relevance. **Mammalia**, v. 67, p. 109–118, 2003.

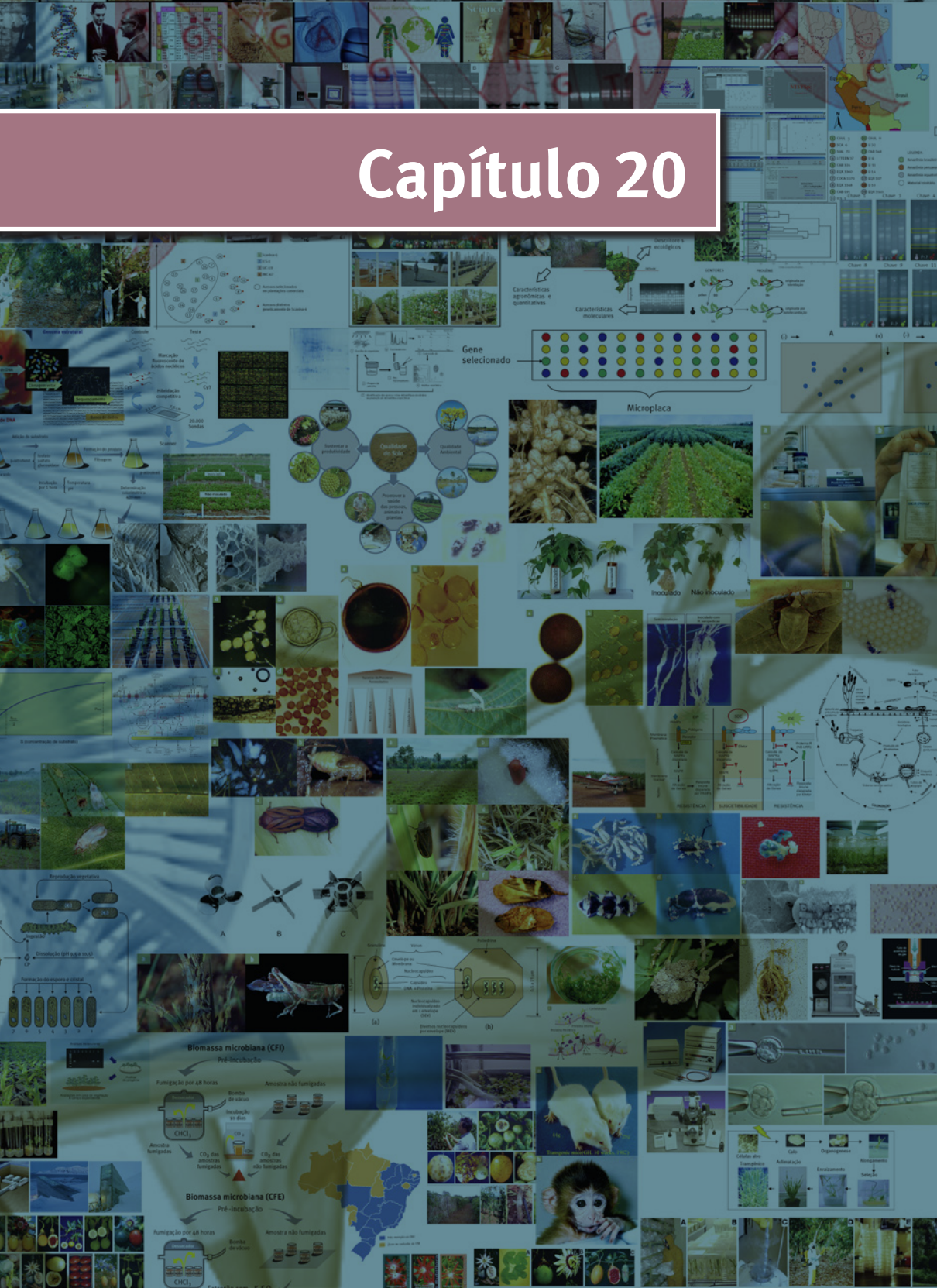
XU, A.; VAN EIJ, K.; PARK, C.; LEWIN, H. A. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lynphocytosis caused by bovine leukemia virus. **Journal of Immunology**, v. 151, p. 6977-6988, 1993.

YU, H. T.; PENG, Y. H. Population differentiation and gene flow revealed by microsatellite DNA markers in the house mouse (Mus musculus castaneus) in Taiwan. **Zoological Science**, v. 19, p. 475-483, 2002.

ZHIVOTOVSKY, L.; FELDMAN, M. W. Microsatellite variability and genetic distances. **Proceedings of the National Academy of Sciences-USA**, v. 92, p. 11549-11552, 1995.

ZIMIN, A. V.; DELCHER, A. L.; FLOREA, L.; KELLEY, D. R.; SCHATZ, M. C.; PUIU, D.; HANRAHAN, F.; PERTEA, G.; VAN TASSELL, C. P.; SONSTEGARD, T. S.; MARÇAIS, G.; ROBERTS, M.; SUBRAMANIAN, P.; YORKE, J. A.; SALZBERG, S. L. A whole-genome assembly of the domestic cow, Bos taurus. **Genome Biology**, v. 10, n. 4, p. R42, 2009.

Capítulo 20


Gene selecionado
Microplaca
Inoculado
Não inoculado
Biomassa microbiana (CFI)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas
Biomassa microbiana (CFE)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas

Biotecnologia aplicada a pecuária bovina

Carlos Frederico Martins
Luiz Gustavo B. Siqueira
Margot Alves Nunes Dode

Introdução

O aumento da exigência mundial para produção de alimentos seguros e de forma sustentável tem obrigado a pecuária bovina a sofrer adaptações, buscando o aumento da eficiência reprodutiva e produtiva dos animais em áreas cada vez menores. Nesse sentido, as biotécnicas de reprodução animal têm contribuído para a produção de animais com genótipos superiores e com eficiência produtiva destacada. Atualmente, a tecnologia de produção de embriões bovinos tem combinado a reprodução assistida com técnicas celulares, moleculares e genômicas, permitindo a multiplicação de animais geneticamente valiosos, bem como a produção de animais transgênicos, com aplicação nas áreas biomédica e agropecuária. Além disso, os avanços na criopreservação de espermatozóides e embriões têm facilitado o processo de multiplicação de animais superiores, devido a facilidade de intercâmbio de material genético dentro e fora do país.

A inseminação artificial e a transferência de embriões são as técnicas que proporcionam os maiores ganhos genéticos para bovinos, pois, juntamente com os programas de teste de progênie, aumentam a pressão de seleção das raças. Atualmente, a técnica de produção *in vitro* de embriões bovinos tem se incorporado fortemente ao setor produtivo, tornando o Brasil o maior produtor de embriões por essa tecnologia. A técnica de fecundação *in vitro* também tem auxiliado no desenvolvimento do processo de clonagem animal, o qual tem sido utilizado comercialmente no país como uma tecnologia de multiplicação de animais geneticamente superiores e estratégicos dentro de determinadas linhagens.

Este capítulo tem o objetivo de apresentar e discutir detalhes das principais biotécnicas que impactam de forma prática a multiplicação de bovinos. Dessa forma serão abordadas as biotécnicas de criopreservação de germoplasma, inseminação artificial, transferência de embriões, fecundação *in vitro* e transferência nuclear (clonagem).

Criopreservação de genomas

A preservação de células em baixas temperaturas é denominada de criopreservação, uma área aplicada da criobiologia. Os avanços na tecnologia de criopreservação têm desenvolvido métodos que permitem manter uma variedade de células viáveis a baixas temperaturas. Nesse sentido, a criopreservação tem se tornado uma ferramenta fundamental para reprodução de bovinos, bem como para formação de criobancos genéticos para conservação animal *ex situ*, possibilitando o armazenamento de espermatozóides, oócitos, embriões e células somáticas. Essas células conservadas podem oportunamente ser utilizadas pelas biotécnicas de reprodução, tais como a inseminação artificial, transferência de embriões, fecundação *in vitro* e transferência nuclear, e, dessa forma, promover a multiplicação de animais com elevado mérito genético, bem como de animais em risco de extinção.

Criopreservação de espermatozóides

O relativo sucesso alcançado com a criopreservação de sêmen tem permitido avanços significativos no campo da agropecuária, tornando possível uma troca internacional de germoplasma de animais geneticamente superiores; da biotecnologia, por permitir uma eficiente estocagem de linhagens de murinos cientificamente importantes; da conservação de espécies em risco de extinção, por meio do banco de recursos genéticos; e da medicina reprodutiva humana (WOODS et al., 2004).

O espermatozóide é uma célula altamente polarizada e especializada com uma estrutura tripartida em cabeça, peça intermediária e cauda. Esse gameta perde a habilidade de biosíntese, reparo, crescimento e divisão celular durante a fase final da espermatogênese. Dessa forma, a conservação de espermatozóides requer uma redução

ou atraso do metabolismo das células espermáticas para gerar um prolongamento de sua vida (YOSHIDA, 2000).

Uma estocagem efetiva de sêmen no estado congelado implica em uma completa interrupção no processo de desenvolvimento das células espermáticas, que começam no testículo e continuam através do epidídimo e após a ejaculação. A criopreservação do sêmen pode ser considerada como uma lacuna entre o período de suspensão da animação espermática e o processo que demarca a continuidade do desenvolvimento, que eventualmente conduz a fecundação (VISHWANATH; SHANNON, 2000).

A maioria dos métodos de criopreservação de espermatozóides de mamíferos ainda consiste de vários passos não fisiológicos, que envolvem a adição hipertônica de um agente crioprotetor permeável (ACP), resfriamento, aquecimento e a remoção do ACP (WOODS et al., 2004). Teoricamente, tem sido possível calcular a adição mínima de ACP requerida antes do resfriamento para evitar os danos osmóticos, bem como a taxa ótima de resfriamento para evitar a formação de gelo intracelular. Um dos mais importantes princípios da criopreservação reside na necessidade de remover o máximo possível de água das células antes de proceder a sua congelação. Se essa desidratação não ocorrer, grandes cristais de gelo se formarão, lesando severamente a estrutura intracelular. No entanto, a remoção demasiada de água das células também pode ser deletéria (SEIDEL JUNIOR, 1984).

A fortuita descoberta do glicerol (POLGE; SMITH, 1949) como um efetivo agente crioprotetor introduziu um novo sistema de estocagem de sêmen, o qual prolonga a viabilidade espermática e mantém o potencial fecundante por longos períodos. Existe um argumento que espermatozóides estocados a -79 °C (gelo seco) ou a -196°C (nitrogênio líquido) mantêm seu potencial fecundante indefinitivamente. No entanto, outros especialistas consideram um período de tempo mais curto para os espermatozóides sobreviverem a baixas temperaturas e manterem o potencial fecundante. Outras evidências sugerem que esse fato pode ocorrer devido à inadequada manutenção da temperatura de estocagem.

Vários aspectos da criopreservação espermática têm sido estudados, tais como a composição química dos diluentes e seus efeitos sobre a

membrana plasmática, limites de tolerância osmótica, condutividade hídrica e a permeabilidade dos crioprotetores (GILMORE et al., 1999). Esses estudos sugerem que os espermatozóides de cada espécie têm diferentes propriedades criobiológicas, bem como apresentam variação quanto à sensibilidade a manipulação (ex, pipetagem, centrifugação), tolerância osmótica, e sensibilidade ao resfriamento (KATKOV; MAZUR, 1999; PHELPS et al., 1999).

De maneira geral, o sucesso da criopreservação da célula depende da velocidade da congelação e da composição da solução em que as células são congeladas. Inicialmente, a água extracelular congela no momento em que a célula se aproxima do ponto de congelação, removendo o líquido extracelular, fato que acarreta um aumento de osmolaridade. Com esse desequilibro osmótico, a água é retirada da célula para o compartimento extracelular, ocasionando uma diminuição do volume celular. Uma adequada desidratação celular depende da velocidade de congelação, de forma a não provocar uma lise da célula. No caso de um processo de congelação muito lento, o equilíbrio permanecerá constante e a célula ficará exposta ao crioprotetor e ao estresse osmótico por tempo prolongado, fato que poderá acarretar a morte celular. Ao contrário, no caso de uma congelação muito rápida, a desidratação será insuficiente e causará a formação de gelo intracelular, ocasionando a lise da célula na ocasião da descongelação (LOPEZ-BEJAR et al., 1994). Para evitar o dano celular, mesmo com uma velocidade de descongelação controlada, há necessidade do emprego de crioprotetores. Mesmo com uma solução crioprotetora empregada, avaliações citológicas têm demonstrado lesões na membrana plasmática, região acrossomal e na configuração da cauda espermática (WILLOUGHBY et al., 1996).

A criopreservação espermática tem sido associada com sucesso com a tecnologia reprodutiva humana e bovina. A maioria dos protocolos utiliza uma curva lenta de resfriamento inicial (ex., 1 °C/min. a 5 °C/min.), que começa a partir da temperatura corporal ou temperatura ambiente, até atingir a temperatura de solidificação. Em seguida, após a formação inicial de gelo, faz-se necessária a adoção de uma taxa de resfriamento mais rápida (ex., 100-200 °C/min.), na presença de glicerol tamponado com gema de ovo e citrato de sódio. Com esse procedi-

mento, a taxa de sucesso tem sido satisfatória nessas espécies quando o sêmen congelado é utilizado na inseminação artificial ou fecundação *in vitro* (HOLT, 2000).

Um protocolo padrão tem sido idealizado para a criopreservação de sêmen de todas as espécies. Entretanto, aqueles destinados a criopreservação de sêmen de mamíferos apresentam limitações e produzem taxas de sucesso que variam entre as espécies e até individualmente dentro da mesma espécie. Em algumas espécies, tais como suína, um método apropriado ainda está por ser determinado, enquanto em outras espécies, como murina, um método que parece ser apropriado para uma linhagem falha em outra (CRITSER; MOBRAATEN, 2000). Essas informações indicam que um exame das propriedades criobiológicas dos espermatozóides, bem como um exame da exata natureza da crio-injúria espécie-específica, deve ser realizada para se determinar um apropriado protocolo de criopreservação (HOLT, 2000).

Apesar dos possíveis avanços na tecnologia de criopreservação de sêmen bovino, essa metodologia já é uma grande realidade para bovinocultura do Brasil. A maior aplicação da criopreservação de sêmen bovino está na possibilidade de utilização e disseminação de material genético de touros superiores por meio da inseminação artificial, melhorando o desempenho do rebanho de corte e de leite e trazendo, dessa forma, maior lucratividade ao pecuarista.

Criopreservação de embriões

No sistema de produção de bovinos, a criopreservação de embriões tem contribuído com o processo de seleção genética e tem reduzido significativamente os custos dos programas de cruzamentos, porque os embriões podem permanecer disponíveis até que as fêmeas receptoras estejam prontas naturalmente, evitando os custos com a sincronização hormonal do cio (WOODS et al., 2004). A criopreservação de embriões permite uma melhor exploração da fêmea doadora, pois os embriões excedentes dos programas de transferência de embriões e fecundação *in vitro* podem ser estocados, formando um banco genético que poderá ser utilizado em momento oportuno. Além disso, essa tecnologia garante com mais facilidade a importação e exporta-

ção de germoplasma de interesse. Uma vez que os custos são menores, há segurança higiênico-sanitária e menores riscos de transporte.

As técnicas de criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vivo* estão bem estabelecidas. Inicialmente, o glicerol foi o crioprotetor mais utilizado (BILTON; MOORE, 1979), entretanto, como os embriões devem ser lavados várias vezes para remover o glicerol antes da transferência para as fêmeas receptoras e, por causa da sua toxicidade, esse crioprotetor tem sido substituído pelo etilenoglicol. O etilenoglicol se difunde para dentro ou para fora do embrião com rapidez, permitindo a transferência direta dos embriões (sem lavagem fora da palheta), fornecendo taxas de prenhezes similares ao glicerol (VOELKEL; HU, 1992). Nesse caso, os embriões são resfriados a 0,3 °C por minuto até -36 °C para garantir a formação de poucos locais de gelo, seguido pela imersão em nitrogênio líquido (TOMINAGA, 2004). Após um rápido aquecimento (>300 °C por minuto), os embriões bovinos têm apresentado taxas de gestação superiores a 50%.

A aplicação comercial em grande escala da tecnologia de produção *in vitro* de embriões bovinos é altamente dependente de procedimentos adequados de criopreservação. A sobrevivência dos embriões produzidos *in vitro* e criopreservados pelo método lento tem sido bem menor do que os embriões produzidos *in vivo* (DINNYÉS et al., 1996; VAJTA et al., 1997). Há muitas diferenças morfológicas entre os embriões produzidos *in vitro* e os de origem *in vivo*, as quais podem afetar a sobrevivência aos procedimentos de criopreservação lenta (WRIGHT JUNIOR; ELLINGTON, 1995; THOMPSON, 1997). O estágio de mórula produzida *in vitro* apresenta menos células compactas, a sensibilidade da zona pelúcida à digestão enzimática é alterada, e os embriões produzidos *in vitro* são usualmente mais escuros e mais leves, possivelmente devido ao aumento do conteúdo lipídico (LEIBO; LOSKUTOFF, 1993). Além disso, os embriões produzidos *in vitro* apresentam menos complexos juncionais, sendo encontradas diferenças na expressão do gene connexin 43 (proteína de junção tipo gap) (WRENZYCKI et al., 1996). A presença de soro fetal bovino (SFB) no sistema de cultivo *in vitro* pode gerar vacuolização, escuridão e menor compactação dos embriões. A redução na temperatura durante o processo de resfriamento pode causar mudanças físicas nas

membranas celulares, tais como separação dos componentes lipídicos que resultam em alteração da função da membrana plasmática (SCHIMSHICK; MCCONNELL, 1973).

Com as atuais técnicas *in vitro*, um grande número de embriões pré-implantacionais podem ser produzidos relativamente a baixos custos. Entretanto, os embriões produzidos *in vitro* são caracterizados pelo aumento da sensibilidade ao resfriamento e diminuição da tolerância a criopreservação quando comparados com os embriões produzidos *in vivo* (POLLARD; LEIBO, 1994). Nesse contexto, o maior obstáculo associado com essa tecnologia é a carência de métodos adequados para preservar os embriões provenientes do sistema *in vitro*. Dessa forma, há, no mínimo, duas abordagens para superar esse problema: melhorar os métodos de criopreservação ou melhorar a qualidade do embrião por meio da otimização do ambiente para produção dos embriões *in vitro*.

Até o presente, a congelação lenta e a vitrificação são comumente utilizados para preservar os embriões bovinos. A congelação lenta, que é mais amplamente utilizada, tem a vantagem de utilizar baixas concentrações de crioprotetores e permite a transferência do embrião na receptora logo após a descongelação (VOLKEL; HU, 1992). As taxas de produção de bezerros são levemente mais baixas após a transferência de embriões produzidos *in vivo* e criopreservados em comparação com a transferência de embriões frescos. No entanto, a congelação lenta de embriões produzidos *in vitro* tem reduzido as taxas de sobrevivência pós-descongelação, devido principalmente a sua susceptibilidade a formação de cristais de gelo (KASAI et al., 2002).

O processo da conservação embrionária por vitrificação tem surgido como grande alternativa para a criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. A vitrificação é a solidificação da solução, não pela cristalização, mas sim pela extrema elevação da viscosidade durante a congelação rápida. Embora a vitrificação elimine as injúrias dos cristais de gelo, a alta concentração de crioprotetores requeridos aumenta o risco dos danos osmóticos e tóxicos (KUWAYAMA et al, 1994). Comparações entre os dois métodos de criopreservação têm levado a diferentes resultados, mas parece que a vitrificação é mais

adequada para a conservação de embriões bovinos produzidos pela fecundação *in vitro* (DYNNÉS et al., 1996).

Na vitrificação, a toxicidade das altas concentrações de crioprotetores determina que as células somente podem ser expostas a solução crioprotetora por um curto período de tempo ou a um volume mínimo de solução (ARAV et al. 2002). Diferentes estratégias foram aplicadas para diminuir o volume e para submergir a amostra rapidamente no nitrogênio líquido, incluindo telas de microscópio eletrônico (MARTINO et al., 1996), *open pulled straw* (OPS) (VAJTA et al., 1998), *cryoloops* (FUCHINOUE et al., 2004), *cryotops* e *cryotips* (KUWAYAMA et al., 2005). Ambos os métodos têm se tornado alternativas viáveis em relação às abordagens tradicionais, especialmente para embriões produzidos *in vitro*, embriões micromanipulados e oócitos (CARVALHAIS et al., 2006; MARQUES et al., 2007).

Criopreservação de oócitos

A criopreservação de oócitos ainda é ineficiente em bovinos, sendo um dos grandes gargalos para a técnica de fecundação *in vitro* (FIV). O sucesso da criopreservação de oócitos tornaria a produção *in vitro* de embriões uma técnica completa.

Os oócitos têm uma menor permeabilidade tanto à água quanto aos agentes crioprotetores. Assim, os oócitos resfriados a baixa temperatura apresentam lesões em elementos do citoesqueleto, grânulos corticais e membrana plasmática (AMAN; PARKS, 1994). O rompimento nos grânulos corticais e membrana plasmática provavelmente conduzem a baixa taxa de fecundação e morte celular, respectivamente (VINCENT; JOHNSON, 1992). Muitos problemas foram encontrados e associados com o resfriamento e criopreservação de oócitos imaturos, maturados *in vitro* ou ovulados. Como exemplo é possível citar as anormalidades no fuso meiótico anormal, com desorganização dos microtúbulos e cromossomos (ROJAS et al., 2004; SUCCU et al., 2007), alteração na distribuição dos grânulos corticais e aumento da poliespermia (MAVRIDES; MORROL, 2005; MORATO et al., 2008). A criopreservação de oócitos em fase de vesícula germinativa ou em metáfase II, utilizando métodos de resfriamento lento, tem resultado em baixa sobrevivência.

O processo de vitrificação de oócitos vem sendo intensamente estudado e tem se tornado o método de eleição para conservação de oócitos bovinos, mesmo com os resultados ainda incipientes. Várias técnicas de vitrificação vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de evitar as crioinjúrias, aumentando as taxas de resfriamento e aquecimento. Além disso, a aplicação de crioprotetores menos tóxicos, bem como a combinação de dois ou três crioprotetores têm sido utilizadas (MORATO et al., 2008).

Vários estudos vêm apostando nas abordagens de vitrificação com rápidas velocidades de resfriamento. A aceleração da velocidade de diminuição das temperaturas pode reduzir as crioinjúrias, permitindo o uso de uma menor concentração de crioprotetores e diminuindo o tempo de exposição da célula ao crioprotetor. A utilização de pequenos volumes de solução de vitrificação permite um resfriamento mais rápido e a redução de fraturas celulares (ARAV et al., 2002).

Criopreservação de células somáticas

A criopreservação de células somáticas parece ser uma metodologia viável para vários tipos celulares. O procedimento prático de criopreservação de fibroblastos tem sido realizado pela adição de 5% a 10% de crioprotetor, tais como glicerol ou dimetilsulfóxido (DMSO) nas células em suspensão em meio de cultura, alocadas em pequenos tubos com poucos mL e em seguida depositado a -80 °C em freezer. Apesar de empírico, este simples procedimento ainda é efetivo. Com esse procedimento, a taxa de resfriamento não pode ser controlada, porém para fibroblastos bovinos essa metodologia tem sido suficiente.

Inseminação artificial

A técnica de Inseminação Artificial (IA) é, por definição, a deposição mecânica do sêmen no aparelho genital feminino por meio de instrumentos especialmente desenvolvidos para este propósito. Atualmente, a IA é considerada a biotecnologia de reprodução assistida que causa o maior impacto em programas de melhoramento animal, como resultado da sua eficiente forma de dispersão de genes de animais de superior mérito genético.

Existem relatos de uso da inseminação artificial em equinos pelo povo Árabe ainda no século XIV. No entanto, o primeiro relato científico de uso da IA ocorreu em 1784, quando o italiano Lazaro Spallanzani obteve sucesso após inseminar artificialmente cadelas. Em bovinos, o primeiro nascimento de animais frutos de IA foi reportado em 1938 (PELI, 1938). A técnica de IA iniciou sua difusão para uso comercial a partir dos avanços em procedimentos de manipulação do sêmen e, principalmente, após a demonstração de que espermatozóides poderiam ser conservados a baixas temperaturas por longos períodos pelos pesquisadores Polge, Smith e Parker, em 1949.

No Brasil, o uso comercial da IA teve início na década de 1970 do século passado, e atualmente comercializam-se mais de 8,2 milhões de doses de sêmen no País, com uma evolução de 210,66%, quando comparados dados dos anos de 1989 e 2008 (ASBIA, 2008). Estatísticas mundiais indicaram que mais de 232 milhões de doses de sêmen congelado foram produzidas por ano em todo o mundo no início da atual década (THIBIER; WAGNER, 2000). Contudo, uma baixa porcentagem de matrizes do rebanho brasileiro é inseminada artificialmente (cerca de 5% a 6%), o que coloca em evidência a necessidade de melhor divulgação e difusão da técnica de IA para ser usada na grande parte do rebanho ainda sob regimes de monta natural.

O sucesso de um programa de IA resulta de cinco fatores básicos: eficiência de detecção de cios; habilidade do inseminador (mão de obra treinada); correta aplicação da técnica; fertilidade do sêmen; e fertilidade da fêmea. Nesse sentido, é importante a observância de todos os detalhes inerentes à correta aplicação da técnica, visto que a baixa eficiência em um destes cinco fatores básicos poderá implicar em resultados insatisfatórios.

Vantagens da inseminação artificial

As principais vantagens da técnica de Inseminação Artificial são de caráter zootécnico, econômico e científico. Vantagens de ordem zootécnica referem-se ao melhoramento genético que pode ser alcançado por meio da disseminação de sêmen de animais superiores para produção de leite ou de carne; a eficiência do ganho genético pelo uso de touros provados com base na sua progênie; a preservação de mate-

rial genético raro que poderá ser utilizado no futuro; a diminuição da movimentação de animais entre fazendas, diminuindo assim a disseminação de doenças; e também ao pacote de melhorias na escrituração zootécnica de uma propriedade quando a inseminação artificial é implantada (anotações de cios, acasalamentos, partos ocorridos, etc...).

Já vantagens de ordem econômica são resultantes da rapidez no melhoramento genético do rebanho, o que resulta em ganhos de produtividade em um reduzido período de tempo; do melhor custo-benefício da compra de sêmen e manutenção do botijão em relação à compra e manutenção de touros; do uso de reprodutores de alto padrão genético, que se tornaria economicamente inviável em muitas fazendas devido ao preço do reprodutor, ao passo que, a compra de doses de sêmen deste mesmo animal pode ser economicamente viável.

A terceira classe de vantagens, a científica, se justifica se considerarmos que a inseminação artificial é a base para a aplicação de outras biotécnicas de reprodução assistida, dentre as quais se destacam a transferência de embriões e a fecundação *in vitro*. A inseminação artificial foi a primeira biotecnologia a ser aplicada em larga escala, e por isso serve de base para o desenvolvimento tecnológico futuro.

Observação de cios e horário de inseminação

Considerando que a Inseminação Artificial irá substituir o uso de touros em monta natural no rebanho, deve-se estar atento à eficiência de detecção de estro (cio). Estudos que correlacionaram número, horário e duração de observações de estro com a eficiência de detecção indicaram que maiores taxas de detecção de estro são obtidas quando são realizadas cinco observações diárias, com trinta minutos de duração cada (VAN VLIET; VAN EERDENBURG, 1996). No entanto, por questões operacionais, atualmente recomenda-se no mínimo duas observações diárias de 30 a 40 minutos cada.

O sinal principal ou primário de estro é o aceite a monta. A fêmea bovina em cio permanece imóvel quando recebe monta do macho ou de suas companheiras de rebanho. Para facilitar a identificação da proximidade desse momento (o aceite a monta), existem alguns sinais secundários que devem ser observados. Entre esses se destacam: montar em outras fêmeas, inquietação, nervosismo, mugido fre-

quente, movimentar-se acima do normal, afastamento do rebanho, vulva edemaciada (inchada), presença de muco saindo pela vulva, cauda erguida, posição de lordose, urinar com frequência, descansar o queixo sobre a região lombar das companheiras, posição de luta (cabeça-a-cabeça com outras fêmeas). Todos esses fatores irão ajudar o observador a identificar que animais estão próximos ao cio, ou seja, próximos do aceite a monta.

Além da correta observação e identificação dos sinais apresentados pela fêmea em estro, técnicas auxiliares de detecção de cio podem ser empregadas pelo profissional inseminador. Rufiões, que são machos não castrados, com libido normal, submetidos a cirurgias de desvio lateral/aderência peniana ou fêmeas androgenizadas, podem ser usados como uma ferramenta importante para o aumento da eficiência de detecção de estro. Uma ferramenta adicional ao uso de rufiões é o uso de buçal marcador, que é um dispositivo colocado na região da mandíbula do rufião que irá marcar com tinta as fêmeas que eventualmente sofrerem montas pelo macho rufião. O uso de buçal marcador representa grande importância principalmente na diminuição de perdas de cios curtos e (ou) noturnos. Com o avanço das tecnologias, dispositivos eletrônicos também têm sido aplicados no auxílio à detecção de cios. Esses dispositivos identificam principalmente a inquietação de animais que se movimentam acima do normal. Uma terceira técnica auxiliar para identificação de cios seria a sincronização do estro em um grupo de animais. Embora os esforços de observação e identificação de cios ainda sejam necessários quando há a sincronização, a presença de um maior número de fêmeas em estro facilita a observação e a manifestação do estro devido à maior interação entre os animais em cio.

Após a correta detecção de cio, faz-se necessária a inseminação artificial em momento apropriado. O horário de inseminação é definido levando-se em conta os seguintes aspectos: (1) o momento da ovulação após o início do cio (24 a 30 horas): (2) o tempo de sobrevivência do oócito antes que comece a sofrer degeneração (6 a 8 horas); (3) a necessidade de um período de tempo para que haja a capacitação de espermatozóides, afim de que se tornem aptos à fecundação após a IA (6 a 12 horas); e (4) o tempo de sobrevivência dos espermatozóides no

interior do trato genital feminino (cerca de 24 horas) (HAFEZ, 1995). Considerados todos esses fatores, a IA deve ser realizada próximo ao final do estro (cerca de 12 horas após aceitar a monta pela primeira vez; Figura 1). De modo geral, recomenda-se a utilização da regra "am-pm", na qual, animais observados em cio na parte da manhã são inseminados no final da tarde do mesmo dia, e animais observados em cio na parte da tarde são inseminados no início da manhã do dia seguinte (TRIMBERGER, 1948). Esse método tem sido utilizado com sucesso por várias décadas, o que não impede adaptações do método ao manejo da fazenda em casos específicos.

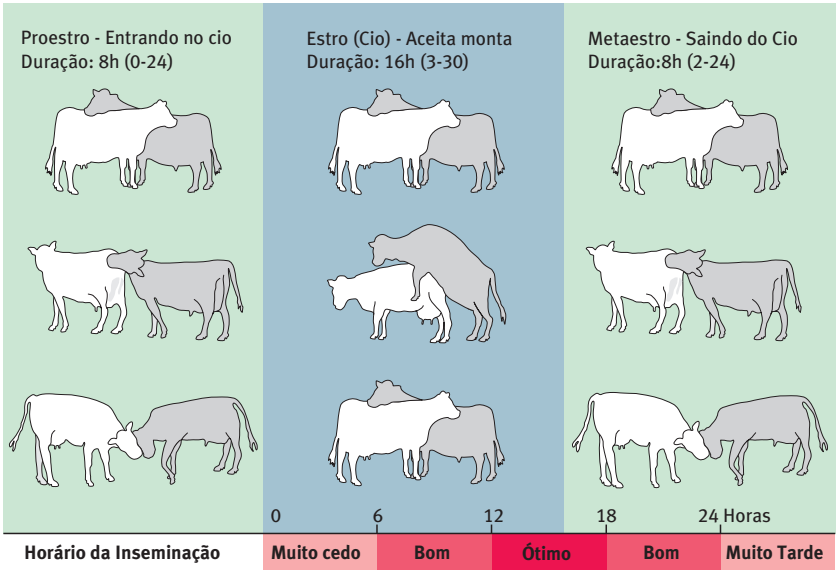


Figura 1. Ilustração dos sinais que auxiliam a detecção de cio durante três fases do ciclo estral bovino (proestro, estro e metaestro); duração média (mín. e máx.) de cada fase; e indicadores do melhor horário para se realizar a Inseminação Artificial.

Fonte: Adaptado de Wattiaux, 2009.

A técnica de IA propriamente dita

A técnica de inseminação artificial em bovinos é relativamente simples de ser executada, o que não diminui a importância de treinamento adequado do profissional responsável. O inseminador é o maior responsável pelo resultado da IA (gestações), visto que está envolvido na maioria das etapas do processo. Um inseminador eficiente é um profissional muito bem treinado e submetido a constantes cursos de reciclagem e capacitação, dedicado, comprometido com os resultados, e necessariamente interessado e motivado pelo serviço que está desempenhando.

A inseminação artificial propriamente dita inicia-se após a detecção de uma fêmea em estro e da definição do momento adequado a inseminá-la. Inicialmente, deve-se avaliar o histórico reprodutivo da fêmea e atentar para o número de dias pós-parto (não inseminar antes de 45 dias pós-parto); número de inseminações anteriores (avaliar se houve excesso de repetições de cio); e verificar se não há gestação confirmada para a matriz (possibilidade de cio falso/cio do encabelamento). O passo seguinte é fazer a retirada de fezes do reto e higienização da região perineal do animal (ao redor do reto e vulva). No momento da retirada de fezes, deve-se observar a característica do muco saindo pela vulva, que deve ter aparência transparente, cristalina. A higienização consiste em lavagem com água abundante para a limpeza de toda a área externa à vulva, seguida de secagem com papel toalha ou um pano limpo.

Terminada a limpeza, o inseminador deve proceder à preparação do material e descongelação do sêmen. Para isso, deve-se aquecer água limpa até que atinja a temperatura de 35 ºC a 37 ºC. A temperatura da água para descongelação do sêmen é de extrema importância para minimizar a morte e lesões de espermatozóides durante o processo de descongelação (Figura 2). Para descongelação, abre-se o botijão de nitrogênio líquido e retira-se uma palheta de sêmen com o auxílio de uma pinça de dissecção. A palheta deve ser imersa em água morna (35 ºC a 37 ºC) por um tempo mínimo de 30 a 50 segundos. A palheta de sêmen deve ser retirada da água e seca com o auxílio de papel toalha, antes que se prossiga a montagem do aplicador de IA. Com o aplicador montado, o inseminador irá introduzir o aplicador na vulva da

fêmea a ser inseminada. Neste momento, é importante a ajuda de uma segunda pessoa, que irá auxiliar na abertura da vulva para que o aplicador não toque o seu exterior. O momento entre a retirada da palheta de sêmen da água morna e a introdução do aplicador pela vulva da fêmea é de extrema importância e deve ser realizado o mais rápido possível. É importante que o sêmen não passe por grandes variações de temperatura, portanto quanto antes o aplicador for colocado no interior da vulva, a uma temperatura constante, melhor. O inseminador então irá segurar o aplicador de IA com uma das mãos e introduzir a outra mão no reto da vaca, manipulando cuidadosamente a cérvix até atingir o início do corpo uterino. O local de deposição do sêmen se localiza 1 cm a 3 cm após o último anel cervical, ou seja, no terço inicial do corpo do útero. O sêmen deve ser lentamente depositado nesse local, o que irá permitir a disponibilidade de espermatozóides para a fecundação em ambos os cornos/tubas uterinas. Encerra-se a técnica de IA com a retirada do aplicador e uma leve massagem no clitóris do animal.

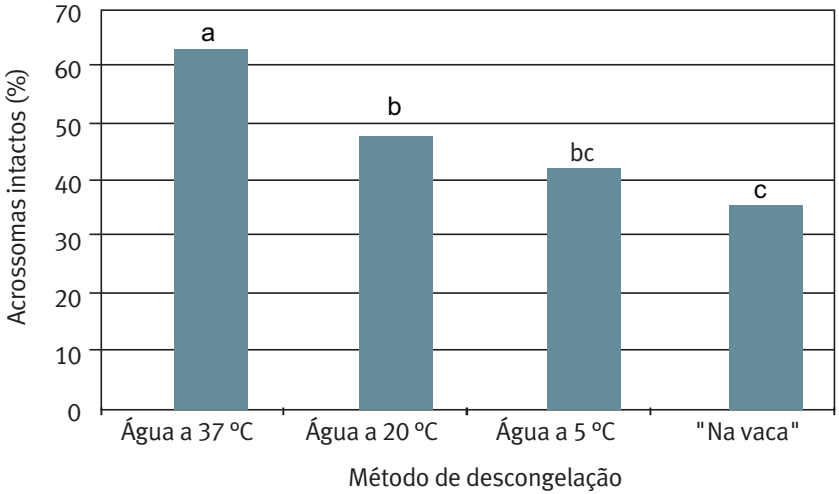


Figura 2. Efeito do método de descongelação na integridade do acrossoma de sêmen bovino criopreservado em palhetas francesas de 0,5 mL. Colunas acompanhadas de letras diferentes (a, b, c), diferiram estatisticamente ($P < 0,05$).

Fonte: Adaptado de De Jarnette et al., 2000.

Inseminação artificial em tempo fixo (IATF)

Considerando que as maiores limitações à difusão da Inseminação Artificial em fazendas são a baixa eficiência de detecção de estros (cio) e a realização da IA no momento correto (LARSON; BALL, 1992), protocolos hormonais que permitem a inseminação artificial em um momento pré-programado (tempo fixo) foram introduzidos como uma alternativa viável e eficiente para contornar esses entraves. Estudos com inseminação artificial em tempo fixo (IATF) foram realizados inicialmente por pesquisadores americanos (PURSLEY et al., 1995) e se difundiram rapidamente, chegando ao Brasil poucos anos depois (BARROS et al., 2000).

Os protocolos hormonais de IATF levam em consideração a fisiologia hormonal e dinâmica ovariana da fêmea bovina, e objetiva sincronizar os principais eventos reprodutivos que ocorrem durante o ciclo estral bovino: (1) início do desenvolvimento folicular; (2) luteólise; e (3) ovulação. O estudo das inter-relações entre os principais hormônios da reprodução (GnRH, FSH, LH, estradiol e progesterona) permitiu a aplicação direta dos conhecimentos adquiridos, e um dos exemplos de aplicações práticas é a IATF/sincronização de ovulação. Os efeitos do GnRH e do estradiol na emergência de uma nova onda folicular e na indução de ovulação; do FSH, no crescimento folicular; do LH, na ovulação; e da prostaglandina $F_2\alpha$, na regressão do corpo lúteo (luteólise) foram, e ainda são, levados em consideração no desenvolvimento de protocolos eficientes para IATF.

Os princípios básicos da IATF são: (1) induzir/sincronizar a emergência de uma nova onda de crescimento folicular pela aplicação exógena de estradiol ou GnRH (ou seus análogos); (2) induzir luteólise, interrompendo a fase luteal, por meio da aplicação de prostaglandina $F_2\alpha$; e (3) induzir a ovulação pela aplicação de GnRH, LH ou estradiol (PURSLEY et al., 1995; BARROS, 2000). A exposição à progesterona durante a fase de desenvolvimento folicular resulta em melhores taxas de gestação após o protocolo e, por essa razão, fontes de progesterona exógena (dispositivos intravaginais ou auriculares) foram incorporadas aos protocolos (MAPLETOFT et al., 2003). Uma representação esquemática dos princípios para definição de um protocolo de IATF é apresentada na Figura 3.

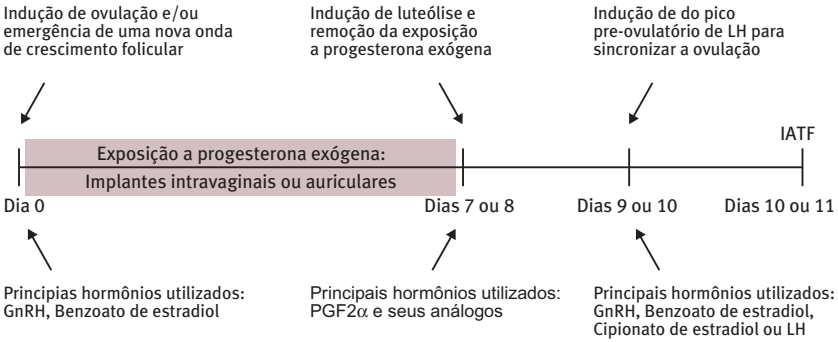


Figura 3. Representação esquemática dos princípios básicos de protocolos de sincronização de cios/ovulação para permitir Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF).

Estudos têm sido conduzidos no intuito de investigar os efeitos de alguns hormônios adicionais ao protocolo básico de IATF na indução de ciclicidade em vacas em anestro pós-parto. Os principais hormônios que têm sido adicionados ao protocolo são à base de FSH (FSH-V ou FSHp) ou hormônios que mimetizam seus efeitos (gonadotrofina coriônica equina, eCG; ERENO et al., 2007). Os objetivos são induzir o crescimento folicular com o auxílio de gonadotrofinas exógenas, a fim de que o folículo ovulatório alcance um tamanho tal que induza a onda pré-ovulatória de LH, vencendo os bloqueios a hormônios da reprodução (p.ex., o LH) típicos da fase pós-parto, resultantes, por exemplo, da amamentação de bezerros. Adequada condição corporal no pós-parto, contudo, ainda é um pré-requisito importante para que se obtenham resultados satisfatórios em termos de taxa de gestação (BÓ et al., 2003). É importante salientar que protocolos hormonais não substituem cuidados com a alimentação e um correto manejo nutricional das matrizes a serem inseminadas. Dessa forma, o uso de protocolos de IATF em animais subnutridos e (ou) com baixa condição corporal provavelmente incorrerá em resultados insatisfatórios.

Trasferência de embriões

A finalidade básica da Transferência de embriões (TE) em bovinos é a multiplicação, de forma acelerada, do material genético de uma

doadora superior. Especificamente, procura-se aumentar o número de descendentes de uma determinada fêmea, aproveitando o seu potencial genético para produção. Resumidamente, assim como a Inseminação Artificial potencializa o uso de material genético de touros superiores, a TE difunde material genético de fêmeas superiores. A transferência de embriões, assim como a IA, também se tornou um grande nicho de mercado e opera em níveis comerciais atualmente no Brasil. Além do viés comercial, a TE fornece conhecimentos básicos de desenvolvimento embrionário inicial que podem ser aplicados em outras biotecnologias da reprodução.

Datam do final do século XIX os primeiros relatos de sucesso em transferência de embriões, em coelhos (HEAPE, 1891; citado por BETTERIDGE, 2003; HASLER, 2003). Em bovinos, contudo, somente em meados do século XX (1950) foi registrado o nascimento do primeiro bezerro fruto de transferência de embriões (WILLETT et al., 1951). O uso da técnica de TE em escala comercial começou modestamente no início da década de 1970, limitada por questões práticas (coleta e transferência cirúrgicas, com a doadora sob anestesia geral). Com a introdução dos métodos de coleta e transferência não cirúrgicas e a disponibilidade de prostaglandina $F_2\alpha$ para sincronizar doadoras e receptoras, a TE se tornou mais prática e pôde ser realizada na própria fazenda, o que aumentou bastante o potencial de difusão da técnica (HASLER, 2003).

Dados atuais registram cerca de 823.160 embriões transferidos no mercado mundial de TE em bovinos (THIBIER, 2008). No cenário nacional, o Brasil é o segundo maior produtor de embriões *in vivo* fora da América do Norte e Europa e se consolidou como o maior produtor mundial de embriões *in vitro*, respondendo por quase 80% das transferências desses embriões em 2007 (THIBIER, 2008).

Entre as principais aplicações da TE, destacam-se: (1) planejamento de acasalamentos e multiplicação de animais de genótipo superior; (2) otimização de programas de seleção e melhoramento genético; (3) conservação de recursos genéticos (animais raros ou em risco de extinção); (4) controle de doenças no comércio de material genético; (5) importação e exportação de material genético a menor custo e com

menor risco sanitário; e (6) fornece a base para adoção de outras biotecnologias.

A TE em bovinos se caracteriza por três etapas principais: (1) indução da superovulação; (2) coleta, identificação e classificação dos embriões; e (3) transferência ou congelação dos embriões.

Superovulação de doadoras

A primeira etapa da TE diz respeito à seleção de doadoras. Nesse sentido, avalia-se o genótipo, o fenótipo, a progênie (quando disponível), aspectos sanitários do animal, o histórico reprodutivo e ainda é realizado um exame ginecológico completo visando a identificação de eventuais patologias ou qualquer outra condição de restrição. A superovulação de doadoras de embriões tem a finalidade de induzir o crescimento e a consequente ovulação de vários folículos em uma espécie monovulatória (bovinos). Os protocolos de superovulação (SOV) são baseados em conhecimentos da fisiologia reprodutiva dos bovinos, especificamente dinâmica do crescimento de folículos ovarianos e endocrinologia do ciclo estral. É importante que se tenha em mente alguns aspectos básicos de fisiologia da reprodução, como por exemplo, a ocorrência de, na grande maioria dos animais, duas ou três ondas de crescimento folicular durante um ciclo estral. A emergência de cada onda é precedida por uma elevação nas concentrações de FSH, o que causa o desenvolvimento de um pool de folículos pequenos (3 mm a 4 mm em diâmetro), que irão crescer simultaneamente até que se estabeleça o processo de divergência e dominância folicular. O folículo dominante passará a crescer a taxas maiores do que os chamados subordinados e exercerá um efeito negativo sobre eles, causando sua atresia. O folículo dominante se torna ovulatório, pois produz estradiol a concentrações suficientes para induzir a ovulação, caso não haja o bloqueio da progesterona produzida pelo corpo lúteo (após a ocorrência de luteólise; proestro). Havendo alta progesterona (diestro), o folículo dominante irá iniciar sua regressão (atresia), haverá uma elevação no FSH circulante e uma nova onda de crescimento folicular irá emergir (Figura 4) (GINTHER et al., 1996).

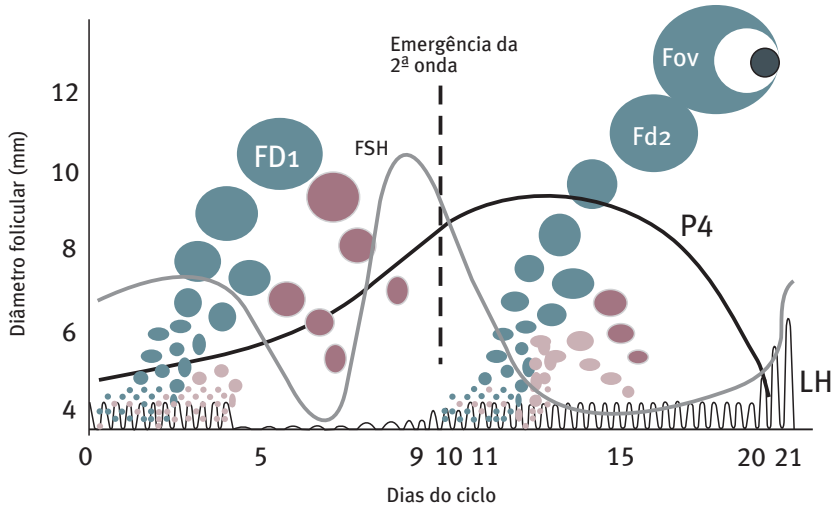


Figura 4. Representação esquemática da dinâmica folicular na vaca, em um ciclo caracterizado por duas ondas de crescimento folicular. O folículo dominante da primeira onda (FD1) cresce em ambiente com alta progesterona, o que impede a ovulação. Já o folículo dominante da segunda onda (FD2) se torna ovulatório (Fov) após a redução na concentração de progesterona causada pela lise do corpo lúteo (CL) que, em geral, se inicia após o 16º-18º dia do ciclo estral. As curvas representam concentrações plasmáticas usuais de hormônio folículo-estimulante (FSH), progesterona (P4) e hormônio luteinizante (LH).

O tratamento superovulatório deve ser iniciado no momento em que há um maior número de folículos aptos a responder ao tratamento, ou seja, um maior número de folículos pequenos (3 mm a 4 mm) em crescimento (MAPLETOFT et al., 2002). Considerando-se o ciclo estral da vaca, de maneira geral, é recomendado o início do tratamento por volta do 9º-10º dia do ciclo, que coincide com o dia de emergência da segunda onda de crescimento folicular (GINTHER et al., 1989). Neste momento, o folículo dominante da primeira onda já está afuncional e em regressão, e há um pool de folículos crescendo, aptos a responder ao tratamento. A ausência de um folículo dominante funcional durante a SOV resulta em maior número de folículos ovulatórios e maior número de embriões coletados (BUNGARTZ;

NIEMANN, 1993). Inicialmente, a superovulação era induzida por meio de tratamentos a base de gonadotrofina coriônica equina (eCG), um hormônio que possui ação folículo estimulante (MONNIAUX et al., 1983). No entanto, quando preparações a base de FSH se tornaram disponíveis comercialmente (principalmente de origem suína), esse tipo de produto passou a ser utilizado em grande número de tratamentos superovulatórios (MONNIAUX et al., 1983).

Atualmente, o protocolo básico para indução da superovulação em bovinos consiste de seis a oito aplicações de produtos a base de FSH a intervalos de 12 horas, durante três a quatro dias, em esquema de doses decrescentes, ou seja, 40% da dose total no primeiro dia; 30% no segundo dia; 20% no terceiro; e os 10% restantes no último dia de tratamento (Figura 5) (MONNIAUX et al., 1983). Dentro do protocolo, há ainda tratamentos (uma ou duas injeções) com prostaglandina $F_2\alpha$, para que se cause a lise do corpo lúteo presente e permita-se à doadora manifestar cio e ovulação. Em geral, um ou dois dias após o término da SOV, a doadora de embriões irá apresentar cio e deverá ser inseminada artificialmente (12 e 24 horas após o início do estro). Obviamente, este protocolo pode ser adaptado e (ou) modificado, mas deve-se sempre respeitar os eventos que ocorrem em níveis ovarianos e endócrinos durante o ciclo estral da vaca.

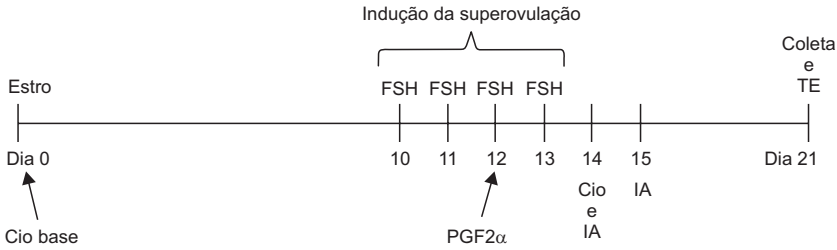


Figura 5. Ilustração do protocolo básico de indução da superovulação em bovinos, com base em observação de cio (Dia 0); estimulação com FSH exógeno a partir da emergência da segunda onda de crescimento folicular (Dia 10); indução de luteólise com prostaglandina $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$); e coleta de embriões sete dias após o estro e IA.

Sincronização de doadoras e receptoras

O resultado positivo da transferência de embriões (gestação) depende, entre outros fatores, do grau de sincronia entre doadora e receptora. O embrião recém transplantado ao útero de uma receptora precisa encontrar um ambiente fisiologicamente compatível, em termos endócrinos e de secreção, com a sua idade (sete dias) para que continue o seu desenvolvimento normal. Melhores taxas de gestação são encontradas quando há uma sincronia de ±24 horas entre o cio da doadora e da receptora (HASLER et al., 1987), sendo por isso recomendada a utilização de receptoras no D7± 1 do ciclo estral (D0 = estro), levando-se em conta que a doadora se encontra no D7.

Os métodos de sincronização de cios são bastante conhecidos e variados, podendo ser utilizados progestágenos para prolongamento da fase luteal, prostaglandina $F_2\alpha$ e seus análogos para indução de luteólise e redução da fase luteal, ou sincronização da onda de crescimento folicular pela aplicação de estradiol ou GnRH.

Há diferentes formas comerciais de progestágenos, sendo as principais os implantes auriculares e os dispositivos intravaginais. Seu uso na sincronização apresenta as vantagens de não ser dependente da fase do ciclo estral e possibilitar maior flexibilidade na programação. Desvantagens desse método incluem custo elevado e traumas (irritação vaginal ou implante auricular). Já o uso de prostaglandina $F_2\alpha$ tem baixo custo, maior praticidade e apresenta ainda a vantagem de os produtos comerciais estarem amplamente disponíveis em lojas. No entanto, a eficiência de sincronização após a aplicação de $PGF_2\alpha$ é limitada, pois a luteólise induzida só irá ocorrer durante a fase de diestro (dias 6 a 15 do ciclo estral), quando o CL tem sensibilidade ao produto. Uma segunda limitação diz respeito ao grau de sincronização dos animais, visto que há diferenças de tempo entre a aplicação de $PGF_2\alpha$ e a manifestação de estro, que pode ocorrer tão cedo quanto 48 horas e tão tarde quanto 96 horas após o tratamento. Esses distintos intervalos $PGF_2\alpha$-Estro existem em razão do estádio de desenvolvimento do folículo dominante no momento do tratamento, o qual ainda necessita de crescimento e maturação até que ocorra a ovulação (KASTELIC et al., 1990).

Atualmente, assim como na inseminação artificial, é possível na TE a sincronização da emergência da onda de crescimento folicular e subsequente indução da ovulação, permitindo assim a indução de superovulação e coleta de embriões em momento pré-determinado (tempo fixo; SOVTF) e também a transferência de embriões em tempo fixo (TETF) para receptoras com ovulação sincronizada (BÓ et al., 2002). Os princípios de SOVTF e TETF são semelhantes aos da IATF, dizendo respeito basicamente: (1) sincronização da onda folicular por indução da ovulação ou atresia do folículo dominante pela aplicação de preparações a base de estradiol ou GnRH, associados à progesterona exógena; (2) superovulação com tratamento a base de FSH (SOVTF); (3) indução da ovulação dos vários folículos ovarianos (SOVTF) ou do folículo dominante (TETF) pela aplicação de preparações a base de estradiol, GnRH ou LH; e (4) IA em tempo fixo (SOVTF) ou transferência de embriões sete dias após o estro induzido (TETF). Os protocolos de SOVTF e TETF são ferramentas bastante úteis quando há a necessidade de programação das coletas e transferências. Ainda, protocolos de TETF podem ser essenciais em locais onde há carência de mão de obra treinada para observação de cio em receptoras.

Procedimentos de coleta e transferência de embriões

Após a indução da superovulação e inseminação artificial da doadora, faz-se necessário a coleta de embriões. Devido ao desenvolvimento embrionário inicial em bovinos, em geral, coleta-se os embriões entre seis e oito dias após o estro (Dias 6, 7 e 8 do ciclo estral) quando os embriões já se deslocaram das tubas uterinas em direção ao lúmen uterino e se encontram na fase de mórula ou blastocisto (SENGER, 2005). A programação da coleta inicia-se com a escolha e organização do material de coleta. Nesse momento é importante a existência de uma listagem de todo o material necessário (*check list*), principalmente se a coleta for feita na fazenda. Com o material organizado e separado, inicia-se a preparação da doadora (o que inclui a retirada de fezes do reto, limpeza e higienização da região perineal e anestesia epidural – em animais bravios, pode ser necessária uma leve sedação para tranquilizar o animal), que, depois de higienizada e anestesiada, segue para a coleta em si.

O processo de coleta é iniciado com a passagem de um cateter de Foley pela cérvix e posicionamento no corpo do útero ou na entrada de um dos cornos. Em seguida, um pequeno balão é inflado na extremidade do cateter para que não haja retorno de líquido e inicia-se a lavagem dos cornos uterinos (*flushing*) com meio apropriado (solução salino-fosfato tamponada, PBS), utilizando-se um circuito de coleta em forma de Y para que haja entrada e o retorno da solução. O conteúdo do lavado uterino é direcionado diretamente para um filtro coletor de embriões, que irá filtrar o excesso de líquido e não permitir a passagem de possíveis embriões. Ao final da coleta, o filtro, contendo pequena quantidade de líquido e as prováveis estruturas embrionárias coletadas, é levado ao laboratório, lavado com solução PBS, e o seu conteúdo colocado em placas de Petri para rastreamento, identificação e manipulação dos embriões recuperados. Os embriões são então classificados por grau de qualidade (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1998), transferidos para meio de manutenção ("holding"). Nesse momento decide-se quanto à transferência ou criopreservação dos embriões coletados. No caso de criopreservação, os embriões são transferidos para placas de Petri contendo uma solução crioprotetora (por exemplo, etilenoglicol ou glicerol), envasados em palhetas de 0,25 mL, e é então iniciado o processo de congelação. No caso de transferência a fresco, os embriões em meio de manutenção são envasados diretamente para palhetas de 0,25 mL para que possam ser transferidos para receptoras.

A próxima etapa inclui a seleção de receptoras e a transferência de embriões propriamente dita. A seleção de receptoras é uma etapa extremamente importante no processo de TE, pois influencia diretamente os resultados em termos de taxa de gestação (STROUD; HASLER, 2006). Receptoras de embrião devem estar sob excelente manejo nutricional (bom escore de condição corporal), sanitário (livre de doenças) e reprodutivo (ausência de patologias), ou seja, devem ser manejadas com a mesma atenção oferecida às doadoras (STROUD; HASLER, 2006). A condição *sine qua non* para uma receptora ser considerada apta a receber um embrião é estar em sincronia com o ciclo estral da doadora (Dia 7±1) e apresentar um corpo lúteo (CL) funcional no momento da transferência (JONES; LAMB, 2008). Nesse con-

texto, além da avaliação visual da aparência externa do animal, se faz necessário um exame do aparelho reprodutivo (útero e ovários) com o intuito de identificar a existência de qualquer anormalidade uterina (p. ex. infecção) e também identificar e localizar o corpo lúteo (ovário direito ou esquerdo). O uso de ultra-sonografia na seleção de receptoras pode ser encarado como uma ferramenta adicional para auxiliar a tomada de decisão, mas não é condição essencial. Alguns estudos indicaram que, desde que a receptora tenha apresentado estro em sincronia com a doadora e apresente um corpo lúteo palpável no Dia 7, ela está apta a receber um embrião, independente da qualidade ultrassonográfica do CL e de concentrações plasmáticas de progesterona (SPELL et al., 2001).

A transferência dos embriões para receptoras aptas pode ser feita pelo método cirúrgico ou não cirúrgico, o mais utilizado. O método não cirúrgico é realizado sob leve anestesia epidural, por via transcervical, com o auxílio de um aplicador de TE (inovulador). O embrião deve ser transferido no terço final do corno uterino ipsilateral ao ovário contendo o corpo lúteo. O diagnóstico de gestação pode ser feito precocemente (aos 28-30 dias de gestação; i.e., 21-23 dias após a TE) por meio de ultrassonografia ou por palpação retal após os 45 dias de gestação.

Realidades e limitações da TE

Dados mundiais de coletas de embriões indicam um número médio de embriões viáveis por coleta de 6,22; considerando dados de 122 mil coletas. Analisando-se os dados dos diferentes continentes, a variação é de 5,1 a 7,6 embriões viáveis/coleta (THIBIER, 2008). Esses dados representam uma das grandes limitações da TE, pois a média não reflete a realidade, em que são observadas respostas excelentes (25-30 embriões viáveis) e respostas sofríveis (nenhum embrião coletado). Essa grande variação na resposta pode ser explicada por alguns fatores: (1) diferenças no tratamento superovulatório (preparação hormonal, duração e momento do tratamento); (2) fatores inerentes ao animal doador (variação individual na reserva de folículos ovarianos e, consequentemente, na população de folículos disponíveis para recrutamento; o status ovariano no início do tratamento; e resposta ao FSH

exógeno); (3) fatores inerentes ao ambiente e história do animal (condição nutricional, histórico reprodutivo, repetidas superovulações, idade e raça); e (4) erros no procedimento de coleta e preparação das doadoras (MAPLETOFT et al., 2002).

Apesar dos grandes avanços em tecnologia, a média de embriões viáveis/coleta pouco variou nas últimas décadas, como demonstrado por um estudo com 1.733 doadoras, que foram coletadas nos anos de 1979 ou 1999 (HASLER, 2003). Em um programa de TE, aproximadamente 1/3 (25% a 35%) das doadoras não responderão ao tratamento (sem produção de embriões); 50% a 60% terão respostas ruins ou intermediárias; e apenas um número reduzido de doadoras terá respostas acima da média, ou seja, boas ou excelentes. Ainda, cerca de 30% das doadoras produzirão a maioria (~70%) dos embriões (DONALDSON, 1984; MAPLETOFT et al., 2002).

Quando se inicia um programa de transferência de embriões, seja ele de caráter comercial ou não, deve-se ter em mente que para o sucesso da manipulação hormonal do crescimento de folículos ovarianos é necessário um bom conhecimento da fisiologia reprodutiva e endocrinologia da fêmea bovina. Além disso, é importante saber que a técnica de TE apresenta limitações inerentes à fisiologia das doadoras (variação individual) e que a técnica é caracterizada por grande variância nos resultados. Embora um grande progresso tenha sido feito em fisiologia da reprodução dos bovinos, fatores inerentes à doadora que afetam a resposta superovulatória são apenas parcialmente entendidos.

Produção in vitro de embriões

A inseminação artificial (IA) em bovinos foi o primeiro passo para acelerar a transferência de características desejáveis, permitindo a disseminação de genes de machos considerados superiores e a melhoria do nível zootécnico dos rebanhos. Um reprodutor bovino pode produzir milhares de bezerros durante sua vida produtiva pela IA, enquanto que no mesmo período, uma fêmea não é capaz de produzir mais do que 8 a 10 bezerros. Portanto, o possível ganho genético obtido pela linhagem materna era extremamente limitado. Com o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida em animais, ocorreu um

grande avanço na otimização e multiplicação de fêmeas de interesse não só para a produção animal, mas também para a conservação e regeneração de espécies animais em perigo de extinção.

A transferência de embriões (TE) proporciona um melhor aproveitamento de matrizes de elevado mérito genético, podendo aumentar, em média, 10 vezes o número de crias/ano. Com o advento da produção *in vitro* de embriões (PIV) esse potencial de multiplicação se torna ainda maior, pois aumenta consideravelmente, o número de produtos/vaca/ano. Além disso, essa técnica também abre a possibilidade de utilizar bezerras pré-púberes, vacas em início de gestação, vacas com subfertilidade adquirida e vacas senis.

Embriões produzidos *in vitro* são aqueles produzidos pela manipulação de gametas, fora de organismo materno. Essa técnica, inicialmente, se resumia a fecundação *in vitro* (FIV), entretanto, após o nascimento do primeiro bezerro em 1981 (BRACKETT et al., 1982), avanços consideráveis foram obtidos. Atualmente, essa tecnologia se refere à combinação de vários processos interdependentes, que vão desde a obtenção dos oócitos imaturos à transferência dos embriões para as fêmeas receptoras que levarão a gestação a termo.

Obtenção de oócitos imaturos para PIV

Oócitos bovinos imaturos juntamente com as células do *cumulus* que o rodeiam, complexo *cumulus*-oócito (COC), podem ser recuperados dos ovários *in vitro* – quando se utiliza ovários provenientes de abatedouros ou de animais mortos – e in vivo, que pode ser realizada cirurgicamente ou por ultrassonografia transvaginal (OPU).

A recuperação *in vitro* de COC pode ser realizada por dissecação ou fatiamento dos ovários ou aspiração dos folículos ovarianos. A dissecação permite o isolamento mecânico de folículos individualmente, sendo um processo trabalhoso e demorado. O fatiamento dos ovários proporciona um maior número de estruturas recuperadas e, é importante quando se trabalha com ovários isolados de vacas de elevado mérito genético. Nesse caso, além da punção dos folículos visíveis na superfície do ovário, é feita a dissecação desses ovários maximizando o seu aproveitamento. A aspiração é método mais eficiente

e mais utilizado, e pode ser realizada com uma seringa ou com uma agulha acoplada a uma bomba a vácuo, com a qual se aspiram todos os folículos presentes na superfície dos ovários cujas medidas variem entre 2 mm e 8 mm de diâmetro (GORDON, 2003). A quantidade e qualidade dos COCs recuperados são influenciadas por vários fatores, tais como: época do ano; estado fisiológico do animal; tamanho do folículo aspirado (DODE et al., 2001); raça e idade das doadoras.

A recuperação de COCs in vivo pode ser realizada cirurgicamente, quando animais muito jovens são utilizados, ou por OPU, em que a obtenção de oócitos é feita pela punção folicular com uma agulha acoplada a uma sonda transvaginal, de forma que, os folículos a serem puncionados são visualizados na tela do ultrassom. A aspiração dos folículos é realizada com auxílio de uma bomba a vácuo, sendo os COCs, juntamente com o líquido folicular, transportados por um sistema de cânulas ao tubo coletor. A média de oócitos obtidos também varia com a raça, a idade, o estágio fisiológica da doadora e a estratégia de punção adotada. É possível puncionar os folículos de uma doadora duas vezes por semana, uma vez por semana ou uma vez a cada duas semanas, sendo as duas últimas alternativas possíveis de dobrar os resultados mediante a estimulação hormonal (GOODHAND et al., 1999). Independente da estratégia, o resultado final esperado é de pelo menos uma gestação por semana por doadora (PEIXER et al., 1996; BOUSQUET et al., 2000).

Independente do procedimento utilizado, aspiração in vivo ou *in vitro*, os COCs coletados juntamente com o líquido folicular são depositados em um tubo estéril, que se deixa decantar por em torno de 10 minutos. Após esse período, o decantado é transferido para uma placa de Petri, em que será realizada a busca e seleção dos oócitos.

Seleção de oócitos

Após a recuperação, COCs devem ser classificados, utilizando como critério a homogeneidade e coloração do citoplasma e aparência, compactação e número de camadas de células do *cumulus*. Essa morfologia dos CCOs tem sido utilizada como método de seleção visual por ter sido correlacionada com as taxas de blastocistos. Existem vários

sistemas para avaliação da morfologia de oócitos, tais como o sistema de Stojkovic et al. (2001) descrito abaixo:

- **Qualidade 1:** Complexo cumulus oócito com citoplasma homogêneo e com granulações finas e múltiplas camadas compactas de células do cumulus.
- **Qualidade 2:** Oócito com citoplasma homogêneo com pequenas áreas mostrando pigmentações irregulares, Cumulus compacto menor do que na categoria 1 com pelo menos 5 camadas completas.
- **Qualidade 3:** Oócito com citoplasma heterogêneo/vacuolizado, a zona pelucida coberta com pelo menos 3 camadas de células do cumulus e (ou) com pequenas áreas desnudas.
- **Qualidade 4:** Citoplasma heterogeneamente pigmentado e o cumulus completamente/parcialmente ausente ou expandido.

Maturação *in vitro* de oócitos

Durante a ovogênese, os oócitos de mamíferos permanecem retidos no estágio de diplóteno da prófase da primeira divisão meiótica, desde a vida fetal até pouco antes da ovulação. A retomada da meiose pode ser mediada por um estímulo hormonal in vivo, ou pela retirada do oócito de dentro do folículo (WASSARMAN; ALBERTINI, 1994). Portanto, quando os oócitos são aspirados dos folículos ovarianos (normalmente entre 2 mm a 6 mm de diâmetro) para serem utilizados na PIV, eles ainda são imaturos e necessitam sofrer o processo de maturação *in vitro* (MIV), que é realizada cultivando os oócitos, logo após a aspiração do folículo e seleção dos COCs, em meio de maturação, com temperatura e atmosfera apropriada, por um período de 22 a 24 horas.

A maturação envolve mudanças nucleares e citoplasmáticas que devem ocorrer simultaneamente e que conferem aos oócitos a capacidade de serem fecundados, descondensarem a cabeça do espermatozóide, formarem os pró-núcleos e terem desenvolvimento embrionário normal (DODE et al., 2000a).

Os eventos nucleares envolvem reorganização da rede de microtúbulos, rompimento do envoltório nuclear, condensação dos cromossomos e progressão para metáfase I, anáfase I, telófase I, expulsão do primeiro corpúsculo polar e retenção no estágio de metáfase II (CHA; CHIAN, 1998).

No que se refere ao citoplasma, ocorre reprogramação na síntese protéica, mudança na atividade da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e do fator promotor da maturação (MPF), desenvolvimento dos mecanismos de liberação de Ca++, e aquisição da capacidade de descondensar a cabeça do espermatozóide (SALAMONE et al., 2001). Ainda durante esse período, ocorrem mudanças na organização citoplasmática, tais como: um contínuo desenvolvimento dos estoques de lipídios;, redução do aparelho de Golgi; redistribuição de ribossomos; rearranjo das mitocôndrias; e alinhamento dos grânulos corticais próximos à membrana plasmática (DIELEMAN et al., 2002). O aumento no estoque de lipídios pode estar associado com a formação de um pool de energia essencial para o oócito suportar o desenvolvimento após a fecundação.

Outro evento que ocorre na maturação é a expansão das células do cumulus, que circundam os oócitos. Essas são células da granulosa especializadas que estão metabolicamente associadas entre si e com o oócito. No oócito imaturo, elas estão muito compactadas e durante a maturação iniciam a secreção de ácido hialurônico que se deposita entre elas, separando-as e causando a expansão dessas células.

Fecundação *in vitro*

Para a fecundação *in vitro*, espermatozóides e oócitos maturos são co-incubados, em um meio especifico, por um período em torno de 18 horas, sendo possível co-incubar por períodos menores sem afetar as taxas de produção de embriões (DODE et al., 2002a).

Para que a FIV ocorra com sucesso, é necessário que os oócitos tenham sofrido uma maturação completa e que os espermatozóides tenham sido adequadamente preparados.

Para a preparação do sêmen a ser utilizado na FIV, vários métodos para remover o plasma seminal e (ou) crioprotetor e melhorar as características seminais tem sido descritos. Entre eles, pode-se citar a lavagem por centrifugação; gradientes de densidade; filtragem em coluna de fibra de vidro; e migração ascendente. Os mais utilizados são gradiente de densidade utilizando *percoll*, e a migração ascendente conhecida por *swim-up*.

No *Swim-up* o sêmen é depositado no fundo de um tubo contendo meio de preparação de sêmen e deixado em repouso por aproximadamente 60 minutos. Os espermatozóides vivos migram por motilidade ascendente para a porção superior do meio, os espermatozóides mortos, diluidor e demais constituintes do sêmen permanecem no fundo do tubo. A porção superior é recuperada e utilizada para a FIV.

No gradiente de *percoll*, os espermatozóides também são selecionados pela motilidade através da passagem por diferentes gradientes. Para separação espermática se utiliza duas concentrações, que em geral são de 45% e 90%, depositadas em um tubo sendo o sêmen colocado na superfície do gradiente. Após centrifugação, o sobrenadante é retirado e o pellet é lavado e utilizado para a FIV.

Além da qualidade dos oócitos, do método utilizado para preparação do sêmen e do tempo de co-incubação, outros fatores podem afetar a taxa de fecundação, tais como: a dose inseminante; a interação touro-vaca; e a diferença entre touros na capacidade de fecundar e produzir embriões, sendo a variação individual de touros um dos principais fatores que interferem produção comercial de embriões PIV.

Cultivo de embriões produzidos *in vitro*

Após a fecundação *in vitro*, os embriões são transferidos para o cultivo embrionário onde permanecem por um período de sete dias, até atingirem o estágio de blastocisto, quando então podem ser transferido para o útero de fêmeas receptoras que levarão a gestação a termo.

O cultivo *in vitro* de embriões requer um sistema que suporte o desenvolvimento embrionário. Vários sistemas de cultivo foram desenvolvidos e utilizados. Esses sistemas incluem o cultivo em oviduto de hospedeiro intermediário, co-cultivo com vários tipos de células somáticas e cultivo livre de células somáticas.

Cultivo in vivo em oviduto de coelhas ou ovelhas até o estágio de blastocisto foi inicialmente muito utilizado, mas caiu em desuso após o desenvolvimento dos sistemas de co-cultivo. Apesar de esse método requerer procedimento cirúrgico e ser oneroso, ainda é utilizado por alguns grupos de pesquisa (LONERGAN et al., 2006; GALLI et al., 2003).

O co-cultivo com células somáticas tornou possível o cultivo totalmente *in vitro* de embriões PIV. Sendo que vários tipos de células somáticas tais como da granulosa, epiteliais de oviduto, uterinas e células de linhagem estabelecidas para cultivo como células VERO e células BRL (*Buffalo rat Liver Cells*) podem ser utilizadas.

Entretanto, com o desenvolvimento do meio SOF, que foi criado baseado na constituição do fluido do oviduto de bovinos, foi eliminada a necessidade de co-cultivo (WATSON, 2000). Esse meio, contudo, requer uma atmosfera de 5% de 0_2, a qual difere da utilizada para a MIV e FIV. Estudos têm demonstrado que o meio SOF também pode ser utilizado com alta tensão de O2 sem afetar o desenvolvimento embrionário, desde que as células do cumulus remanescentes no zigoto após a FIV sejam mantidas (CORRÊA et al., 2008).

Diferença entre os embriões *in vivo* e *in vitro*

Embriões produzidos *in vitro* e os produzidos in vivo diferem em várias características, tais como: aspectos morfológicos e metabólicos; alterações cromossômicas; número de células; e expressão de RNAm específicos, assim como, uma maior sensibilidade a criopreservação (VAN SOOM et al. 1996; VIUFF et al., 1999; BERTOLINI et al., 2002). Essas diferenças, possivelmente determinam o começo de uma série de problemas que levam uma redução na eficiência da técnica (FARIN et al., 2001).

Os embriões PIV apresentam maior vacuolização, menor número de células, menor densidade de mitocôndrias, maior densidade de lipídios (CROSIER et al., 2001) e junções incompletas entre as células do botão embrionário e trofoblasto (FARIN et al., 2001). Em estudos utilizando a técnica de FISH para avaliar poliploidias, foi determinado que 72% dos embriões produzidos *in vitro* eram mixoplóides e que – apesar de a mixopolidia ocorrer também em embriões in vivo – nos *in vitro*, ocorre com maior frequência e em estágios mais precoces de desenvolvimento (VIUFF et al., 1999).

Na PIV cerca de 30% a 50% dos oócitos inseminados chegam ao estágio de blastocisto e os índices de gestação estão em torno de 40% (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, 2006). As maiores perdas no desenvolvimento embrionário ocorrem nos estágios de 8 para 16 células (ativação do genoma do embrião) e pós-transferência, em torno dos dias 14 e 15 da gestação.

Aplicações da PIV

A utilização comercial dessa técnica ainda está limitada ao custo, e vai depender do balanço entre o mérito genético do produto (bezerro) e o custo de sua produção. Entretanto, apesar do custo ainda ser alto, a PIV está sendo gradualmente integrada a programas de melhoramento genético, como uma ferramenta complementar para multiplicação animal.

Em termos práticos, o potencial da PIV fica mais evidente quando se discute suas diferentes aplicações. À medida que o sistema PIV melhora, novas alternativas surgem como a criopreservação do oócito e do embrião para formação de bancos de germoplasma comercial ou para preservação de espécies. No entanto, os maiores impactos da PIV para a produção animal são: expansão genética rápida pelo aumento do número de produtos provenientes de fêmeas geneticamente superiores; produção de embriões de vacas com subfertilidade adquirida, vacas em início de gestação e vacas senis, bem como, bezerras pré-púberes; possibilidade de se estabelecer "fábricas" de embriões com grau de sangue definido segundo o ecossistema e sistema de produção; e sua aplicação associada à sexagem de espermatozóides produzindo várias gestações com apenas uma dose inseminante sexada.

Considerações sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos

Apesar dos avanços observados nessa área nos últimos anos, vários aspectos precisam ser ainda esclarecidos. As questões estão associadas à avaliação da competência biológica dos gametas e ao próprio sistema de cultivo. Estudos básicos sobre os diversos mecanismos envolvidos estão sendo conduzidos a nível mundial. Os resultados desses estudos esclarecerão os aspectos relativos à maior susceptibilidade dos embriões PIV à criopreservação, a menor viabilidade dos oócitos de bezerras quando comparados aos de vacas e as baixas taxas de prenhez devido à menor qualidade desses embriões.

É importante salientar que, por se tratar de uma técnica relativamente nova, o monitoramento rigoroso das doadoras de oócitos, dos oócitos, dos embriões e dos produtos nascidos é de fundamental importância para que essa técnica possa ser utilizada com segurança, de forma adequada e nas situações mais indicadas.

Transferência nuclear (clonagem animal)

A transferência nuclear ou clonagem com célula somática é uma técnica em que o núcleo (DNA) da célula é transferido para dentro de um oócito em fase de metáfase II, com o objetivo de gerar um novo indivíduo, geneticamente idêntico ao animal doador da célula somática (TIAN et al., 2003)(Figura 6).

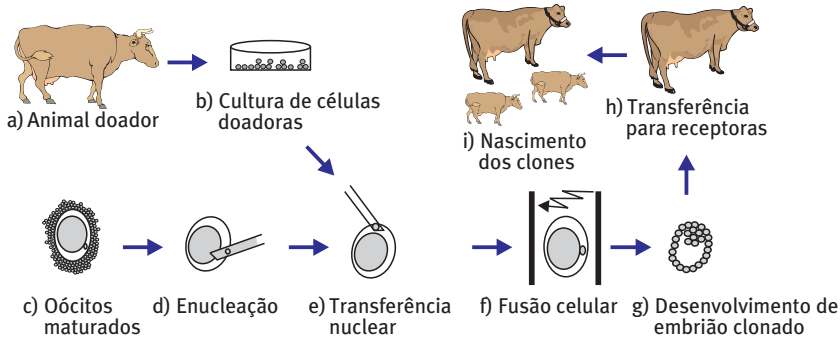


Figura 6. Representação esquemática do processo de transferência nuclear. As células são coletadas do animal doador (a) e cultivadas *in vitro* (b). Um oócito maturado em metáfase II (c) é então tem seu núcleo retirado (enucleado) (d) e a célula somática do animal doador é transferida para o interior do oócito enucleado (e). A célula somática e o oócito são fusionados (f) e os embriões se desenvolvem *in vitro* até a fase de blastocisto (g). Os blastocistos podem então ser transferidos para uma fêmea receptora e os animais clonados nascem após completarem o período de gestação (i).

Fonte: Adaptado de Tian et al. (2003).

O procedimento de transferência nuclear tem demonstrado que genes inativados durante a diferenciação tecidual podem ser completamente reativados pelo processo de reprogramação nuclear. Esse evento se resume na reversão da diferenciação celular, fazendo que a célula adquira novamente a condição de totipotência. A transferência nuclear com célula somática pode ser utilizada para gerar múltiplas cópias de animais geneticamente superiores; para produzir animais transgênicos; para produzirem proteínas de utilidade farmacêuticas ou para genotransplantes (STICE et al., 1998; POLEJAEVA; CAMPBELL, 2000); ou para preservar espécies em extinção.

Em geral, o primeiro passo do processo de clonagem envolve a coleta das células somáticas do animal a ser clonado. A escolha da célula somática para o uso na transferência nuclear varia grandemente (EDWARDS et al., 2003). Tem sido utilizadas células somáticas doadoras provenientes de vários tecidos e de animais de várias idades (fetos, recém nascidos, jovens, adultos e até de animais mortos a um relativo curto período após a morte). Animais clonados vivos têm sido obtidos de aproximadamente 12 dos 200 tipos de tecidos adultos diferenciados que existem nos mamíferos. As razões para isso permanecem desconhecidas. Uma leve suposição existente é que os tecidos de animais mais jovens e tecidos com menos diferenciações seriam a melhor fonte de células doadoras, mas nenhuma evidência conclusiva suporta essa hipótese (VAJTA; GJERRIS, 2006). Após a coleta, as células somáticas podem ser utilizadas imediatamente ou após longo tempo de cultivo (KUBOTA et al., 2000). Bovinos adultos tem sido clonados utilizando células do cumulus (TANI et al., 2001); fibroblastos (HEYMAN et al., 2002); células da granulosa (PIEDRAHITA et al., 2002); células da glândula mamária (KISHI et al., 2000); células musculares (SHIGA et al., 1999); células do oviduto (GOTO et al., 1999); e células uterinas (KATO et al., 2000).

O Segundo passo, talvez o mais trabalhoso da transferência nuclear, requer a remoção do DNA materno (enucleação) de um oócito em metafase II (MII). Esse processo exige o uso de micropipetas e se inicia aproximadamente 18 horas após os oócitos terem sido depositados no meio de maturação *in vitro*. A enucleação é realizada usualmente mecanicamente pela fixação do oócito em posição apropriada com a ponta polida de uma pipeta de fixação com um vácuo suave e pela aspiração da cromatina contida em parte do oócito por meio de uma pipeta de enucleação afiada, que ultrapassa a zona pelúcida (VADJA; GJERRIS, 2006).

Para se evitar lises, os oócitos podem ser incubados em presença de um inibidor de microfilamentos (*cytochalasin* B). Essa substância relaxa o citoplasma permitindo a remoção mecânica de 5% a 15% do citoplasma do oócito contendo o DNA materno. Há várias estratégias para encontrar a cromatina no citoplasma do oócito, que devem ser realizadas com cautela para evitar danos e aumentar a eficiência do procedi-

mento (VADJA; GJERRIS, 2006). Na maioria das metodologias, o DNA pode ser visualizado pelo corante *Hoechst* e iluminação ultravioleta.

Para a clonagem de bovinos, os oócitos são geralmente obtidos de fêmeas abatidas em frigoríficos ou de animais vivos, os quais têm seus folículos aspirados com o auxílio do ultrassom (BRUGGERHOFF et al., 2002).

O próximo passo da transferência nuclear é inserção do núcleo da célula somática no interior do citoplasma do oócito, construindo uma estrutura equivalente a um embrião de uma célula. Para isso, inicialmente, uma célula somática é inserida mecanicamente no espaço perivitelino (EPV) do oócito por meio de micropipetas e, em seguida, a célula somática é integrada ao citoplasma do oócito pela aplicação de pulsos elétricos (GIBBONS et al., 2002). A célula somática no interior do EPV é alinhada entre dois eletrodos, e pulsos com uma corrente elétrica (por exemplo: 2.2 kV/cm por 40 µs) poderá produzir mais de 70% de estruturas fusionadas (EDWARDS et al., 1999). A eletrofusão é dependente do contato da célula somática com o citoplasma do oócito, em que as membranas de cada citoplasma poderão interagir após a formação de poros (FIRST; PRATHER, 1991). Dentro de poucos minutos, após a introdução da célula somática no citoplasma, ocorre a quebra da membrana nuclear e a condensação da cromatina (CAMPBELL et al., 1996).

Em muitos casos, o pulso elétrico utilizado para fusão é suficiente para ativar o embrião clonado a se desenvolver. No entanto, o método de escolha de ativação nuclear do oócito reconstruído é por combinações químicas (GIBBONS et al., 2002) que mimetizam as ações dos espermatozóides após a fecundação. Após a ativação química, os embriões reconstruídos são cultivados e começam a clivar. Nos bovinos, uma transferência não cirúrgica do embrião para o útero da fêmea receptora pode ser realizada sete dias após a ativação e o período cultivo.

Com a transferência nuclear convencional tem sido relatado o nascimento de animais vivos de 11 espécies, incluindo bovinos, suínos, ovinos e caprinos (EDWARDS et al., 2003).

Aplicações da transferência nuclear

A clonagem animal apresenta teoricamente ilimitadas aplicações na pesquisa, indústria e agricultura, apesar do baixo nível de eficiência. No entanto, esforços estão sendo empregados para aumentar a eficiência ou identificar situações em que o presente nível de eficiência possa resultar em avanços na competência (GABOR; GJERRIS, 2006).

Tem sido sugerido que as aplicações da clonagem de animais de fazenda sejam divididas em duas áreas: (a) biomédica; e (b) agropecuária (LEWIS et al., 2004).

Aplicações biomédicas

O maior potencial da clonagem de animais de fazenda parece ser para as aplicações biomédicas. Desde a década de 1980, tem sido possível modificar mamíferos geneticamente por meio da injeção de cópias de genes desejáveis no interior dos pró-núcleos no zigoto. No entanto, esse método é extremamente ineficiente, pois a maioria dos embriões injetados não se desenvolve, e menos de 1% dos animais nascidos apresenta a mudança genética desejada (GABOR; GJERRIS, 2006). Além disso, o método pode introduzir somente novos genes no genoma e estes podem causar problemas, porque o local de integração é aleatório (PATERSON et al., 2003).

Após várias tentativas, a transferência nuclear de célula somática tem se configurado na forma mais eficiente de produzir animais geneticamente modificados. Pela introdução de modificações genéticas nas células doadoras e escolha daquelas com a mudança desejada para o procedimento de clonagem, modificações genéticas mais precisas no genoma animal podem ser garantidas. Ademais, pela perspectiva econômica e aplicações biomédicas, a ineficiência da tecnologia de clonagem é um problema menor, uma vez que os animais que serão criados terão um valor comercial relativamente alto. Adicionalmente, a transferência nuclear com célula somática pode ser utilizada para uma rápida multiplicação dos animais transgênicos, os quais irão carregar as mudanças desejadas (PATERSON et al., 2003).

As duas aplicações da transferência nuclear animal que parecem ser mais realistas para os próximos anos são a criação de animais

modelos para doenças humanas e os animais biorreatores (GABOR; GJERRIS, 2006).

Modelos para doenças

Os modelos para doenças são animais preparados para expressar, genotipicamente e fenotipicamente certa doença humana. Eles podem ser utilizados tanto para o entendimento da doença, como para iniciar testes para possíveis tratamentos. No entanto, esses modelos apresentam limitações devido às diferenças fisiológicas com o humano, e também devido ao limitado tempo de vida dos animais, especialmente o camundongo (GABOR; GJERRIS, 2006). Os animais geneticamente modificados podem oferecer uma solução para esse problema. Um exemplo disso é mencionado por Paterson et al. (2003), em que a criação de uma ovelha que expressa fibrose cística é prevista. Os ovinos e especialmente os suínos são animais ideais para esse objetivo, devido às similaridades na fisiologia e no tamanho dos órgãos com os humanos. Além disso, esses animais são relativamente baratos, a reprodução e manutenção são bem estabelecidas, e o longo tempo de vida permite que as doenças se manifestem como nos humanos. Um grande número de genes candidatos está disponível para o possível estabelecimento de doenças humanas, incluindo doenças neurodegenativas (Parkinson, Alzheimer), alterações de pele (psoriase) ou outras doenças com suspeita ou com genética conhecida, tais como: diabetes *mellitus*, arteriosclerose e câncer de mama.

Biorreatores

Os Biorreatores são animais transgênicos que apresentam genes que produzem proteínas humanas inseridas no genoma animal. Essas proteínas podem ser recuperadas do animal e utilizadas no setor biomédico para fins medicinais. A maioria das pesquisas nesse campo tem sido desenvolvida para obter animais transgênicos para expressarem proteínas desejadas no leite. Potencialmente, proteínas para o tratamento de várias doenças humanas podem ser produzidas dessa forma no futuro. Proteínas tais como o fator de coagulação IX, antitrombina humana e alfa 1-antitripsina têm sido recuperadas experimentalmente de animais transgênicos e clonados. Entretanto, a

ineficiência das tecnologias e a rigorosa regulação da medicina são obstáculos para o desenvolvimento da tecnologia dos biorreatores. O risco da introdução de novas doenças nos humanos (zoonoses) pelo uso de animais tem criado a necessidade de amplos testes para esses compostos biológicos recuperados antes da comercialização. Ainda, o custo de produção total – incluindo a construção do gene, a produção do animal transgênico, a extração e purificação do produto –, deve ser comparado com as oportunidades de renda para ampliar a viabilidade comercial (LEWIS et al., 2004).

Aplicações agropecuárias

Embora os problemas técnicos e científicos sejam similares a área biomédica, as aplicações da clonagem na agropecuária têm sido altamente produtivas, por tornar eventualmente o procedimento viável com custo eficiente.

A clonagem tem sido utilizada para criar cópias de animais com alto valor genético, tais como vacas com alta produção de leite ou touros com qualidade de carne superior (PATERSON et al., 2003). Alternativamente, a clonagem pode ser utilizada para produzir cópias de animais cuja linhagem são especialmente demandadas nos programas de cruzamento, e dessa forma, evitando a necessidade de repetir vários ciclos de cruzamento. Como exemplo, clonar um touro que tem uma linhagem desejada e utilizá-lo para o cruzamento e aumentar o número de filhos; ou clonar um grande número de animais para melhorar a qualidade genética geral do rebanho (PATERSON et al., 2003).

A clonagem combinada com a modificação genética animal tem sido considerada uma melhor opção para competir com os esquemas de cruzamentos tradicionais, uma vez que características que não podem ser introduzidas de outra maneira nos animais podem, com essa associação, ser disseminadas para uma população. Nesse caso, as principais estratégias de associação entre a clonagem e modificação genética incluem o aumento da resistência de uma animal a doenças, tais como a mastite (WALL et al., 2005), touros transgênicos que produzem somente filhas fêmeas ou somente filhos machos (FABER et al., 2003), e vacas leiteiras que produzem caseína modifica e alteração na sua proporção, melhorando desta forma a qualidade no leite

(BROPHY et al., 2003). Uma outra possibilidade é gerar animais que podem produzir menos efeitos negativos ao meio ambiente. O exemplo mais conhecido desse caso é o *enviropigTM*, ou seja, um suíno que tem a capacidade de digerir o fitato das plantas e, dessa forma, liberar menos fosfato nas fezes e consequente menos poluição ambiental (KUES; NIEMANN, 2004).

Uma das preocupações na produção de animais clonados está relacionada ao possível risco a saúde humana devido ao consumo dos produtos desses animais. Porém, Takahashi e Yoshihio (2004) não encontraram diferenças biológicas entre a carne de bovinos clonados com o uso de células embrionárias e somáticas em comparação com animais não clonados. Da mesma forma, Tomé et al. (2004) não encontraram diferenças no valor nutricional do leite e da carne de produtos bovinos clonados em comparação aos não clonados. Embora, os produtos de animais clonados pareçam não apresentar riscos a saúde humana, é preciso levar em conta as limitações na metodologia e quantidade das pesquisas para confirmar a inocuidade dos produtos clonados.

Finalmente, uma das barreiras para implementação da clonagem na agropecuária é o fato de os clones não serem cópias exatas de um animal já existente, pois o DNA mitocondrial proveniente do oócito sempre representará uma pequena parte diferente no novo indivíduo. A importância desse fato ainda não está clara. Além disso, os efeitos epigenéticos influenciam também a similaridade no nível do fenótipo entre o animal original e o animal clone (VADJA; GJERRIS, 2006).

Problemas ligados ao procedimento de transferência nuclear

A maior limitação da clonagem de bovinos adultos utilizando a transferência nuclear de célula somática é a extrema ineficiência na produção de descendentes vivos. A morte de embriões e fetos clonados ocorre durante toda a prenhez. Além disso, uma alta proporção dos animais geralmente são maiores que o normal e morrem logo após o nascimento (EDWARDS et al., 2003).

Em geral, tem havido, no mínimo, cinco períodos de perdas observadas nos clones derivados de animais adultos. O primeiro, talvez o mais drástico, ocorre durante o desenvolvimento pré-implantacional. Em bovinos (WELLS et al., 1998; HILL et al., 2000; EDWARDS

et al., 2001), assim como em outras espécies, incluindo caprinos, ovinos e coelhos, mais de 65% dos embriões de uma célula falham em se desenvolver em mórula compacta ou blastocisto.

Aproximadamente 50% dos embriões clonados de bovinos estabelecem prenhez após a transferência de um único embrião em fêmeas receptoras. Entretanto, próximo dos 30 dias e continuando até 60 dias de prenhez, a morte embrionária pode ocorrer em 50 a 100% das prenhezes de clone (ausência de batimento cardíaco e destacamento das membranas fetais), caracterizando o segundo período de perdas de prenhezes (EDWARDS et al., 2003).

As perdas nas prenhezes de fetos clonados são significativamente mais altas que o esperado para animais provenientes de forma natural (HASLER, 1998). A avaliação da placenta de embriões clonados na idade entre 40 e 50 dias de gestação, revela que as placentas são hipoplásicas, parcialmente desenvolvidas, com cotilédones rudimentares, ou eventualmente normais quando comparadas com placentas derivadas de embriões de fecundação *in vitro* (HILL et al., 2000).

O terceiro período de perdas tem sido notado associado com o aumento de abortos espontâneos durante o segundo trimestre de prenhez (EDWARDS et al., 2001). Exames macroscópicos e histopatológicos dos fetos abortados tem demonstrado poucas anormalidades, porém, a placenta frequentemente se apresenta de forma anormal, com uma marcada redução dos cotilédones (menos de 20 cotilédones, quando se espera para este período 70 a 120 estruturas). As membranas fetais também se apresentam delgadas e edematosas (SCHLAFER et al., 2000).

O quarto período de perdas observadas para prenhezes de bovinos clonados ocorre durante o terceiro trimestre, entre os dias 200 a 265 de gestação. As perdas durante esse período são caracterizadas pela grande incidência de hidroalantóide e morte fetal (CHAVATTE-PALMER et al., 2002). Além disso, o hidroalantóide é acompanhado pela redução do número de placentomas, hipertrofia de cotilédones e edema de membrana intercoltiledornária (EDWARDS et al., 2003). Anasarca fetal com edema generalizado do umbigo são usualmente presentes. Dessa forma, a morte de fetos clonados ocorre primariamente devido a inadequada placentação (EDWARDS et al., 2003).

Líquido amniótico e mecônio estão geralmente presentes no pulmão de todos os fetos a termo, indicando algum grau de estresse no útero antes da morte. A maioria dos bezerros derivados de uma placenta anormal necessita de monitoramento intensivo e terapia após o nascimento para tratar toda uma infinidade de complicações. Os principais problemas encontrados são imaturidade pulmonar, hipertensão pulmonar, dificuldade respiratória, hipóxia, hipotermia, hipoglicemia, acidose metabólica, aumento de veias e artérias umbilicais (HILL et al., 2000). No entanto, a severidade das complicações pode não ser evidente por vários meses após o nascimento.

De acordo com Vadja e Gjerris (2006), as anormalidades relacionadas com a técnica de transferência nuclear podem ser causadas pelos seguintes fatores: inapropriada célula doadora ou oócito receptor; inapropriada sincronia entre a fase do ciclo celular do núcleo doador e o citoplasma receptor; inadequada reprogramação do genoma doador; inapropriada manipulação dos oócitos, células somáticas e dos embriões durante o cultivo; várias manipulações mecânicas, osmóticas, elétricas, térmicas e outros tipos de danos.

Apesar da extrema ineficiência da clonagem com células somáticas, há clones nascidos normais e saudáveis, requerendo poucos cuidados após o nascimento (LANZA et al., 2001). Pace et al. (2002) têm observado similares taxas de crescimento, desempenho reprodutivo e características lactacionais dos animais clonados em comparação com bovinos leiteiros não clonados.

O sucesso da transferência nuclear parece ser devido a uma suficiente atividade de reprogramação presente no citoplasma do oócito para mudar completamente a célula adulta, mas a natureza dos fatores envolvidos não tem sido precisamente caracterizada (ALLEGRUCCI et al., 2005).

Considerações finais

As biotécnicas de reprodução animal se encontram em várias fases de desenvolvimento. A inseminação artificial e a transferência de embrião são as tecnologias mais consolidadas, porém a fecundação *in vitro* já assume lugar de destaque no cenário nacional, especialmente para o criador da raça Nelore, pois a raça possui característica

privilegiada na produção de oócitos e consequentemente embriões *in vitro*. A produção *in vitro* de embriões é a abordagem mais nova e flexível entre todas, entretanto requer mais cuidados técnicos, uma vez que exige equipamentos e conhecimentos laboratoriais específicos, para garantir a qualidade do embrião *in vitro*. A clonagem animal por transferência nuclear de células somáticas se constitui em uma área de rápido desenvolvimento e uma técnica muito valiosa para produzir animais com genética superior, bem como cópias de animais transgênicos. No entanto, para melhorar a eficiência dessa técnica são necessários mais estudos sobre a reprogramação dos genes e sobre as alterações epigenéticas no embrião e ao longo da vida do animal clonado.

Referências

ALLEGRUCCI, C.; THURSTON, A.; LUCAS, E.; YOUNG, L. Epigenetics and the germline. **Reproduction**, v. 129, p. 137–149, 2005.

AMAN, R. R.; PARKS, J. E. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro*matured bovine oocyte. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 103–110, 1994.

ARAV, A.; YAVIN, S.; ZERON, Y.; NATAN, D.; DEKEL, I.; GACITUA, H. New trends in gamete's cryopreservation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, p. 77–81, 2002.

ASBIA, Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Relatório estatístico de produção, importação e comercialização de sêmen. 2008.

BARROS, C. M.; MOREIRA, M. B. P.; FIGUEIREDO, R. A.; TEIXEIRA, A. B.; TRINCA, L. A. Synchronization of ovulation in beef cows (Bos indicus) using GnRH, PGF2α and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 53, p. 1121-1134, 2000.

BERTOLINI, M.; BEAM, S. W.; SHIM, H.; BERTOLINI, L. R.; MOYER, A. L.; FAMULA, T. R.; ANDERSON, G. B. Growth, development, and gene expression by in vivo- and *in vitro*-produced day 7 and 16 bovine embryos. **Molecular Reproduction Development**, v. 63, p. 318-328, 2002.

BETTERIDGE, K. J. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 203–244, 2003.

BILTON, R. J.; MOORE, N. W. Factors affecting the viability offrozen stored cattle embryos. **Australian Journal of Biological Science**, v. 32, p. 101–107, 1979.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, p. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 307–326, 2003.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, p. S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRIBULO, R.; TRIBULO, H.; MAPLETOFT, R. J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 53-72, 2002.

BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L.; DONAWICK, W. J.; EVANS, J. F.; VESSEL, M. A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 147-158, 1982.

BROPHY, B.; SMOLENSKI, G.; WHEELER, T.; WELLS, D.; L'HUILLIER, P.; LAIBLE, G. Cloned transgenic cattle produc milk with higher levels of _-casein and _-casein. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 157–162, 2003.

BRUGGERHOFF, K.; ZAKHARTCHENKO, V.; WENIGERKIND, H.; REICHENBACH, H. D.; PRELLE, K.; SCHERNTHANER, W.; ALBERIO, R.; KUCHENHOFF, H.; STOJKOVIC, M.; BREM, G.; HIENDLEDER, S.; WOLF, E. Bovine somatic cell nuclear transfer using recipient oocytes recovered by ovum pick-up: effect of maternal lineage of oocyte donors. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 367–373, 2002.

BUNGARTZ, L.; NIEMANN, H. Effects of a dominant follicle on ovarian responses of dairy cows following various superovulatory treatment schedules. **Theriogenology**, v. 39, n. 1, p. 198, 1993.

BURATINI JUNIOR, J.; PRICE, C. A.; VISINTIN, J. A.; BO´, G. A. Effects of dominante follicle aspiration and treatment with recombinant somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nellore (Bos indicus) heifers. **Theriogenology**, v. 54, p. 421–431, 2000.

BOUSQUET, D., TWAGIRAMUNGU, H., DUROCHER, J. et al. Effect of LH injection before ovum pick-up on *in vitro* embryo production with oocytes collected at different intervals after the last FSH injection. **Theriogenology**, v. 53, p. 347, 2000.

CAMPBELL, K. H.; LOI, P.; OTAEGUI, p. J.; WILMUT, I. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. **Reviews of Reproduction**, v. 1, p. 40–46, 1996.

CARVALHAIS, I.; MARQUES, C. C.; BAPTISTA, M. C.; VASQUES, M. I.; HORTA, A. E. M.; PEREIRA, R. M. Effect of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) on post-thaw viability of biopsied bovine embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 334–335, 2006.

CHA, K. Y.; CHIAN, R. C. Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinical use. **Human Reproduction Update**, v. 4, p. 103-120, 1998.

CHAVATTE-PALMER, P.; HEYMAN, Y.; RICHARD, C.; MONGET, P.; LEBOURHIS, D.; KANN, G.; CHILLIARD, Y.; VIGNON, X.; RENARD, J. p. Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1596–1603, 2002.

CORRÊA, G. A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T. C.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 132-142, 2008.

CRITSER, J. K.; MOBRAATEN, L. E. Cryopreservation of murine spermatozoa. **Ilar Journal**, v. 41, p. 197-206, 2000.

CROSIER, A. E.; FARIN, p. W.; DYKSTRA, M. J.; ALEXANDER, J. E.; FARIN, C. E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1375-1385, 2001.

DE JARNETTE, J. M.; BARNES, D. A.; MARSHALL, C. E. Effects of pre- and post-thaw thermal. Insults on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. **Theriogenology**, v. 53, p. 1225-1238, 2000.

DIELEMAN, S. J.; HENDRIKSEN, p. J. M.; VIUFF, D.; THOMSEN, p. D.; HYTTEL, P.; KNIJN, H. M.; WRENZYCKI, C.; KRUIP, T. A.; NIEMANN, H.; GADELLA, B. M.; BEVERS, M. M.; VOS, p. L. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v. 57, p. 5-20, 2002.

DINNYÉS, A.; CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; MASSIP, A.; MERMILLOD, p. Survival of frozen or vitrified bovine blastocysts produced *in vitro* in synthetic oviduct fluid. **Theriogenology**, v. 46, p. 1425-1439, 1996.

DODE, M. A.; RODOVALHO, N. C.; UENO, v. G.; FERNANDES, C. E. The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of Bos indicus oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 69, p. 15-23, 2002.

DODE, M. A. N. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 115-130, 2006. Suplemento 1.

DODE, M. A. N.; RODOVALHO, N. C.; UENO, v. G.; ALVES, R. G. A. Number and morphology of oocytes obtained from ovaries of zebu cows according to follicle size, physiological status and season. **Archivos de Zootecnia**, v. 50, p. 415-418, 2001.

DODE, M. A. N.; RODOVALHO, N. C. M.; UENO, v. G.; ALVES, R. G. O. Efeito do tamanho do folículo na maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos de fêmeas zebuínas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 207-217, 2000a.
DODE, M. A. N.; ADONA, p. R.; RODOVALHO, N. C. M. Retenção da meiose de ovócitos bovinos em líquido folicular de folículos de vários tamanhos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 28, n. 1, p. 241, 2000b.

DONALDSON, L. E. Embryo production in superovulated cows: Transferable embryos correlated with total embryos. **Theriogenology**, v. 21, n. 4, p. 517-524, 1984.

EDWARDS, J. L.; DORADO, C. M.; WILSON, T. J.; SCHRICK, F. N. Development of cloned embryos reconstructed with serum fed or serum starved adult granulosa cells. **Theriogenology**, v. 55, p. 265, 2001.

EDWARDS, J. L.; POWELL, A. M.; TALBOT, N. C.; GARRETT, W. M.; PURSEL, v. G. Developmental potential of reconstructed embryos activated immediately or 4 hours after assessment of fusion with fetal fibroblasts. **Theriogenology,** v. 51, p. 202, 1999.

EDWARDS, J. L.; SCHRICK, F. N.; MCCRACKEN, M. D.; VAN AMSTEL, S. R.; HOPKINS, F. M.; WELBORN, M. G.; DAVIES, C. J. Cloning adult farm animals: a review of the possibilites and problems associated with somatic cell nuclear transfer. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 50, p. 113-123, 2003.

ERENO, R. L.; BARREIROS, T. R. R.; SENEDA, M. M.; BARUSELLI, p. S.; PEGORER, M. F.; BARROS, C. M. Taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes tratadas com progesterona associada à remoção temporária de bezerros ou aplicação de gonadotrofina coriônica equina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 5, Viçosa, MG, set./out. 2007.

FABER, D. C.; MOLINA, J. A.; OHLRICHS, C. L.; VAN DER ZWAAG, D. F.; FERNE, L. B. Commercialization of animal biotechnology. **Theriogenology**, v. 59, p. 125–138, 2003.

FARIN, P.; CROSIER, A. E.; FARIN, C. E. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, v. 55, p. 151-170, 2001.

FIRST, N. L.; PRATHER, R. S. Production of embryos by oocyte cytoplast–blastomere fusion in domestic animals. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 43, p. 245–254, 1991.

FUCHINOUE, K.; FUKUNAGA, N.; CHIBA, S.; NAKAJO, Y.; YAGI, A.; KYONO, K. Freezing of human immature oocytes using cryoloops with Taxol in the vitrification solution. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics,** v. 21, p. 307–309, 2004.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, p. 599-616, 2003.

GIBBONS, J.; ARAT, S.; RZUCIDLO, J.; MIYOSHI, K.; WALTENBURG, R.; RESPESS, D.; VENABLE, A.; STICE, S. Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 895–900, 2002.

GILMORE, J. A.; LIU, J.; WOODS, E. J.; PETER, A. T.; CRITSER, J. K. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. **Human Reproduction**, v. 15, p. 335-343, 2000.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. p. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 223-230, 1989.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, p. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1187-1194, 1996.

GOODHAND, K. L. L.; WATT, R. G.; STAINES, M. E.; HUTCHINSON, J. S.; BROADBENT, p. J. In vivo oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, v. 51, p. 951-961, 1999.

GORDON, I. (Ed.). **Laboratory Production of cattle embryos.** 2nd ed. Wallingford: CABI Publishing, 2003. 548 p.

GOTO, Y.; KANEYAMA, K.; KOBAYASHI, S.; IMAI, K.; SHIN-NOH, M.; TSUJINO, T.; NAKANO, T.; MATSUDA, S.; NAKANE, S.; KOJIMA, T. Birth of cloned calves derived from cultured oviductal epithelial cells of a dairy cow. **Animal Science Journal**, v. 70, p. 243–245, 1999.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995.

HASLER, J. F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 245–264, 2003.

HASLER, J. F. The current status of oocyte recovery, *in vitro* embryo production, and embryo transfer in domestic animals with an emphasis on the bovine. **Journal of Animal Science,** v. 76, p. 52–74, 1998.

HASLER, J. F.; MCCAULEY, A. D.; LATHROP, W. F.; FOOTE, R. H. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 27, n. 1, p. 139-168, 1987.

HEAPE, W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. **Proceedings of the Royal Society B**, B 48, p. 457–458, 1891.

HEYMAN, Y.; CHAVATTE-PALMER, P.; LEBOURHIS, D.; CAMOUS, S.; VIGNON, X.; RENARD, J. p. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 6–13, 2002.

HILL, J. R.; BURGHARDT, R. C.; JONES, K.; LONG, C. R.; LOONEY, C. R.; SHIN, T.; SPENCER, T.; THOMPSON, J. A.; WINGER, Q. A.; WESTHUSIN, M. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1787– 1794, 2000.

HOLM, P.; BOOTH, p. J.; SCHMIDT, M. H.; GRAVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo – inositol or without serum – proteins. **Theriogenology**, v. 52, p. 683-700, 1999.

HOLT, W. v. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.

JONES, A. L.; LAMB, G. C. Nutrition, synchronization, and management of beef embryo transfer recipients. **Theriogenology**, v. 69, p. 107-115, 2008.

KASAI, M.; ITO, K.; EDASHIGE, K. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. **Human Reproduction**, v. 17, p. 1863–74, 2002.

KASTELIC, J. P.; KNOPF, L.; GINTHER, O. J Effect of day of prostaglandin F2α treatment on selection and development of ovulatory follicles in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 23, p. 169, 1990.

KATKOV, I. I.; MAZUR, p. Factors affecting yield and survival of cells when suspensions are subjected to centrifugation. Influence of centrifugal acceleration, time of centrifugation, and length of the suspension column in quasi-homogeneous centrifugal fields. **Cell Biochem Biophys**, v. 31, p. 231-245, 1999.

KATO, Y.; TANI, T.; TSUNODA, Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult,newborn and fetal cows. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 120, p. 231–237, 2000.

KISHI, M.; ITAGAKI, Y.; TAKAKURA, R.; IMAMURA, M.; SUDO, T.; YOSHINARI, M.; TANIMOTO, M.; YASUE, H.; KASHIMA, N. Nuclear transfer in cattle using colostrum-derived mammary gland epithelial cells and ear–derived fibroblast cells. **Theriogenology**, v. 54, p. 675–684, 2000.

KUBOTA, C.; YAMAKUCHI, H.; TODOROKI, J.; MIZOSHITA, K.; TABARA, N.; BARBER, M.; YANG, X. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 97, p. 990–995, 2000.

KUES, W. A.; NIEMANN, H. The contribution of farm animals to human health. **Trends in Biotechnology**, v. 22, p. 286–294, 2004.

KUWAYAMA, M.; FUJIKAWA, S.; NAGAI, T. Ultrastructure of IVM-IVF bovine blastocysts vitrified after equilibration in glycerol and 1,2-propanediol using 2 step and 16-step procedures. **Cryobiology**, v. 31, p. 415–22, 1994.

KUWAYAMA, M.; VAJTA, G.; IEDA, S.; KATO, O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 11, p. 608–614, 2005.

LANZA, R. P.; CIBELLI, J. B.; FABER, D., SWEENEY, R. W.; HENDERSON, B.; NEVALA, W.; WEST, M. D.; WETTSTEIN, p. J. Cloned cattle can be healthy and normal. **Science**, v. 294, p. 1893–1894, 2001.

LARSON, L. L.; BALL, p. J. H. Regulation of estrous cycles in dairy cattle: A review. **Theriogenology**, v. 38, p. 255-267, 1992.

LEIBO, S. P.; LOSKUTOFF, N. M. Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 39, p. 81-94, 1993.

LEWIS, I. M.; FRENCH, A. J.; TECIRLIOGLU, R. T.; VAJTA, G.; MCCLINTOCK, A. E.; NICHOLAS, K. R.; ZUELKE, K. A.; HOLLAND, M. K.; TROUNSON, A. O. Commercial aspects of cloning and genetic modification in cattle. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 44, p. 1105–1111, 2004.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A. C. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 137-152, 2006.

LÓPEZ-BÉJAR, M.; LÓPEZ-GATIUS, F.; CAMÓN, J.; RUTLLANT, J.; LABÈRNIA, J. Development *in vitro* of rabbit embryos after freezing by two-step or ultra-rapid cooling methods. **Zentralbl Veterinarmed A.**, v. 41, n. 10, p. 780-790, 1994.

MAPLETOFT, R. J.; MARTÍNEZ, M. F.; COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. p. The use of controlled internal drug release devices for the regulation of bovine reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. E28–E36, 2003. E Supplement 2.

MAPLETOFT, R. J.; STEWARD, K. B.; ADAMS, G. p. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, p. 601-611, 2002.

MARQUES, C. C.; BAPTISTA, M. C.; VASQUES, M. I.; HORTA, A. E. M.; PEREIRA, R. M. Effect of polyunsaturated fatty acids (PUFA) on bovine oocyte *in vitro* maturation and subsequent embryo development and freezability. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 108–109, 2007.

MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S. p. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 1059–1069, 1996.

MAVRIDES, A.; MORROL, D. Bypassing the effect of zona pellucida changes on embryo formation following cryopreservation of bovine oocytes. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 18, p. 66–70, 2005.

MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. **Theriogenology**, v. 19, p. 55-81, 1983.

MORATO, R.; IZQUIERDO, D.; ALBARRACIN, J. L.; ANGUITA, B.; PALOMO, M. J.; JIMENEZ-MACEDO, A. R.; PARAMIO, M. T.; MOGAS, T. Effects of pre-treating *in vitro*-matured bovine oocytes with the cytoskeleton stabilizing agent taxol prior to vitrification. **Molecular Reproductio Development**, v. 75, p. 191–201, 2008.

PACE, M. M.; AUGENSTEIN, M. L.; BETTHAUSER, J. M.; CHILDS, L. A.; EILERTSEN, K. J.; ENOS, J. M.; FORSBERG, E. J.; GOLUEKE, p. J.; GRABER, D. F.; KEMPER, J. C.; KOPPANG, R. W.; LANGE, G.; LESMEISER, T. L.; MALLON, K. S.; MELL, G. D.; MISICA, p. M.; PFISTER-GENSKOW, M.; STRELCHENKO, N. S.; VOELKER, G. R.; WATT, S. R.; BISHOP, M. D. Ontogeny of cloned cattle to lactation. **Biology of Reproduction**, v. 67, v. 334–339, 2002.

PATERSON, L.; DESOUSA, P.; RITCHIE, W.; KING, T.; WILMUT, I. Application of reproductive biotechnology in animals: implications and potentials. Applications of reproductive cloning. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 137–143, 2003.

PEIXER, M. A. S.; RUMPF, R.; de BEM, A. R. et al. Produção de embriões e gestações a partir de ovócitos recuperados por ultrasonografia em fêmeas super-ovuladas. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 24, n. 1, p. 231, 1996.

PELI, I. First show of a group of calves born from artificial insemination and of cows inseminated artificially. **Nuova Veterinaria**, v. 16, p. 151-156, 1938.

PHELPS, M. J.; LIU, J.; BENSON, J. D.; WILLOUGHBY, C. E.; GILMORE, J. A.; CRITSER, J. K. Effects of Percoll separation, cryoprotective agents, and temperature on plasma membrane permeability characteristics of murine spermatozoa and their relevance to cryopreservation. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 1031-1041, 1999.

PIEDRAHITA, J. A.; WELLS, D. N.; MILLER, A. L.; OLIVER, J. E.; BERG, M. C.; PETERSON, A. J.; TERVIT, H. R. Effects of follicular size of cytoplast donor on the efficiency of cloning in cattle. **Molecular Reproduction Development**, v. 61, p. 317–326, 2002.

POLEJAEVA, I. A.; CAMPBELL, K. H. S. New advances in somatic cell nuclear transfer: Application in transgenesis. **Theriogenology**, v. 53, p. 117-126, 2000.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at lowtemperatures. **Nature**, London, v. 164, p. 166, 1949.

POLLARD, J. W.; LEIBO, p. Chilling sensitivity of mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 41, p. 107–112,1994.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using $PGF_2\alpha$ and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915-923, 1995.

ROJAS, C.; PALOMO, M. J.; ALBARRACIN, J. L.; MOGAS, T. Vitrification of immature and *in vitro* matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments. **Cryobiology**, v. 49, p. 211–220, 2004.

RUBIN, K. C. P.; PONTES, J. H. F.; NONATO JUNIOR, I.; ERENO JUNIOR, J. C.; PANSARD, H.; SENEDA, M. M. Influência do grau de sangue Nelore na produção *in vitro* de oócito. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 183, 2005. Suplemento 1.

SALAMONE, D. F.; DAMIANI, P.; FISSORE, R. A.; ROBL, J. M.; DUBY, R. T. Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1761-1768, 2001.

SCHIMSHICK, E.; MCCONNELL, H. Lateral phase separation in phospholipid membranes. **Biochemistry**, v. 12, p. 2351-2360, 1973.

SCHLAFER, D. H.; FISHER, p. J.; DAVIES, C. J. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 145–160, 2000.

SEIDEL, G. E. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: BOVINE EMBRYO TRANSFER WORKSHOP, 70., Sydney, 1984. **Proceedings**. Sydney: The post-graduate committee in veterinary science, 1984. p.107-114.

SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 37–43, 2001.

SENGER, p. L. **Pathways to pregnancy and parturition.** 2nd. ed. Pullman: Current Conceptions, 2005.

SHIGA, K.; FUJITA, T.; HIROSE, K.; SASAE, Y.; NAGAI, T. Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cells obtained from Japanese black bulls. **Theriogenology**, v. 52, p. 527–535, 1999.

SPELL, A. R.; BEAL, W. E.; CORAH, L. R.; LAMB, G. C. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 287-297, 2001.

STICE, S. L.; ROBL, J. M.; PONCE DE LEON, F. A.; JERRY, J.; GOLUEKE, p. G.; CIBELLI, J. B.; KANE, J. J. Cloning: new breakthroughs leading to commercial opportunities. **Theriogenology**, v. 49, p. 129-138, 1998.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, p. B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. **Biology of Reproduction,** v. 64, p. 904-909, 2001.

STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. **Manual of the International Embryo Transfer Society**. Savoy: International Embryo Transfer Society, 1998.

STROUD, B.; HASLER, J. F. Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. **Theriogenology**, v. 65, p. 65-76, 2006.

SUCCU, S.; LEONI, G. G.; BERLINGUER, F.; MADEDDU, M.; BEBBERE, D.; MOSSA, F.; BOGLIOLO, L.; LEDDA, S.; NAITANA, S. Effect of vitrification solutions and cooling upon *in vitro* matured prepubertal ovine oocytes. **Theriogenology**, v. 68, p. 107–114, 2007.

TAKAHASHI, S.; YOSHIHIO, I. Evaluation of meat products from cloned cattle: biological and biochemical properties. **Cloning Stem Cells**, v. 6, p. 165–171, 2004.

TANI, T.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 324–330, 2001.

THIBIER, M. Data Retrieval Committee Statistics of Embryo Transfer - Year 2007. The worldwide activity in farm animals embryo transfer. **International Embryo Transfer Society Newsletter**, v. 26, n. 4, Dec. 2008.

THIBIER, M.; WAGNER, H. G. World statistics for artificial insemination in cattle. **Livestock Production Science**, v. 74, n. 2, p. 203-212, March 2002.

THOMPSON, J. G. Comparison between in vivo-derived and *in vitro*-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. **Reproduction, Fertility and Development,** v. 9, p. 341-354, 1997.

TIAN, X. C.; KUBOTA, C.; ENRIGHT, B.; YANG, X. Cloning animals by somatic cell nuclear transfer – biological factors. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 98, p. 1-17, 2003.

TOMÉ, D.; DUBARRY, M.; FROMENTIN, G. Nutritional value of milk and meat products derived from cloning. **Cloning Stem Cells**, v. 6, p. 172–177, 2004.

TOMINAGA, K. Cryopreservation and sexing of in vivo and *in vitro*-produced bovine embryos for their practical use. **Journal Reproduction and Development**, v. 50, p. 29–38, 2004.

TRIMBERGER, G. W. Breeding efficiency in dairy cattle from artificial insemination at various intervals before and after ovulation. **Research Bulletin,** Nebraska Agricultural Experiment Station, n. 153, p. 1-26, 1948.

VAJTA, G.; GJERRIS, M. Science and technology of farm animal cloning: state of the art. **Animal reproduction science**, v. 92, p. 211-302, 2006.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, p. J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproductio Development**, v. 51, p. 53–58, 1998.

VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Factors affecting survival rates of *in vitro* produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p. 191-200, 1997.

VAN SOOM, A.; BOERJAN, M. L.; YSEBAERT, M. T.; KUIF, A. Cell allocation to the inner cell mass and the trophectoderm in bovine embryos cultured in two different media. **Molecular Reproductio Development**, v. 45, p. 171-182, 1996.

VAN VLIET, J. H.; VAN EERDENBURG, F. J. C. M. Sexual activities and oestrus detection in lactating Holstein cows. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 50, p. 57-69, 1996.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M. Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. **Theriogenology**, v. 65, p. 914-925, 2006.

VINCENT, C.; JOHNSON, M. N. Cooling, cryoprotectants, and the cytoskeleton of the mammalian oocyte. **Oxford reviews of reproductive biology**, v. 14 , p. 73–100, 1992.

VISHWANATH, R.; SHANNON, p. Storage of bovine in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 23-53, 2000.

VIUFF, D.; RICKORDS, L.; OFFENBERG, H.; HYTTEL, P.; AVERY, B.; GREVE, T.; OLSAKER, I.; WILLIAMS, J. L.; CALLESEN, H.; THOMSEN, p. D. A high proportion of bovine blastocyst produced *in vitro* are mixiploid. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 1273-1278, 1999.

VOLKEL, S. A.; HU, Y. X. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v. 37, p. 23–37, 1992.

WALL, R. J.; POWELL, A. M.; PAAPE, M. J.; KERR, D. E.; BANNERMANN, D. D.; PURSEL, v. G.; WELLS, K. D.; TALBOT, N.; HAWK, H. W. Genetically enhanced cows resist intramammary Staphylococcus aureus infection. **Nature Biotechnology**, p. 23, v. 445–451, 2005.

WASSARMAN, p. M.; ALBERTINI, D. F. The mammalian ovum. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. (Ed.). **The physiology of reproduction.** New York: Raven, 1994. p. 79-122.

WATSON, p. F. The causes of the reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

WATTIAUX, M. A. **Heat detection, natural service and artificial insemination.** In: Babcock Institute for International Dairy Research and Development. University of Wisconsin. Disponível em: <http://www.infodairy.com/infodairy_upload_files/Cows_heifers_calves/Reproduction/0187Heat%20determination,%20natural%20and%20artificial%20insemination-e.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2009.

WELLS, D. N.; MISICA, p. M.; TERVIT, H. R.; VIVANCO, W. H. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 10, p. 369–378, 1998.

WILLETT, E. L.; BLACK, W. G.; CASIDA, L. E.; STONE, W. H.; BUCKNER, p. J. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. **Science**, v. 113, p. 247, 1951.

WILLOUGHBY, C. E.; MAZUR, P.; PETER, A. T.; CRITSER, J. K. Osmotic tolerance limits and properties of murine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 715–727, 1996.

WOODS, E. J.; BENSON, J. D.; AGCA, Y.; CRITSER, J. K. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. **Cryobiology**, v. 48, p. 146-156, 2004.

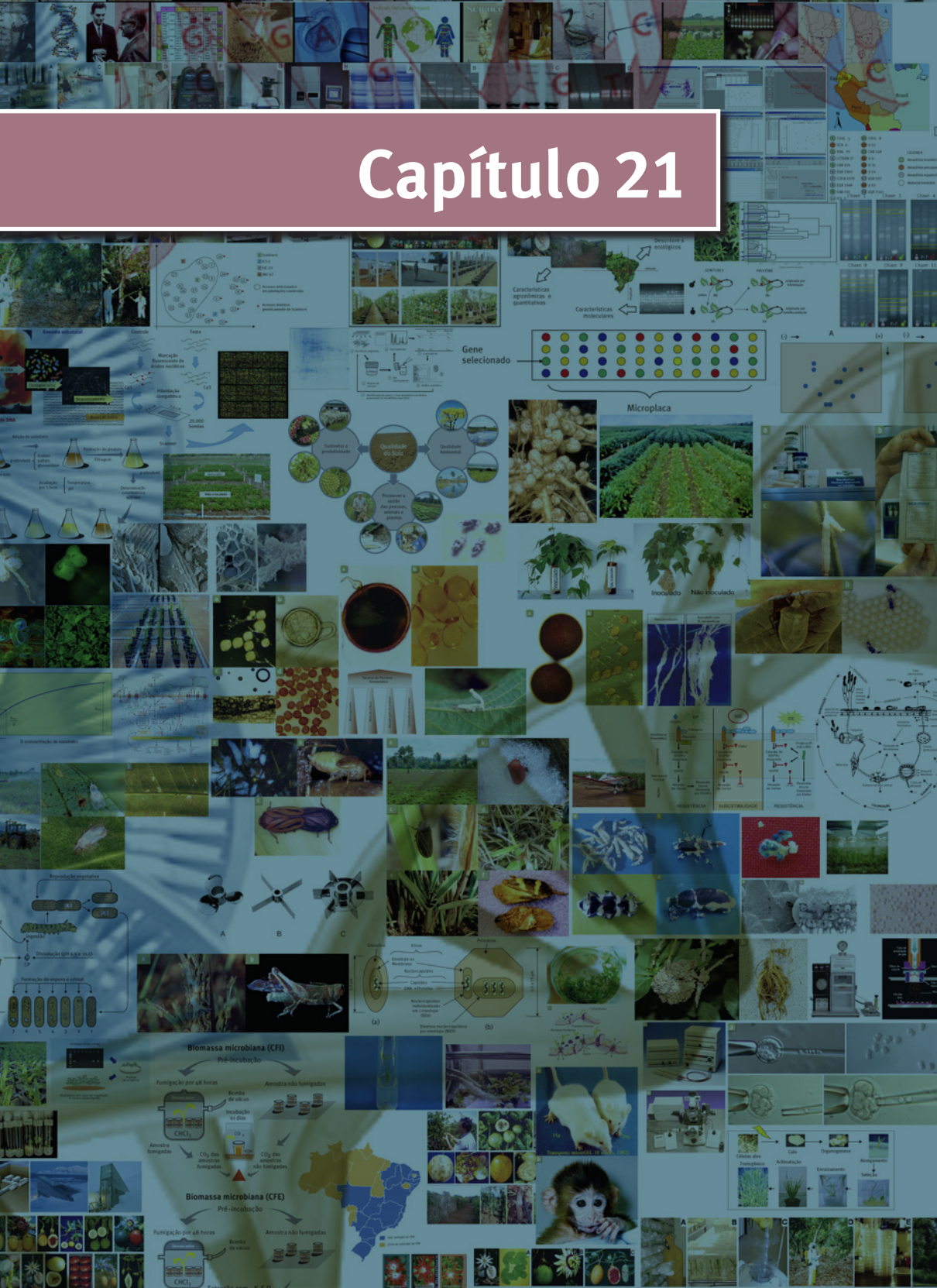
WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J. W.; NIEMANN, H. Expression of the gap junction gene connexin43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or in vivo. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 108, p. 17-24, 1996.

WRIGHT, J. M. Non-surgical embryo transfer in cattle: embryo recipient interactions. **Theriogenology**, v. **15**, p. 43–56, 1981.

WRIGHT JUNIOR, R. W.; ELLINGTON, J. Morphological and physiological differences between in vivo and *in vitro*-produced preimplantation embryos from livestock species. **Theriogenology**, v. 44, p. 67-1189, 1995.

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal Reproduction Science**, v. 61, p. 349-355, 2000.

Capítulo 21


Gene selecionado
Microplaca
Inoculado
Não inoculado
Biomassa microbiana (CFI)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas
Biomassa microbiana (CFE)
Pré-incubação
Fumigação por 48 horas
Amostra não fumigadas

Biotecnologia agropecuária e propriedade intelectual

Luciana Harumi Morimoto Figueiredo
Mônica Cibele Amâncio
Chang das Estrelas Wilches

Introdução

A Propriedade Intelectual compreende os direitos conferidos, em lei, para a proteção das criações da mente humana, ou seja, proteção do resultado do trabalho intelectual nos campos industrial, científico, literário e artístico. De acordo como o Artigo 2º, Parágrafo VII, da Convenção da Organização Mundial da Propriedade Intelectual, assinada em Estocolmo, em 14 de julho de 1967, os direitos da propriedade intelectual dizem respeito às obras literárias, artísticas e científicas; às interpretações e às execuções dos artistas; aos fonogramas e às emissões de radiodifusão; às invenções em todos os domínios da atividade humana; às descobertas científicas; aos desenhos e modelos industriais; às marcas industriais, comerciais e de serviços, bem como às firmas comerciais e denominações comerciais; à proteção contra a concorrência desleal e todos os outros direitos inerentes à atividade intelectual nos domínios industrial, científico, literário e artístico.

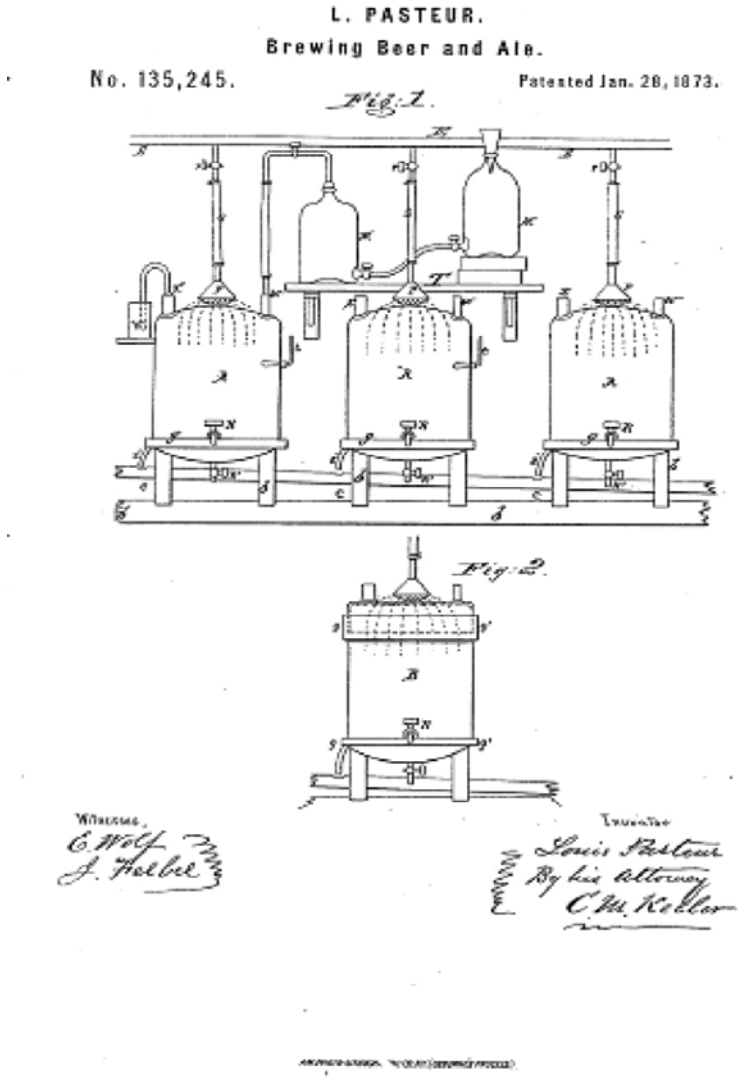
As invenções são protegidas pelo sistema de patentes e estão relacionadas com uma ideia concretizada, nova e aplicável industrialmente. A invenção deve ser resultante de um experimento e pode estar relacionada a um processo ou a um produto, como uma máquina, um artigo de manufatura, uma composição ou qualquer aperfeiçoamento desses produtos.

No que diz respeito às proteções das biotecnologias, vários setores da propriedade intelectual podem estar envolvidos. Um exemplo do envolvimento dos diversos tipos de proteção na área biotecnológica é o famoso queijo Roquefort (legalmente reconhecido na França desde 1411), que depende da seleção e cultivo de um micro-organismo particular, *Penicillium roqueforti*, usado na fermentação do queijo. Esse

queijo foi originado na vila Roquefort-sur-Soulzon na França e é amadurecido nas cavernas calcárias dessa região. O sistema de propriedade intelectual tem sido utilizado durante vários anos para proteger os interesses dos comerciantes de queijo no distrito de Roquefort. Alguns aspectos do processo de se fazer o queijo usado no distrito de Roquefort estão protegidos como segredo industrial. A Roquefort Société des Caves foi estabelecida em 1842 e é formada por produtores locais e registrou uma marca distintiva oval em 1863. O governo francês, em 1924, concedeu reconhecimento formal para o termo "Roquefort" como uma proteção de denominação de origem (forma de indicação geográfica). Proteção similar foi adquirida no exterior, por exemplo, a comunidade Roquefort registrou, em 1952, a palavra Roquefort como uma marca de certificação para queijo nos Estados Unidos, com a seguinte condição – "A marca de certificação é usada sobre os produtos para indicar que os mesmos foram manufaturados com leite de ovelha e que foram curados em cavernas naturais da Comunidade de Roquefort, departamento de Aveyron, França." (WIPO, 2007)[1].

Enquanto a biotecnologia tem se desenvolvido rapidamente nos anos recentes, as principais aplicações da biotecnologia na agricultura foram identificadas há muito tempo e têm contribuído enormemente para o aumento na produção e qualidade do produto. A proteção de micro-organismos e processos relacionados pelo sistema de patente também possui uma longa história. Em 1873, o cientista francês Louis Pasteur recebeu uma patente americana (US135245 – Figura 1) pelo método de purificar levedura para uso na indústria de cerveja, para leveduras derivadas desse método e para o equipamento usado na purificação da levedura, com base no melhoramento significativo da tecnologia de produção da cerveja que foi revelada no documento de patente.

[1] World Intellectual Property Organization (WIPO), 2007: Apostila do WIPO Advanced Course: "Biotechnology and Intellectual Property".


L. PASTEUR.

Brewing Beer and Ale.

No. 135,245. Patented Jan. 28, 1873.

Fig. 1.

Fig. 2.

Witnesses,
C. Wolf
J. Holbe

Inventor
Louis Pasteur
By his attorney
C. M. Keller

Figura 1. Página de rosto da patente US135245.

Para que uma invenção seja passível de proteção por patente, é necessário que ela seja nova (não pode ter sido revelada em nenhum lugar do mundo sob qualquer maneira de divulgação), tenha aplicação industrial (finalidade de uso na produção econômica, seriada e industrial) e envolva atividade inventiva (não seja óbvia para um técnico no assunto particular em que se insere a invenção). O Trade-Related Aspects of Intellectual Property Rights (TRIPS) permite que sejam excluídas de proteção as invenções que sejam contrárias à ordem pública e à moral, possibilitando também decisão, pelos países membros, para excluir de proteção as invenções relacionadas a métodos diagnósticos, terapêuticos e cirúrgicos e a métodos de tratamento de seres humanos ou animais, assim como a exclusão de proteção de plantas e animais, exceto micro-organismos. O TRIPS também permite a exclusão de proteção de invenções que sejam necessárias para proteger a vida humana, animal ou vegetal, bem como o meio ambiente ou a moralidade.

A legislação sobre a propriedade intelectual e as invenções biotecnológicas

Cada país possui sua própria legislação sobre a propriedade intelectual, incluindo leis específicas correlatas, como a lei da inovação, Convenção de Diversidade Biológica, e outras que envolvam a proteção de tecnologias específicas, como, por exemplo, as criações biotecnológicas. A diretiva da União Europeia específica para as invenções biotecnológicas dá alguns exemplos de invenções que podem ser consideradas contrárias à ordem pública ou moralidade (WIPO, 2007)[2]:

- Processos de clonar seres humanos.
- Processos para modificar a identidade genética da linhagem germinativa de seres humanos.
- Uso de embriões para propósitos industriais ou comerciais.
- Processos para modificar a identidade genética dos animais que provavelmente causarão sofrimento sem qualquer bene-

[2] World Intellectual Property Organization (WIPO), 2007: Apostila do WIPO Advanced Course: "Biotechnology and Intellectual Property".

fício médico substancial para o homem ou animal, e também animais resultantes desses processos.

A Convenção de Patente Europeia (European Patent Convention, 1973), que estabelece a proteção de criações técnicas em âmbito regional, prevê a exclusão de proteção de invenções relativas a variedades específicas de animais e vegetais [artigo 53 (b) da EPC]. Adicionalmente, o Escritório Europeu de Patentes (EPO) faz objeção à proteção de invenções relacionadas com o tratamento de seres humanos sendo via biológica ou outros meios.

Na Austrália, por exemplo, a Lei de Patentes de 1990 permite o patenteamento de invenções usando micro-organismos, plantas e animais, mas não usando seres humanos e processos biológicos para sua geração. Além disso, o Escritório Australiano de Patentes também regulamenta que "o organismo vivo, incluindo um animal ou gene, precisa apresentar uso industrial". Portanto, os animais precisam possuir alguma função, tal como modelo de pesquisa, ou ser produtor de uma substância utilizável. No que se refere à sequência de DNA, ela precisa codificar uma proteína ou outro elemento funcional ou agir como uma sonda para um alvo gênico específico.

A Lei de Patentes dos Estados Unidos (United States Code Title 35 – Patents, 2007) considera patenteável qualquer nova e utilizável manufatura ou composição de matéria, independente de ser criada ou descoberta pelo homem, em qualquer área técnica, não excluindo seres humanos.

A Suprema Corte do Canadá, por outro lado, tem como regra excluir de proteção formas de vida desenvolvidas, tal como ratos transgênicos, porque esse tipo de criação não é um produto manufaturado ou composição relacionada dentro do significado de invenção. No Japão, a lei exclui de proteção a mera descoberta de micro-organismos existentes na natureza e invenções de micro-organismos *per se* que são incapazes de aplicação industrial (WIPO, 2007)[3].

No Brasil, a Lei da Propriedade Industrial Nº 9.279, de 14 de maio de 1996, não considera invenção "o todo ou parte de seres vivos naturais e materiais biológicos encontrados na natureza, ou ainda que dela

[3] World Intellectual Property Organization (WIPO), 2007: Apostila do WIPO Advanced Course: "Biotechnology and Intellectual Property".

isolados, inclusive o genoma ou germoplasma de qualquer ser vivo natural e os processos biológicos naturais" (Art. 10, inciso IX). A lei ainda não considera patenteável "o todo ou parte de seres vivos, exceto os micro-organismos transgênicos que atendam aos três requisitos de patenteabilidade – novidade, atividade inventiva e aplicação industrial – previstos no art. 8 e que não sejam mera descoberta" (Art. 18, inciso III). Em vista desses dois artigos (10 e 18) da Lei, podem ser patenteáveis aquelas invenções biotecnológicas que estejam relacionados com processos envolvendo organismos vivos (p. ex.: método de produzir plantas transgênicas), construções gênicas (DNA recombinante, vetores de expressão), micro-organismos transgênicos (p. ex.: vírus e bactérias transformadas), proteínas recombinantes e composições envolvendo extratos de materiais biológicos.

Apesar da Lei da Propriedade Industrial brasileira não permitir a proteção de plantas transgênicas, essas plantas podem ser protegidas por meio de um mecanismo s*ui generis* denominado Proteção de Cultivar, regido pela Lei brasileira 9.456/97. Por essa legislação, a proteção de cultivares tem vigência de 15 anos, exceto para videiras, árvores frutíferas, florestais e ornamentais, para as quais a proteção é de 18 anos. O órgão internacional responsável pela proteção de novas variedades de plantas é a Union Internationale pour la Protection des Obtention Vegetales (UPOV). Nos Estados Unidos, as plantas com reprodução assexuada (exceto tubérculos) são protegidas pelo sistema de patentes, enquanto as plantas que possuem reprodução sexuada e tubérculos são protegidas pelo mecanismo da UPOV.

Outra importante questão envolvendo a propriedade intelectual relacionada ao setor agrobiotecnológico é o acesso a recursos genéticos e ao conhecimento tradicional, que está regulamentada hoje pela Medida Provisória n.º 2.186-16, de 2001. De acordo com essa medida, o Acesso ao Conhecimento Tradicional Associado é a obtenção de informação sobre conhecimento ou prática, individual ou coletiva, associada ao patrimônio genético, de comunidade indígena ou de comunidade local, para fins de pesquisa científica, desenvolvimento científico ou bioprospecção, visando a sua aplicação industrial ou de outra natureza. É importante também ter em mente a definição constante da Orientação Técnica n.º 1, de 24 de setembro de 2003, do

CGEN, qual seja: "atividade realizada sobre o patrimônio genético com o objetivo de isolar, identificar ou utilizar informação de origem genética ou moléculas e substâncias provenientes do metabolismo dos seres vivos e de extratos obtidos destes organismos" (VASCONCELOS, 2010)[4]. A medida também conceitua o Acesso ao Patrimônio Genético como sendo obtenção de amostra de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica, desenvolvimento tecnológico ou bioprospecção, visando a sua aplicação industrial ou de outra natureza (Inc. IV do Art. 7º da M. p. n.º 2.186-16, de 2001). Essa definição deve ser lida em conjunto com a definição constante da Orientação Técnica n.º 1, de 24 de setembro de 2003 do CGEN, qual seja: "acesso é atividade realizada sobre o patrimônio genético com o objetivo de isolar, identificar ou utilizar informação de origem genética ou moléculas e substâncias provenientes do metabolismo dos seres vivos e de extratos obtidos destes organismos" (VASCONCELOS, 2010). Essas definições são importantes para que os pesquisadores saibam se seu objeto de pesquisa se encaixa em algum desses casos e, em caso afirmativo, eles deverão solicitar autorização aos órgãos responsáveis (CGEN ou qualquer órgão ou instituição credenciado) para evitar problemas futuros. Encaixam-se dentro do escopo da Medida Provisória nº 2.186-16 as pesquisas envolvendo: (1) qualquer espécie de material genético, seja ele animal, microbiano, fúngico ou vegetal nativo ou domesticado; e (2) conhecimento tradicional associado detido por comunidade indígena ou local. É importante ressaltar algumas atividades de pesquisa que não necessitam de autorização do CGEN, exceto se envolverem acesso a conhecimento tradicional (VASCONCELOS, 2010)[5]:

- Pesquisas que visem avaliar ou elucidar a história evolutiva de uma espécie ou de grupo taxonômico, as relações dos seres vivos entre si ou com o meio ambiente, ou a diversidade genética de populações.
- Testes de filiação, técnicas de sexagem e análises de cariótipos ou de ADN que visem à identificação de uma espécie ou espécime.

[4] VASCONCELOS, R. M. 2010. Parecer AIT 080. Embrapa.
[5] VASCONCELOS, R. M. 2010. Parecer AIT 080. Embrapa.

- Pesquisas epidemiológicas ou aquelas que visem à identificação de agentes etiológicos de doenças, assim como a medição da concentração de substâncias conhecidas cujas quantidades, nos organismos, indiquem doença ou estado fisiológico.
- Pesquisas que visem à formação de coleções de ADN, tecidos, germoplasma, sangue ou soro.

A autorização de acesso e remessa de amostra de patrimônio genético para fins de pesquisa cientifica é concedida pelo Ibama ou CNPq, na qualidade de instituição credenciada pelo CGEN, desde que não haja acesso ao conhecimento tradicional associado. As autorizações de acesso e remessa de amostras de patrimônio genético e (ou) conhecimento tradicional para fins de bioprospecção e de desenvolvimento tecnológico são concedidas, exclusivamente, pelo CGEN[6].

Sistema de patentes

Conforme pode ser observado, o mecanismo de proteção das invenções biotecnológicas pode envolver uma série de segmentos da propriedade intelectual, mas um dos principais mecanismos de proteção é através do sistema de patentes. O documento de patente é de extrema importância para esse tipo de proteção e ele é composto basicamente de: relatório descritivo (descreve a invenção, de modo a ser reproduzível por um técnico da área, podendo incluir na maioria das vezes, a citação de exemplos), reivindicações (define a matéria que o inventor pretende proteger) e resumo (apresenta as informações básicas da invenção para efeito de divulgação). Dependendo do caso, o documento de patente pode ter ainda desenhos (servem para facilitar a compreensão da invenção) e listagem de sequências (serão necessárias se, na invenção, estiverem contidas sequências novas que serão reivindicadas, quer se trate de sequências de ácidos nucleicos, quer de aminoácidos). Cada uma das partes do documento possui sua particularidade; no entanto, o relatório descritivo e as reivindicações são fundamentais para esse tipo de proteção (FIGUEIREDO et al., 2008).

No relatório descritivo de um documento de patente, a invenção deve estar revelada de forma detalhada para que uma pessoa ver-

[6] Já está em andamento o credenciamento do CNPq para essas atividades (deliberação em vias de publicação).

sada no assunto possa ser capaz de reproduzir a invenção por meio das informações descritas. Para o caso de invenções envolvendo micro-organismo, deve haver um depósito do material biológico em Instituição Depositária Internacional (IDA) reconhecida de acordo com o estabelecido pelo Tratado de Budapeste (Tratado Internacional que regulamenta questões relativas a patentes e material biológico), uma vez que um micro-organismo não pode ser suficientemente descrito no relatório. Esse depósito deixará o micro-organismo disponível para que um técnico no assunto possa acessar e reproduzir a invenção.

As reivindicações definem exatamente o que está sendo protegido da invenção e devem ser fundamentadas no relatório descritivo, caracterizando as particularidades do invento e definindo, de modo claro e preciso, a matéria objeto de proteção. A reivindicação deve se limitar claramente à matéria para a qual está sendo solicitada/concedida exclusividade com o intuito de ser exercida uma futura atividade econômica. Através do que está descrito nas reivindicações, o público poderá saber, com segurança, os produtos e processos que estão protegidos e, consequentemente, aqueles que estão fora dos limites de proteção e que poderão ser utilizados sem precisar pagar royalties.

De acordo com Macedo et al. (2001), a obtenção de efetiva proteção para invenções biotecnológicas pode ser dividida em reivindicações de produto e de processo, que são agrupadas em diversos níveis de importância:

- Primeiro nível: reivindicações dirigidas ao produto final, isto é, o objeto patenteado que será colocado no mercado (p. ex.: composição inseticida).
- Segundo nível: dirigido para o processo de produção do produto final ou pelo menos de um ingrediente ativo do produto final (p. ex.: processo de produção da dita composição inseticida).
- Terceiro nível: métodos de uso (p. ex.: método de matar insetos).
- Quarto nível: matérias-primas, intermediários, ferramentas e semelhantes (p. ex.: cDNAs, plasmídeos envolvidos na confecção da composição).
- Quinto nível: processos intermediários (p. ex.: screening).

Quando uma sequência de DNA é inserida dentro de um organismo para expressão de determinada proteína que naturalmente

não era expressa por esse organismo, pode-se considerar tal evento como uma invenção, uma vez que houve a formação de um efeito técnico desejado (surpreendente) e inesperado. A extensão da proteção nesses casos será muito dependente do conhecimento público das características da dita proteína (p. ex.: nível de purificação, sequência de aminoácidos, mRNA correspondente, mapeamento do gene, entre outros) e o escopo das reivindicações nesses casos dependerá da quantidade de informação revelada ao público (MULLER, 2003). No entanto, é importante ressaltar que a proteção da matéria descrita nas reivindicações será analisada pelos examinadores de acordo com a legislação de cada país.

No Brasil, uma sequência de DNA como encontrada na natureza não seria passível de proteção por patente mesmo que nova, pois, de acordo com a legislação vigente, o isolamento de sequências de ácido nucleico de organismos não é dotado de novidade, uma vez que já existe na natureza. Por isso, os redatores de patente utilizam ferramentas para fazer a proteção dessas sequências, como, por exemplo, reivindicar a proteção das sequências de DNA através de uma construção gênica, que é passível de proteção no Brasil. O conhecimento da matéria descrita nas reivindicações é muito importante para que possamos evitar infrações de direitos. Muller (2003) discrimina em seu trabalho dois tipos de infrações das reivindicações que podem ocorrer por terceiros:

- Infração literal: em que cada elemento do produto infrator coincide com a definição contida na reivindicação.
- Infração por equivalência: em que o elemento do produto infrator não se enquadra diretamente na definição do elemento da reivindicação, no entanto ele constitui um equivalente técnico funcional desse último.

Todos esses fatores mostram a importância de se analisar um documento de patente, tendo especial atenção às reivindicações para saber como a tecnologia está protegida e também o alcance dessa proteção no caso das invenções biotecnológicas. O bom monitoramento das tecnologias com vistas no que está protegido por meio das reivindicações evitará possíveis infrações das patentes e permitirá aos pes-

quisadores ter conhecimento do que está livre para ser utilizado (*freedom to operate*).

Importância da informação tecnológica nos documentos de patente

A revelação da invenção é o coração do sistema de patente. Os direitos desse tipo de proteção são concedidos ao inventor para estimular a pesquisa, desenvolvimento e inovação na indústria. A proteção de patente possui um tempo limitado de duração, normalmente 20 anos, e em troca a esse tempo de garantia de proteção (direito de exclusividade sobre a exploração da tecnologia protegida), o inventor deve revelar detalhes de como trabalhar a invenção para que a mesma possa ser livremente utilizada pelo público no término de vigência da proteção da patente. A lei também possibilita que outros pesquisadores possam utilizar a tecnologia protegida em suas pesquisas e que a invenção esteja liberada para fins educacionais, até mesmo na vigência da patente. Toda invenção é revelada no relatório descritivo do documento de patente e as informações se tornam acessíveis ao público a partir de 18 meses da data de depósito do pedido (Lei 9.279, 1996).

Da mesma forma como a pesquisa bibliográfica, o levantamento do estado da técnica em documentos de patente deve ser realizado no início do projeto. Essa providência evita desperdícios com a realização de etapas de processo que já são conhecidas, ou com a obtenção de materiais que já existem, muitas vezes comercialmente.

A não-realização do levantamento do estado da técnica no início de um projeto de pesquisa poderá, até mesmo, implicar a impossibilidade de uso de seus resultados, se houver coincidência entre eles, total ou parcialmente, e reivindicações constantes em patentes de terceiros.

Atualmente, com o avanço da ciência, principalmente na área de biotecnologia aplicada à agricultura, esse problema tem ganho de projeção, uma vez que muitos dos campos pesquisados já possuem um representativo número de patentes cujas reivindicações são tão amplas que englobam resultados de pesquisas sequer realizadas, o que torna a busca tecnológica imprescindível para o pesquisador.

Além disso, quando o levantamento é feito precocemente, há possibilidade de redirecionar a pesquisa para a obtenção de um produto ou de um processo passível de proteção.

A busca de informações tecnológicas também permite a identificação de nichos não explorados, o que pode orientar linhas de pesquisa. Oferece ainda uma noção do interesse mercadológico ou do potencial de mercado da tecnologia.

A organização das informações contidas nos documentos de patente é feita segundo uma normatização estabelecida por um tratado internacional (Strabourg Agreement, 1971): a classificação internacional de patentes (CIP). Essa classificação tem como objetivo a uniformização do arquivamento de dados tecnológicos, distribuindo-os em oito seções do conhecimento, as quais estão divididas em subseções, classes, subclasses, grupos e subgrupos. As oito seções da CIP são:

- Necessidades humanas (A).
- Operações de processamento; transporte (B).
- Química; metalurgia (C).
- Têxteis; papel (D).
- Construções fixas (E).
- Engenharia mecânica; iluminação; aquecimento; armas; explosão (F).
- Física (G).
- Eletricidade (H).

A área biotecnológica é abrangida pelas seções "A" e "C". Mais especificamente, a subclasse C12N é a que possui maior relação com a biotecnologia moderna – "Micro-organismos ou enzimas; composições das mesmas; propagação, preservação ou manutenção dos micro-organismos; mutação ou engenharia genética; meio de cultura". A busca dos documentos de patente por meio da utilização da classificação internacional é uma ferramenta extremamente útil e eficiente para recuperar os principais documentos protegidos na área de interesse.

Além da Classificação Internacional de Patentes (CIP), existem classificações locais utilizadas por algumas bases de patente, como é o caso da base do escritório europeu (http://ep.espacenet.com), do escritório americano (www.uspto.gov) e da Derwent (http://apps.isiknowledge.com). A "Derwent Innovations Index" possibilita o acesso

a mais de 14,800,000 documentos de patente com links para patentes citadas e documentos citando determinada patente, artigos citados e o texto completo do documento de patente. A classificação da Derwent que está mais relacionada com a área agrobiotecnológica é a C06, que diz respeito à biotecnologia, incluindo genética de plantas e vacinas veterinárias.

Todas as informações contidas no documento de patente possuem um elevado valor tecnológico. Segundo informações do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (MAYERHOFF, 2005)[7], cerca de 80% de toda informação sobre tecnologias encontra-se nos bancos de dados sobre patentes. Isso significa que, ao se realizar uma busca bibliográfica, sem prévia consulta aos bancos de dados de patente, o público terá acesso a apenas 20% da informação existente no mundo, o que poderá impactar negativamente os resultados de muitas pesquisas.

Dados da OECD (2006) mostram que patentes em biotecnologia têm crescido mais rapidamente do que todos os depósitos de patente ocorridos no escritório europeu de patentes (EPO). Entre 1991 e 2002, o número de patentes biotecnológicas cresceu 8,3% ao ano, enquanto o depósito de patentes na EPO cresceu cerca de 5%. A taxa de crescimento mundial de patentes na área de biotecnologia começou a aumentar a partir de 1994. Depois de um crescimento constante na década de 1990, o número de pedidos de patentes de biotecnologia depositados sob o acordo internacional de patentes (PCT)[8] diminuiu de mais de 11 500 pedidos em 2000 para 8 700 em 2006 (-4,6% ao ano – OECD, 2009). Por outro lado, o número total de pedidos de patente PCT aumentou uma média de 5,7% ao ano de 2000 a 2006. O surto de patentes de biotecnologia no final dos anos 1990 foi, em parte devido aos pedidos de patentes relativos ao genoma humano, enquanto a recente diminuição é explicada por muitas vezes mais rigorosas

[7] MAYERHOFF, Z. D. v. L. **Informação tecnológica**. Brasília, DF, 2005. Apresentação em PowerPoint do Curso de Capacitação em Propriedade Intelectual para Gestores de Tecnologia.

[8] PCT é um Tratado de Cooperação em Matéria de Patentes (Patent Cooperation Treaty) que foi estabelecido em 19 de junho de 1970, em Washington, como a finalida de desenvolver o sistema de patentes e de transferência de tecnologia. O PCT tem como objetivo simplificar, tornando mais eficaz e econômico, tanto para o usuário como para os órgãos governamentais encarregados na administração do sistema de patentes, o procedimento, no caso de uma solicitação para proteção patentária em vários países. Até junho de 2011 existiam 144 estados contratantes.

critérios para a concessão de patentes de material genético. Conseqüentemente, o peso relativo da biotecnologia em todos os registros de patentes internacionais diminuiu entre meados dos anos 1990 e início dos anos 2000 em muitos países. Em média, patentes de biotecnologia representaram 6,5% do portfólio de patentes dos países de 2004-06, em comparação com 10,3% em meados da década de 1990. O escritório de patentes dos Estados Unidos (USPTO) mostra um aumento significativo no número de solicitações de proteção, neste escritório, na área biotecnológica agropecuária.

A Organisation for Economic Co-operation and Development/ OECD (2009) também mostra que a Dinamarca continua a ser um país ativo na área de patenteamento de biotecnologia sendo responsável por 15,7% de todos os pedidos de patente na área depositados pela Dinamarca no PCT. Estudos da OECD (2009) também mostram que os Estados Unidos contribuíram para 42% de todos os pedidos de patente PCT na área de biotecnologia entre 2004-2006. O Japão e a Alemanha seguiram no ranking contribuindo com, respectivamente 13% e 7% dos pedidos de patente na área de biotecnologia. Sete regiões dos EUA estão entre as dez regiões líderes em patenteamento em biotecnologia entre 2004 e 2006, juntamente com Tóquio para o Japão, região Nordrhein na Alemanha e da região de Copenhague, na Dinamarca. Através de uma busca não exaustiva realizada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial em agosto de 2010, foi constatado que o número de pedidos de patente depositados no Brasil na área biotecnológica foi de:

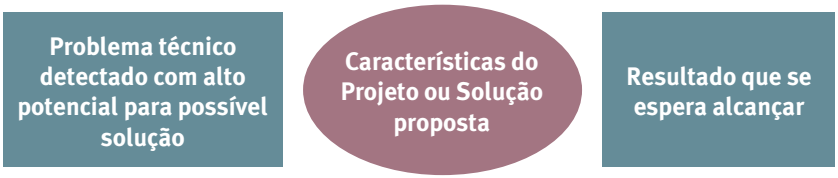
- 529 pedidos na área de mutação ou engenharia genética; DNA ou RNA, vetores.
- 208 pedidos da área de tecnologia do DNA recombinante.
- 951 pedidos na área de vetores ou sistemas de expressão especialmente adaptados para células vegetais.
- 150 pedidos para processos para modificação de genótipos de plantas.
- 98 pedidos para reprodução de plantas por meio das técnicas de cultura de tecidos;
- 283 pedidos para genes que codificam proteínas vegetais.
- 413 pedidos para genes que codificam proteínas animais.

Figueiredo et al. (2006) demonstraram que a maior parte das proteções biotecnológicas no Brasil está na área de preparações medicinais, e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) lidera o número de depósitos brasileiros na área de composições biocidas, repelentes ou atraentes de pestes e reguladores de crescimento de plantas. Entre todos os pedidos de patente da Embrapa, a área de controle biológico foi a mais focada nos tipos de proteções da empresa. O trabalho também revelou que a maior parte dos pedidos da Embrapa está centralizada principalmente na área biotecnológica agropecuária.

Como obter informações em documentos de patente

O levantamento do estado da técnica é uma etapa fundamental que antecede a redação do pedido de patente. Esse levantamento consiste em identificar todas as informações a respeito da área de interesse que já estejam disponíveis ao público, em documentos de patente ou não, e compará-las com as concretizações da tecnologia que se deseja proteger. Para que essa comparação de informações possa ser realizada eficientemente, é imprescindível que o pesquisador delimite, com estrita precisão, cada etapa do trabalho que propiciou a obtenção dos seus resultados. Figueiredo et al. (2008) relatam os procedimentos para obter informações em documentos de patentes, apresentados a seguir.

O primeiro passo a ser dado pelo pesquisador é montar um diagrama para se assegurar da precisão da procura. Abaixo, um bom modelo de esquema:



O diagrama proposto acima, por mais óbvio que possa parecer, ajuda a identificar o conceito inventivo ou cerne da invenção. É comum surgirem "produtos secundários" do projeto inicial, ou seja, resultados esperados que foram substituídos por outras concretizações da ideia original e que se mostraram mais importantes. Portanto,

o diagrama, ao identificar todas as características de possíveis soluções, deixa perceber possibilidades até então não imaginadas, durante a busca de informações em documentos de patente.

Existem algumas bases de dados que são gratuitas e trazem informações muito amplas. Algumas permitem acesso ao texto completo da patente, incluindo as figuras. Há também bases de dados privadas que são bem qualificadas, mas, em geral, muito caras. As principais bases gratuitas utilizadas para busca de documentos de patente são:

- Escritório brasileiro de propriedade intelectual (INPI): www.inpi.gov.br (http://pesquisa.inpi.gov.br/MarcaPatente/jsp/servimg/servimg.jsp?BasePesquisa=Patentes) – recuperação de documentos de patente brasileiros com acesso ao documento na íntegra através do escritório europeu de patentes.
- Escritório norte-americano de patentes e marcas (USPTO): www.uspto.gov (http://www.uspto.gov/patents/process/search/index.jsp) – recuperação de documentos de patentes americanos com acesso ao documento na íntegra.
- Escritório europeu de patentes (Espacenet): http://ep.espacenet.com/ – recuperação de documentos de patente do mundo todo com possibilidade de acessar o documento na íntegra.

Para muitos Institutos de Pesquisa, através do portal da CAPES, há a possibilidade de acessar a base da Derwent (apps.isiknowledge.com), que é uma ótima base privada e possibilita o acesso aos documentos de patente do mundo todo.

A busca em documentos de patente pode ser realizada por: (i) cruzamento de palavras-chave; (ii) classificação internacional de patentes; e (iii) por combinação de (i) com (ii).

O primeiro tipo, cruzamento de palavras-chave, é familiar aos pesquisadores que o utilizam para fazer o levantamento bibliográfico, especialmente quando recorrem a ferramentas de pesquisa (search engines) da web (World Wide Web), tais como o Google, o Yahoo e outros. O sucesso desse tipo de busca depende diretamente da qualidade da estratégia montada para encontrar a informação desejada. Palavras de significado geral, como process, analysis, gene, apparatus e semelhantes dificultam muito o direcionamento da busca.

Além das possibilidades oferecidas pelo Google ou pelo Yahoo, há outras "ferramentas de pesquisa" (search engines) específicas de busca em documentos de patente, utilizando-se o cruzamento de palavras-chave.

A classificação internacional de patentes abrange todas as áreas do conhecimento e pode ser acessada a partir da página do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (http://pesquisa.inpi.gov.br/ipc/index.php).

Se simularmos uma busca na base da Derwent (apps.isiknowledge.com) pela classificação internacional C12N 15/29 (Genes que codificam proteínas vegetais) e a palavra-chave "DREB", podemos recuperar 21 documentos de patente (Figuras 2 e 3) e ainda fazer outros estudos adicionais, como, por exemplo, saber quem são os detentores dessas tecnologias (Figura 4) e os países onde as tecnologias de interesse foram depositadas.

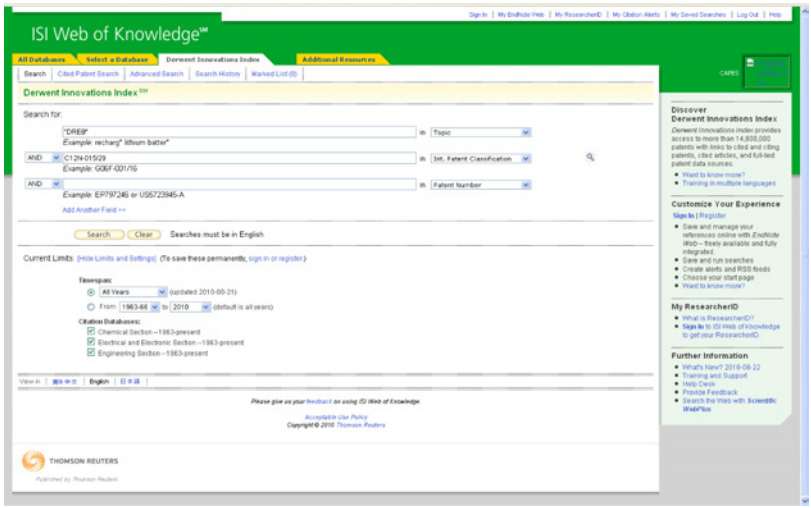


Figura 2. Estratégia de busca na base da Derwent utilizando palavra-chave e classificação internacional de patentes.

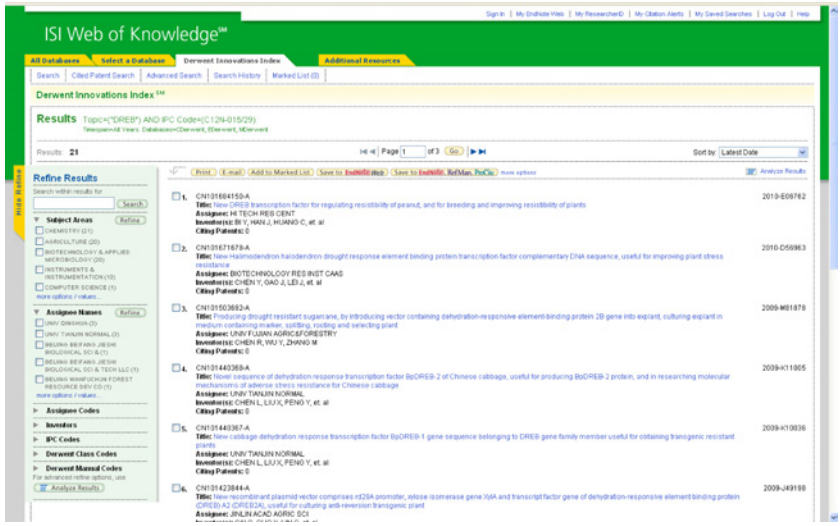


Figura 3. Resultados obtidos com a estratégia de busca na base da Derwent utilizando palavra-chave e classificação internacional de patentes.

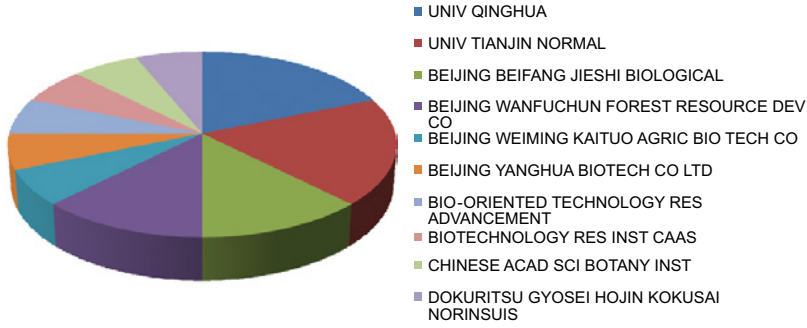


Figura 4. Principais titulares dos documentos de patente relacionados com o gene "DREB" e a área de genes que codificam proteínas vegetais (C12N 15/29).

Esses estudos de monitoramento tecnológico são muito importantes para formação de parcerias, conhecimento do portfólio tecnológico na área de interesse, planejamento de pesquisa, entre outros.

Considerações finais

O crescente volume de conhecimento gerado por intermédio da biotecnologia unido ao avanço do sistema de patentes nos países detentores desse conhecimento torna imprescindível um monitoramento das tecnologias de interesse para que o Brasil não fique eternamente dependente do monopólio das empresas multinacionais e aumente seu potencial tecnológico. Estudos mostram a tendência no aumento do número de depósitos de pedido de patente no setor agrobiotecnológico, o que intensifica a importância de um melhor conhecimento do sistema de proteção por patentes e sua utilização como fonte de informação tecnológica.

Para que se obtenha êxito no processo de internalização do conhecimento de propriedade intelectual no meio acadêmico, detentor do conhecimento, é importante que os pesquisadores incorporem em sua metodologia de pesquisa a busca em bancos de patente. Dessa forma, poderemos reduzir gastos com pesquisas em duplicata, evitar a infração de tecnologias de terceiros e aumentar a formação de parceiras e o portfólio de tecnologias a serem utilizadas na pesquisa.

Referências

AUSTRALIA. **Australia Patent Office: Pattents Act 1990**. Disponível em: <http://www.austlii.edu.au/au/legis/cth/consol_act/pa1990109/>. Acesso em: agosto de 2010.

BRASIL. **Medida provisória n.º 2.186-16, de 23 de agosto de 2001**. Convenção sobre Diversidade Biológica, dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado, a repartição de benefícios e o acesso à tecnologia e transferência de tecnologia para sua conservação e utilização, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/mpv/2186-16.htm>. Acesso em: 15 jul. 2010.

BRASIL. **Lei Nº 9.279, de 14 de maio de 1996. Lei da propriedade industrial.** Regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L9279.htm> Acesso: 16 jul. 2010.

CHAN, H. p. International Patent Behavior of Nine Major Agricultural Biotechnology. **AgBioForum**, v. 9, n. 1, p. 59-68, 2006.

European Patent Convention (EPC 1973). Disponível em: <http://www.epo.org/patents/law/legal-texts/html/epc/1973/e/contents.html>. Acesso em: ago. de 2010.

FIGUEIREDO, L. H. M.; PENTEADO, M. I. de O.; MEDEIROS, p. T. Patentes em Biotecnologia: patenteamento em biotecnologia agropecuária: cenário brasileiro. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 9, n. 36, p. 32-39, 2006.

FIGUEIREDO, L. H. M.; MACEDO, M. F. G.; PENTEADO, M. I. de O. **Noções de propriedade intelectual - patenteamento na Embrapa:** conceitos e procedimentos. Brasília, DF: Assessoria de Inovação Tecnológica, 2008. 130 p. (Embrapa Assessoria de Inovação Tecnológica. Documentos, 1).

MACEDO, M. F. G.; MULLER, A. C. A.; MOREIRA, A. C. **Patenteamento em biotecnologia**: um guia prático para os elaboradores de pedidos de patente. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2001. 200 p.

MULLER, A. C. A. 2003. 229 f. **Patenteamento em biotecnologia**: abrangência e interpretação de reivindicações. Tese (Doutorado) - Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). **OECD Biotechnology Statistic**. [S. l.], 2009. 103 p.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). **OECD Biotechnology Statistic**. [S. l.], 2006. 157 p.

USA. Consolidates Patent Laws. United States Code Title 35- Patents. Jan., 2007. Disponível em: <http://www.uspto.gov/web/offices/pac/mpep/consolidated_laws.pdf>. Acesso em: ago. 2010.

Impressão e acabamento
Embrapa Informação Tecnológica
O papel utilizado nesta publicação foi produzido conforme a certificação do Bureau Veritas Quality International (BVQI) de Manejo Florestal.

Print and finishing
Embrapa Technological Information
The paper used in this publication was produced according to the Bureau Veritas Quality International's (BVQI) Forest Management Certification.