MELHORAMENTO DE PLANTAS

variabilidade genética, ferramentas e mercado

EDITORES TÉCNICOS

Renato Fernando Amabile
Michelle Souza Vilela
José Ricardo Peixoto

ProImpress®

SBMP

Proimpress
Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas

MELHORAMENTO DE PLANTAS

variabilidade genética, ferramentas e mercado

EDITORES TÉCNICOS

Renato Fernando Amabile
Michelle Souza Vilela
José Ricardo Peixoto

Proimpress
Socieda Brasileira de Melhoramento de Plantas
Brasília, DF
2018

Supervisão editorial
Jussara Flores de Oliveira Arbues

Revisão de texto
Jussara Flores de Oliveira Arbues

Normalização bibliográfica
Letícia Gomes Teofilo da Silva - CRB 1/3098

Projeto gráfico e diagramação
Leila Sandra Gomes Alencar

Concepção da capa
Fabiano Bastos

Capa
Leila Sandra Gomes Alencar

Foto da capa
Fabiano Bastos

Todos os direitos reservados
A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M521m Melhoramento de plantas: variabilidade genética, ferramentas e mercado / Editores técnicos, Renato Fernando Amabile, Michelle Souza Vilela, José Ricardo Peixoto - Brasília, DF : Proimpress; Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2018.

108 p.: il.

ISBN: 978-85-540487-3-0

1. Genética vegetal. 2. Melhoramento vegetal. 3. Cerrado - Brasil. I. Faleiro, Fábio Gelape. II. Amabile, Renato Fernando. III. Silva, Carlos Bernard Moreno Cerqueira.

CDU 631.52

Autores

Carlos Bernard Moreno Cerqueira Silva
Biólogo, doutor em Genética e Biologia Molecular, professor da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA

Fábio Gelape Faleiro
Engenheiro-agrônomo, pós-doutor em Genética e Biotecnologia, pesquisador da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF

Jonny Everson Scherwinski-Pereira
Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

José Ricardo Peixoto
Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, professor da Universidade de Brasília, Brasília, DF

Juaci Vitória Malaquias
Estatístico, mestre em Ciência de Materiais em Modelagem e Simulação Computacional, analista da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF

Juliano Gomes Pádua
Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

Lázaro José Chaves
Agrônomo, pós-doutor em Genética e Biotecnologia, professor da Universidade Federal do Goiás, Goiânia, GO

Michelle Souza Vilela
Agrônoma, doutora em Agronomia, professora da Universidade de Brasília, Brasília, DF

Renato Fernando Amabile
Engenheiro-agrônomo, doutor em Recursos Genéticos e Melhoramento Vegetal, pesquisador da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF

Apresentação

Este livro registra a memória do Simpósio de Melhoramento de Plantas promovido pela Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas – Regional DF em parceria com a Embrapa Cerrados e Universidade de Brasília. O simpósio foi realizado na cidade de Brasília com o objetivo de apresentar e discutir temas atuais do melhoramento de plantas relacionados à variabilidade genética, ferramentas e mercado. As perspectivas para o futuro do melhoramento genético de plantas na temática do evento também foram discutidas. A memória do evento pode ser baixada no link https://www.embrapa.br/cerrados/simposio-melhoramento. Neste livro, são relatados os conteúdos das palestras ministradas no evento.

Os editores

Sumário

Visão Empresarial de um Produtor Rural / Melhorista Sobre o Mercado de Sementes 13

Recursos Genéticos Aplicados ao Melhoramento Genético de Plantas..... 27

Estatística Aplicada ao Melhoramento Genético de Plantas..... 37

Marcadores Moleculares Aplicados ao Melhoramento Genético de Plantas..... 53

Cultura de Tecidos Aplicada ao Melhoramento Genético de Plantas..... 77

Conservação, Domesticação e Melhoramento de Espécies Nativas do Cerrado 95

VISÃO EMPRESARIAL DE UM PRODUTOR RURAL/MELHORISTA SOBRE O MERCADO DE SEMENTES

José Ricardo Peixoto
Michelle Souza Vilela

VISÃO EMPRESARIAL DE UM PRODUTOR RURAL/MELHORISTA SOBRE O MERCADO DE SEMENTES

José Ricardo Peixoto
Michelle Souza Vilela

Introdução

Nas últimas duas décadas, a base tecnológica utilizada na agricultura passou por grandes transformações, colocando sérios desafios para a conservação dos recursos genéticos e para o futuro da segurança alimentar. Entre as inovações, destaca-se a tecnologia de restrição de uso genético (GURT), a qual produz sementes estéreis e/ou inibe funções vitais das plantas, eliminando o direito ancestral dos agricultores multiplicarem suas sementes (CORDEIRO et al., 2007).

O Brasil tem crescimento expressivo no comércio internacional do agronegócio, desde os anos 1990. No início de 2010, a cada quatro produtos em circulação no mercado internacional, um era brasileiro. Projeções da Assessoria de Gestão Estratégica (AGE) apontam que, até 2020, a produção do País vai representar um terço da comercialização mundial (MAPA, 2016a). O Brasil é um dos líderes mundiais na produção e exportação de vários produtos agropecuários; o primeiro produtor e exportador de café, açúcar, etanol de cana-de-açúcar e suco de laranja. Além disso, lidera o ranking das vendas externas do complexo soja (farelo, óleo e grão) (MAPA, 2016b). É importante destacar que o agronegócio brasileiro é responsável por 23% do Produto Interno Bruto (PIB) e um quarto de todo emprego gerado no País. Isso é representativo e interessante ao verificar as questões referentes a tecnologias utilizadas na agricultura. Segundo dados da Abrasem (SANTOS et al., 2014), se não houvessem estudos com a finalidade de melhoria de produção e de produtividade das culturas no Brasil, importações de aproximadamente 66 milhões de hectares seriam necessárias para suprir a safra atual. Nesse sen-

tido, a utilização de sementes melhoradas foi responsável pelo crescimento do agronegócio, elevando a importância do melhoramento genético, biotecnologia e incorporação de novas tecnologias ao processo de produção de sementes (SANTOS et al., 2014).

Em resumo, nos últimos anos, o Brasil se consolidou como um dos maiores produtores e exportadores mundiais de alimentos, além de fibras. A crescente participação do País no mercado internacional é resultado da combinação de fatores como clima propício, investimento em tecnologia, extensão territorial cultivável e qualidade dos produtos. O Brasil exporta para mais de 180 países, tendo como principais compradores a China, a União Europeia e os Estados Unidos, bem como os países do Mercosul (MAPA, 2016c). Além da legislação brasileira, a exportação de sementes ou de mudas deve atender às exigências de acordos e tratados que regem o comércio internacional e aquelas estabelecidas com o país importador (MAPA, 2016d). Dessa forma, estudos relacionando temas, como melhoramento genético e inovações tecnológicas, devem ser discutidos, não somente por acadêmicos e pesquisadores, mas também por empresários do meio rural, já que estes poderão colocar em prática todas as inovações encontradas a partir das pesquisas no Brasil.

A importância do melhoramento genético de plantas

A genética e o melhoramento de plantas são duas das principais ciências a serviço do homem que contribui em vários campos de atividades, destaque sobretudo na agropecuária.

Com o crescimento populacional surge a necessidade de maior quantidade de alimentos. Nesse sentido, o melhoramento genético de plantas e animais tem contribuído para melhorar o padrão de nutrição da população; ampliar as exportações e reduzir dependência da importação de alimentos e combustíveis.

Entre as diversas contribuições do melhoramento genético de plantas destacam-se o aumento de produtividade e qualidade dos alimentos; a introdução de genes para resistência a doenças e a pragas; resistência às condições adversas de solo e de clima; melhoramento da arquitetura de plantas; redução do porte de culturas como o arroz, permitindo adubação com nitrogênio, e o desenvolvimento de cultivares híbridas com inúmeras vantagens sobre as cultivares de polinização aberta.

O Sistema Brasileiro de Avaliação e Recomendação de Cultivares – SNARC, instituído pelo Ministério da Agricultura em 1981, operou até 1997 reunindo, em um sistema cooperativo coordenado pela Embrapa, instituições públicas e privadas, atuando no melhoramento e na produção de sementes. Nesse período, comissões regionais e comissões por produto, compostas por representantes dos diversos segmentos, avaliavam e recomendavam cultivares de maneira colaborativa (CORDEIRO et al., 2007).

Esse sistema colaborativo estendia-se, também, ao trabalho de melhoramento de plantas. A estruturação de um trabalho em rede para experimentar diferentes linhagens e cultivares permitia compartilhar germoplasmas. Uma vez que uma linhagem superior era identificada, ela era disponibilizada para que os demais membros da rede pudessem utilizá-la em cruzamentos com outros materiais de seus experimentos locais (CORDEIRO et al., 2007).

A aprovação da Lei de Cultivares revogou a Portaria de 1981, que instituiu o SNARC, extinguindo as Comissões Regionais de Avaliação de Cultivares. O trabalho cooperativo deixou de existir, dando lugar a arranjos competitivos baseados em relações contratuais sigilosas entre as partes. A recomendação de novos cultivares passou a ser responsabilidade exclusiva do obtentor e o germoplasma deixou de ser compartilhado (CORDEIRO et al., 2007).

No tocante a importância do melhoramento genético no mercado de sementes e no cotidiano dos empresários rurais, aliado a boas práticas agrícolas, cultivares melhoradas e tecnologia moderna, verifica-se que o

rendimento das lavouras nos últimos anos apresentou um crescimento expressivo, elevando o Brasil para um novo patamar de produtividade. Assim, segundo Santos et al. (2014), as sementes, que representam a base do agronegócio brasileiro, podem ser referenciadas como um veículo de inovação tecnológica no País. O envolvimento do empresário rural nessa realidade proporciona inovação às mais diferentes lavouras. Dessa forma, existe a necessidade de envolver esses profissionais no cotidiano do trabalho de inovação tecnológica do agronegócio brasileiro.

Programas e métodos de melhoramento genético

O melhoramento de plantas engloba todas as técnicas, os métodos, as estratégias ou os recursos utilizados para que algum progresso seja incorporado a uma espécie vegetal. De modo geral, esse progresso está relacionado com a melhora do conteúdo genético da espécie trabalhada, em estreita relação com o ambiente em que esta espécie será cultivada (BORÉM, 1997). Segundo Miranda Filho (1994), "*melhoramento genético é o ajustamento genético aos componentes físicos, químicos, biológicos, econômicos e sociais do ambiente*", o que implica uma atividade dinâmica, exigindo ajustes genéticos para se adaptar ao ambiente, que é dinâmico em função dos diferentes fatores que o compõem.

O melhoramento visa obter genótipos superiores, mas a expressão desses genótipos, que são os fenótipos, dependem, entre outros, do ambiente em que este genótipo está inserido (CHAVES, 2001).

Biotecnologia pode-se definir como "*qualquer técnica que utilize organismos vivos ou partes, para fazer ou modificar produtos, melhorar plantas ou animais, ou desenvolver microrganismos para uso específico*" (RAMALHO et al., 1996). Entre as diversas técnicas biotecnológicas extremamente úteis ao melhoramento de plantas e animais podemos citar a cultura de tecidos, a fusão de protoplastos, os marcadores moleculares e a transgenia.

Temos um número expressivo de programas de melhoramento genético de plantas em andamento no Brasil e no mundo, nas mais diversas culturas de grãos, frutas, hortaliças e ornamentais. Vários desses programas ocorrem em parceria entre pequenas, médias e grandes empresas, tanto do setor privado como do setor público.

Objetivos do melhoramento genético de plantas

Entre os objetivos específicos do melhoramento genético de plantas destacam-se o aumento da produtividade; a melhoria da qualidade nutricional de alimentos (aumento no teor de vitamina A e matéria seca na batata, teor de proteínas no feijão, fibras mais resistentes no algodão, etc); precocidade; uniformidade; longevidade da lavoura; obtenção de variedades para colheita mecanizada no algodão e cana-de-açúcar; resistência a adversidades ambientais (clima, solo, etc); resistência a doenças (vassoura-de-bruxa no cacaueiro, ferrugem asiática na soja, requeima e pinta-preta em hortaliças solanáceas, etc) e resistência a pragas (traça-do-tomateiro, batateira e brássicas, moleque-da-bananeira, ácaros em citros, etc).

Facilidades e dificuldades enfrentadas no melhoramento genético de plantas

Entre as facilidades encontradas pelos melhoristas, destacam-se a disponibilidade de recursos genéticos de diversas espécies de plantas cultivadas; o considerável número de Bancos Ativos de Germoplasmas (BAGs), espalhados em todo o mundo, como o Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), situado em Cali (Colômbia); o ciclo curto de grande parte das espécies cultivadas, excetuando a maioria das fruteiras; a disponibilidade de ferramentas biotecnológicas, tais como cultura de tecidos, marcadores moleculares, etc; a possibilidade de utilização de estratégicas que facilitam os cruzamentos e, consequentemente, a obtenção de híbridos, citando o uso da macho-esterilidade e autoincompatibilidade. Além dessas facilidades,

destacamos o manejo ambiental sustentável e o manejo e práticas culturais mais adequadas e sofisticadas por produtores mais tecnificados, manejos e práticas que possibilitam e facilitam a expressão fenotípica dos novos materiais genéticos.

Entre as dificuldades enfrentadas pelos melhoristas, destacam-se a escassez de recursos genéticos de algumas espécies cultivadas; a pouca quantidade de fontes de resistência a determinadas doenças e pragas; o longo tempo demandado para a transferência de materiais genéticos por meio do Acordo de Transferência de Materiais (ATM) em razão de normas rígidas da legislação nacional e internacional, entre outras causas; a disponibilidade e a qualidade inferior da mão de obra necessária para as diversas etapas; a baixa heterose em determinadas características a serem melhoradas e a perda de vigor na maioria das plantas alógamas, quando submetidas a endogamia.

Além disso, outra dificuldade tem relação com o trabalho em equipe, já que o melhoramento genético envolve várias áreas do conhecimento, necessitando uma equipe multidisciplinar. Além disso, é importante verificar as necessidades e demandas regionais e nacionais, como e quais programas estão sendo desenvolvidos, observar a disponibilidade de recursos financeiros disponíveis e manter foco nos objetivos propostos em cada programa.

A importância do mercado de sementes

A organização do sistema de abastecimento de sementes no Brasil teve início em 1920, a partir da criação do Serviço de Sementes no âmbito do Ministério da Agricultura, cujas atribuições incluíam a multiplicação, o controle da produção, a análise e a distribuição (FRANÇA-NETO e OLIVEIRA, 1998). Nos anos 1940, o governo do Estado de São Paulo estabeleceu um sistema estatal de distribuição de sementes de algodão. Nessa mesma época, nascia, em Minas Gerais, a empresa Agroceres[R], a qual, com o apoio da Universidade Federal de Viçosa (UFV), lançou as primeiras cultivares híbridas de milho (CORDEIRO et al., 2007).

Em 1965, a promulgação da primeira Lei de Sementes estabeleceu regras para o setor, criando as bases para o desenvolvimento da indústria de sementes no país. A empresa CARGILL[R] foi a primeira multinacional a entrar no mercado brasileiro, em 1965. Com o avanço da revolução verde na década de 1970, novas empresas multinacionais entraram no mercado (CORDEIRO et al., 2007).

Com a criação da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), no ano de 1973, o setor público construiu uma rede nacional de avaliação de cultivares, articulando programas de melhoramento mantidos por universidades e órgãos estaduais de pesquisa pública. Esse sistema público garantiu o desenvolvimento das pesquisas em melhoramento de plantas tornando-se, por várias décadas, o pilar da indústria de sementes do País. A identificação de genes relacionados com o período juvenil da soja permitiu o desenvolvimento de cultivares adaptadas para regiões de baixa latitude e a expansão dessa cultura para as regiões centro-oeste e norte do Brasil (CORDEIRO et al., 2007).

Entre 1979 e 1990, o Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA) lançou 497 novas cultivares, das quais 18% de soja e 12% de milho (ALMEIDA, 1997). A estratégia de trabalhar em parceria com produtores de sementes e cooperativas permitiu que a Embrapa alcançasse uma alta taxa de adoção de suas variedades, chegando a ocupar 64% do mercado de soja comercializada no Estado do Paraná, na safra de 1999/2000 (DOMIT et al., 2007).

A aprovação de um novo marco regulatório na década de noventa resultou em grandes transformações no setor de sementes. Em 2005, aprovou-se, no Brasil, a Lei 11.105, estabelecendo normas de segurança e de fiscalização de organismos geneticamente modificados (em substituição à lei anterior nº 8.974, de janeiro de 1995). A Lei 9.456, aprovada em 28/04/97, instituiu o Serviço Nacional de Proteção de Cultivares – SNPC, ligado ao Ministério da Agricultura, definindo regras para o registro de cultivares nos moldes estabelecidos pela União de Proteção das Obtenções Vegetais – UPOV (HA-

THAWAY, 1997). A nova Lei de Sementes, encaminhada ao Congresso em 1998 e aprovada em 2003, estabeleceu maiores restrições ao replantio de sementes comerciais para médios e grandes agricultores e estendeu à iniciativa privada algumas atribuições anteriormente exclusivas do setor público, caso dos serviços de certificação de produtores de sementes (CORDEIRO et al., 2007).

A definição de um marco legal para a liberação comercial de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) e a possibilidade de restrição de acesso ao material genético proporcionada pela Lei de Cultivares e pela Lei de Sementes motivaram uma série de aquisições de empresas brasileiras por grandes multinacionais do setor sementeiro. Entre essas aquisições, destacam-se a divisão de soja da FT Sementes[R], líder na área de soja, e a divisão de milho da Agroceres[R] – a maior empresa brasileira de sementes na época –, ambas compradas pela norte-americana Monsanto[R] em 1996 e 1997, respectivamente. Em 1998, outras quatro empresas nacionais foram adquiridas pela Dow AgroScience[R], enquanto a Monsanto[R] adquiriu parte de outras três multinacionais atuando no Brasil. Em 1999, a Agrevo[R] – posteriormente adquirida pela Bayer[R] – comprou três empresas brasileiras do setor de milho e de soja. Nesse mesmo ano, a DuPont[R] adquiriu uma empresa brasileira do setor de milho e a divisão de milho da Pioneer[R], esta presente no Brasil desde a década de setenta (CORDEIRO et al., 2007).

As aquisições continuaram ao longo da década seguinte. Em 2005, a Nidera[R] adquiriu 100% dos programas de soja e de milho no Brasil de propriedade da Bayer[R]. Em 2007, as aquisições chegaram ao ápice com a compra da divisão de sementes da Agromen[R] – principal empresa brasileira de sementes de milho e detentora de 11% do mercado nacional – efetuada pela Dow AgroScience[R]. Nesse mesmo ano, a Monsanto[R] adquiriu 100% da Agroeste[R], outra empresa brasileira líder no setor de sementes de milho híbrido. Dessa forma, dez anos após a aprovação da Lei de Cultivares, o país assistiu a um processo crescente de concentração do mercado de sementes, seguindo a mesma tendência observada em outros países em desenvolvimento (CORDEIRO et al., 2007).

Santos et al. (2014) observam que com o advento de novas tecnologias, de legislações específicas e de melhorias de técnicas de produção, a produção brasileira de sementes saltou de 1,6 milhão de toneladas para 3 milhões de toneladas em 12 anos (intervalo entre os anos de 2001 e 2012/13), cujas safras de soja e milho são os destaques desse crescimento. Além dessas culturas, os mercados de sementes forrageiras e olerícolas também tiveram crescimento expressivos nos últimos anos.

O empresário rural e o melhoramento genético no mercado de sementes do Brasil

O agronegócio brasileiro cresce expressivamente ano após ano. Além dos profissionais ligados à área de pesquisa e de tecnologia, os empresários rurais são essenciais nesse desenvolvimento crescente. É importante salientar que hoje é prescindível que os empresários rurais estabeleçam contato direto com essas novas tecnologias para melhoria do processo de crescimento do mercado agropecuário nacional e internacional. Entender sobre o processo de produção agropecuária tem tanta relevância como entender sobre os processos tecnológicos que estão envolvidos nos diferentes segmentos da agropecuária. No tocante ao mercado brasileiro de produção de sementes, o empresário do setor rural precisa estar inteirado sobre questões como melhorias de manejo, inovações tecnológicas e melhoramento genético de plantas. A partir desses fatores que envolvem a produção agrícola, é possível deliberar sobre expectativas de mercado que irão contribuir nos futuros programas de melhoramento genético de plantas e também no futuro produtivo das culturas estudadas. Assim, é primordial o envolvimento do empresário rural nesses assuntos que envolvem a pesquisa e a tecnologia agrícola.

Essa necessidade de envolver o empresário rural também na pesquisa agrícola teve grande expressão a partir de 1995, quando a indústria de sementes passou por grandes mudanças, que envolveram novas legislações na produção de sementes, propriedade intelectual, biossegurança e novidades

tecnológicas no mercado da agricultura nacional. A partir desse período, empresas e empresários do meio rural iniciaram o trabalho conjunto entre pesquisa e produção. A competitividade aumentou muito com a entrada de novas empresas no mercado de produção de sementes no Brasil (SANTOS et al., 2014). A dinâmica do mercado de sementes se modificou alterando também os padrões produtivos. A partir das mudanças, novos padrões de negócios foram sendo criados aumentando ainda mais o poder competitivo das empresas. Esses fatos impulsionaram o mercado brasileiro de sementes e o mercado brasileiro de produção agrícola e agropecuária.

A visão do empresário rural envolvido em novas tecnologias, inovações tecnológicas, pode proporcionar prospectivas de novidades no mercado agropecuário. Estes, com a participação de especialistas, gestores de pesquisa, de empresas públicas e privadas, podem sinalizar informações sobre o desempenho do setor agropecuário, vislumbrando oportunidades futuras de delineamentos inovadores, com desenvolvimento de cultivares novas, novas oportunidades, com geração de processos, produtos, competitividade entre empresas e muito mais.

Além disso, os empresários rurais podem contribuir com a experiência do dia a dia no campo, realidade muitas vezes diferentes das enfrentadas por pesquisadores e profissionais envolvidos com a pesquisa. Uma visão realista pode proporcionar melhorias nos processos biotecnológicos, além de ter a possibilidade de trabalho em equipe entre empresário rural e profissionais de empresas de pesquisa e desenvolvimento tecnológico.

Outro ponto importante tem relação com o potencial produtivo das lavouras e deve-se, em parte, ao aumento do potencial produtivo das cultivares. Se as sementes não tiverem alta taxa de vigor e de germinação, dificilmente o produtor acertará a densidade populacional ideal para que a lavoura produza o máximo. Como as sementes são caras, em razão de toda a carga tecnológica, o produtor exige qualidade fisiológica e sanitária das sementes. Por outro lado, já que as sementes são caras, existe o estímulo ao melho-

ramento genético, para o desenvolvimento de novas cultivares em escala industrial. Com isso, o teto produtivo das variedades segue aumentando e realimentando a necessidade de qualidade da semente, aliada ao potencial produtivo e resistência às doenças e às pragas e este ciclo virtuoso abre espaços para diferentes atores da cadeia do agronegócio, tanto os pequenos e médios como os grandes empreendedores, importantes ao agronegócio nacional.

Referências

ALMEIDA, F. A. **O melhoramento vegetal e a produção de sementes na Embrapa**. Brasília: EMBRAPA, 1997. 358 p.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 20. ed. Viçosa: Editora UFV, 1997. 547 p.

CHAVES, L. J. Interação de genótipos com ambientes. In.: NASS, L. L et al. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento - Planta**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 673-713.

CORDEIRO, A; PEREZ, J.; GUAZSELLI, M. J. **Impactos potenciais da tecnologia *terminator* na produção agrícola: depoimentos de agricultores brasileiros**. Florianópolis, dez. 2007.

DOMIT, A. L et al. Transferência de tecnologia para cultivares de soja desenvolvidas para a Embrapa Soja para o Paraná. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 2, p.1-9. 2007.

FRANÇA-NETO, J. B.; OLIVEIRA, M. J. Seed technology research in Brazil: evolution and perspective. **Sci. agric**. v. 55, p. 8-18. 1998.

HATHAWAY, D. **Lei de Cultivares: impactos e horizontes**. Rio de Janeiro: IBASE, 1997. 25 p.

MAPA. 2016a. **Exportação**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 15 nov. 2016.

MAPA. 2016b. **Exportação**: alimentos: vegetal. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em 15 nov. 2016.

MAPA. 2016c. **Exportação**: alimentos. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 15 nov. 2016.

MAPA. 2016d. **Exportação**: sementes e mudas. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 15 nov. 2016.

MIRANDA FILHO, J. B. **Melhoramento genético vegetal: princípios e métodos; melhoramento genético e melhoramento ambiental**. Piracicaba: ESALQ/Departamento de Genética, 1994. p. 1-6 (Publicação Didática).

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. B. **Genética na agropecuária**. 5. ed. São Paulo: Editora Globo, 1996. 359 p.

SANTOS, P.E. de C. et al. **Semente é tecnologia**. Especial Abrasem. 2014. Disponível em: <http://www.abrasem.com.br/wp-content/uploads/2014/04/Mat%C3%A9ria-Semente-%C3%A9-Tecnologia.pdf>. Acesso em: 02 dez. 2016.

RECURSOS GENÉTICOS APLICADOS AO MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS

Juliano Gomes Pádua

RECURSOS GENÉTICOS APLICADOS AO MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS

Juliano Gomes Pádua

O melhoramento genético vegetal pode ser definido de forma bastante simplificada e generalizada como a arte e a ciência de modificar plantas ou seu desempenho em benefício da humanidade (POEHLMAN e SLEPER, 1995).

A matéria-prima utilizada pelos programas de melhoramento é a variabilidade ou diversidade genética existente em uma espécie ou em espécies correlatas que são capazes de se intercruzar. Mais recentemente, com o advento das tecnologias de transformação genética, abriu-se a possibilidade de introduzir genes de espécies evolutivamente tão distantes e não relacionadas geneticamente que não possuem a capacidade de cruzamento entre si. Assim, em teoria, qualquer ser vivo, até mesmo vírus, pode contribuir com genes para o melhoramento de uma dada espécie vegetal. Porém, neste resumo, tratar-se-á apenas dos pools gênicos primário, secundário e terciário, que abrigam espécies úteis ao melhoramento vegetal tradicional. A esse conjunto denomina-se recursos genéticos vegetais, ou seja, qualquer material genético (vegetal) que apresenta interesse sócio-econômico atual ou potencial, termo cunhado por Erna Bennet, na década de 1960 e internacionalmente adotado após conferência sobre *Exploração, Uso e Conservação dos Recursos Genéticos Vegetais*, em 1967, organizada pela Food and Agriculture Organization (FAO) e International Biological Programme (IBP).

A partir de 1967, diante da crescente erosão genética observada em espécies cultivadas, e com os resultados da conferência, instituições de pesquisa de todo o mundo passaram a trabalhar de forma mais organizada e sistematizada nos temas de coleta, conservação e intercâmbio de recursos genéticos.

Apesar da importância da conferência de 1967 e por esta representar um marco histórico para as ações de conservação e uso dos recursos genéticos, a partir do momento em que o homem passou a cultivar seu alimento, e por isso, obrigatoriamente passou a conservar sementes e plantas, podemos dizer que tiveram início as atividades de conservação de recursos genéticos.

Já no século 20 (1926-1935), há que se destacar o fabuloso trabalho do russo Nicolai Ivanovich Vavilov que viajou por 52 países, coletando sementes de espécies selvagens e cultivadas, buscando encontrar padrões de distribuição geográfica. Como resultado, estabeleceu os centros de origem das espécies cultivadas em Vavilov.

Como consequência das Conferências da FAO nas décadas de 1960 e 1970, os países começaram a estabelecer grandes coleções de germoplasma. Nesse período, no Brasil, foi criada a Embrapa, que em 1974 fundou o Centro Nacional de Recursos Genéticos, que tinha como principais objetivos: conservar e ampliar o germoplasma vegetal existente no País; traçar diretrizes para a pesquisa em tecnologia de sementes, principalmente visando solucionar problemas nas áreas de armazenamento, análise e multiplicação de sementes.

Com o estabelecimento do Centro Nacional de Recursos Genéticos, o país passou a tratar o tema Recursos Genéticos de uma maneira mais sistematizada, uma vez que várias instituições já possuíam coleções de germoplasma que atendiam basicamente aos programas de melhoramento.

Ações de coleta e intercâmbio de germoplasma constituem os meios para o estabelecimento e enriquecimento de coleções. No caso específico de melhoramento vegetal, propriedades agrícolas, notadamente aquelas de pequeno porte e/ou área de cultivo de variedades locais ou tradicionais, constituem uma importante fonte de germoplasma para a pesquisa agrícola.

Adicionalmente, no caso de espécies nativas ou de parentes silvestres de espécies cultivadas, áreas de vegetação natural podem ser fonte de germoplasma de interesse.

Porém, para que um sistema de conservação de recursos genéticos seja eficiente, é preciso adotar duas estratégias complementares: a conservação *ex situ* e a conservação in situ. É importante prospectar e documentar a ocorrência de espécies em áreas de ocorrência natural e também quando manejadas sob cultivo, seja em áreas de agricultores, em comunidades tradicionais e em áreas indígenas, uma vez que nessas condições as plantas sofrem pressão seletiva ambiental e antrópica, favorecendo o processo adaptativo local.

Em condições *ex situ*, podemos ter:

- Coleções de sementes para as espécies que apresentam sementes ortodoxas.
- Coleções in vitro e/ou coleções criogênicas para as espécies que apresentam sementes recalcitrantes ou intermediárias ou ainda para espécies em que a propagação vegetativa é comumente empregada.
- Coleções de plantas vivas no campo.

Estima-se que haja no mundo, cerca de 7,5 milhões de acessos conservados. Os produtos com maior número de acessos conservados são: trigo, arroz, cevada, milho e feijão (FAO, 2014). No Brasil, tomando-se como base as coleções da Embrapa, as maiores coleções são de cereais, perfazendo um total aproximado de 60 mil acessos, abrangendo os BAGs de arroz, trigo, milho, sorgo, cevada, milheto, aveia, centeio e triticale. Destacam-se muitos BAGs dedicados a fruteiras nativas, tais como maracujá, abacaxi, caju, jenipapo, mangaba, *Psidium* spp. (goiaba e araçás), *Spondias* spp. (umbu, cajá, siriguela etc).

Apesar dessa grande diversidade conservada, tanto internacional quanto nacionalmente, a utilização da variabilidade armazenada em bancos de germoplasma é baixa. Como principais motivos dessa subutilização, Nass et al. (2007) citam:

- Falta de documentação, descrição, avaliação e informações.
- Pouca disponibilidade de sementes.
- Adaptação restrita dos acessos.
- Satisfação dos melhoristas com a variabilidade genética encontrada nos materiais elite.
- Pouca mão de obra (curadores e melhoristas).
- Dificuldade de identificar genes potencialmente úteis.
- Ausência de programas de pré-melhoramento.

Apesar dessa baixa taxa de utilização, algumas culturas conseguiram grandes avanços no uso da diversidade conservada em bancos de germoplasma (Tabela 1), sobretudo por meio de combinações gênicas encontradas em seus parentes silvestres (HAJJAR e HODGKIN, 2007).

Com o avanço das tecnologias de genotipagem e sequenciamento e consequente redução de custos, novas oportunidades se abrem para o entendimento de processos biológicos, a identificação de genes, as Quantitative Trait Loci (QTLs) e a aceleração do desenvolvimento de novas cultivares. Adicionalmente, os custos de manutenção de coleções e sua caracterização e avaliação têm se tornado mais onerosos. Dessa maneira, a utilização de dados de genotipagem tem permitido racionalizar o processo de fenotipagem por meio da predição do comportamento de genótipos.

Tabela 1. Uso de parentes silvestres no melhoramento de espécies agrícolas.

Produto	Resistência a pragas e a doenças	Estresse abiótico	Produtividade	Qualidade	Macho esterilidade ou restauro da fertilidade	Número de contribuições
Mandioca	+	-	-	+	-	3
Trigo	++++++++++	-	+	+	-	9
Milheto	+	-	-	-	+	3
Arroz	+++++++	+++	+	-	+	12
Milho	+	-	-	-	-	2
Girassol	+++	+	-	-	+	7
Alface	+++	-	-	-	-	2
Banana	++	-	-	-	-	2
Batata	++++++	-	-	-	-	12
Amendoim	+	-	-	-	1	
Tomate	+++++++++	++	-	++	-	55
Cevada	-	+	-	-	-	1
Grão-de-bico	-	+	-	-	-	2

Fonte: Adaptado de Hajjar e Hodgkin, 2007.

Yu, Li e Guo (2016) apresentaram uma metodologia para predizer rendimento de biomassa e outros caracteres a ele relacionados, com base no genótipo de acessos de bancos de germoplasma de sorgo. Destaca-se a alta correlação obtida entre genótipo e as características avaliadas e também a validação do método para populações independentes, o que abre espaço para que o método possa ser extrapolado para a espécie. Assim, torna-se possível diminuir o número de acessos que devem ser levados a campo para avaliação, resultando em economia de recurso e tempo e, consequentemente, aumentando o uso dos bancos de germoplasma e a eficiência dos programas de melhoramento genético.

No Brasil, dois bons exemplos recentes da utilização de parentes silvestres no melhoramento de plantas podem ser citados: (a) caracterização de parentes silvestres do amendoim com objetivo de identificação de arranjos gênicos capazes de conferir resistência a doenças (FÁVERO et al., 2015a; 2015b; MICHELLOTO et al., 2016); e (b) a utilização da diversidade de espécies do gênero *Passiflora* no desenvolvimento de cultivares tanto para alimentação quanto para fins ornamentais (FAO, 2010).

A sustentabilidade dos programas de melhoramento genético vegetal e, por consequência, da manutenção da segurança alimentar da população mundial dependerá cada vez mais dos recursos genéticos em virtude das rápidas mudanças pelas quais a sociedade e o ambiente têm vivenciado nos últimos séculos. Dentre essas, podemos destacar:

- O crescimento populacional, notadamente em países não desenvolvidos. Com isso, a demanda por alimentos irá crescer substancialmente.
- O aumento da renda per capita, que tem sido observada em diversos países, impactará não só no aumento da demanda por alimentos, mas também na produção de alimentos mais saudáveis, com melhores características nutricionais, abrindo espaço para o uso de novas espécies ainda pouco ou não exploradas comercialmente.

- Os impactos da agricultura no ambiente deverão ser minimizados, buscando-se produzir alimentos com responsabilidade ambiental, com a redução do uso de defensivos agrícolas, menor uso de terras e maior eficiência no uso de fertilizantes e sobretudo da água. Assim, a procura e a introdução de genes associados ao aumento da eficiência do uso de insumos e a resistência/tolerância a pragas e a doenças serão obrigatórias.
- As mudanças climáticas impactarão diretamente a agricultura. O desenvolvimento de cultivares tolerantes a essas novas condições ou adaptadas a novas áreas de cultivo será exigido.

Há ainda a preocupação se bancos de germoplasma conservados a campo poderão ser mantidos nos locais onde hoje estão localizados ou se será necessária uma mudança para evitar alguma perda de diversidade em razão da não adaptação destes acessos a uma nova condição climática. De forma similar, áreas de preservação ambiental, que também são fonte de recursos genéticos, poderão ser impactadas, e sujeitas a perdas de diversidade ou até mesmo de espécies.

Deve-se levar em consideração, mesmo em pleno século 21, o problema da fome e da desnutrição que ainda ocorre em vários pontos do planeta. Em sentido oposto, há uma considerável parcela da população afetada pelo sobrepeso e pela obesidade, o que demanda o desenvolvimento de alimentos nutricionalmente melhorados e também do uso de plantas alimentícias não convencionais (PANCs) de forma a diversificar a dieta humana, que é baseada em poucas espécies.

Apesar desse quadro alarmante, abre-se um leque de grandes oportunidades na área de pesquisa em recursos genéticos e melhoramento de plantas.

Referências

FAO. **The second report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture**. Roma: Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010. 370 p.

_____. **Genebank standards for plant genetic resources for food and agriculture**. Rev. ed. Roma, 2014. 169 p.

FÁVERO, A. P. et al. Successful crosses between fungal-resistant wild species of *Arachis* (Section Arachis) and *Arachis hypogaea*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, p. 353-365, 2015a.

_____. New hybrids from peanut (*Arachis hypogaea* L.) and synthetic amphidiploid crosses show promise in increasing pest and disease tolerance. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, p. 16694-16703, 2015b.

HAJJAR, R.; HODGKIN, T. The use of wild relatives in crop improvement: a survey of developments over the last 20 years. **Euphytica** 156:1–13. 2007.

MICHELOTTO, M. D. et al. Identifying Amphidiploids Resistant to Foliar Fungal Diseases. **Crop Science**, v. 56, p. 1792-1798, 2016.

NASS, L. L. et al. Pré-melhoramento de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 683- 716.

POEHLMAN, J. M.; SLEPER, D. A. **Breeding field crops**. Iowa State University Press, Ames, 1995. 417p.

VAVILOV, N. I. Tzentry proiskhozhdeniya kulturnykh rastenii. [The centers of origin of cultivated plants]. **Works of Applied Botany and Plant Breeding**. 16(2), 1926. 248 p. Em russo e inglês.

_____. The phytogeographical basis for plant breeding. 17-75 p. In: **Theoretical Basis for Plant Breeding**, Moscou, v. 1, 1935. Em russo.

YU, X.; LI, X.; GUO, T. Genomic prediction contributing to a promising global strategy to turbocharge gene Banks. **Nature Plants**, v. 2, n. 16150, 2016.

ESTATÍSTICA APLICADA AO MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS

Juaci Vitória Malaquias

ESTATÍSTICA APLICADA AO MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS

Juaci Vitória Malaquias

Introdução

A Estatística Experimental tem por objetivo desenvolver estudos dos experimentos, incluindo o planejamento, a execução, a análise dos dados e a interpretação dos resultados, a fim de gerar informações úteis que orientarão a tomada de decisão. No caso das pesquisas que envolvem melhoramento genético, busca-se um determinado genótipo ou um grupo de genótipos que sejam mais produtivos e, ao mesmo tempo, com menor custo possível. Por essa razão, é tão importante explorar o local (ambiente) em que esse genótipo será cultivado, para que se possa ter maior escala de produção com menores custos e quantidades reduzidas de adubo.

Pode-se afirmar que a interação genótipo versus ambiente é o objeto de interesse no estudo de melhoramento genético de plantas, influenciando diretamente o ganho de seleção. A ocorrência de um genótipo melhor num ambiente, porém, pior em outro, pode acarretar uma maior dificuldade de recomendação de cultivares com ampla adaptabilidade.

Para se alcançar o objetivo proposto de estudar e de avaliar as variabilidades inerentes a interação genótipo x ambiente, o melhoramento genético lança mão de diversas técnicas e ferramentas que ajudam a elucidar que decisões devem ser tomadas, e a Estatística é uma dessas ferramentas amplamente utilizadas para esse fim. Com o objetivo de apresentar uma breve contextualização da aplicação do ferramental estatístico no campo do melhoramento genético, o presente documento fará algumas considerações dos principais

conceitos básicos que dizem respeito à pesquisa e experimentação; descrição das etapas do desenvolvimento do trabalho estatístico, justificando o porquê de se utilizar a Estatística; a apresentação dos principais delineamentos utilizados num estudo de melhoramento, com suas características, pontos fortes e fracos; o uso da análise multivariada no estudo do melhoramento genético; e algumas considerações acerca da análise conjunta de experimentos a partir da interação genótipos x ambientes.

Conceitos básicos referente à pesquisa-experimentação

Diz-se que a definição de experimento ou ensaio seja um trabalho previamente planejado, que segue determinados princípios básicos, no qual, faz-se a comparação entre os efeitos dos tratamentos estudados.

Tratamento pode ser definido como o método, o elemento ou o material cujo efeito desejou medir ou comparar em certo experimento. Assim, variedade de soja, espaçamento de cultura, métodos de prevenção ou adubação para cultura, são exemplos de tratamentos normalmente utilizados na pesquisa experimental.

A unidade experimental também conhecida por "parcela" é a unidade que vai receber o tratamento e fornecer os dados que deverão refletir o seu efeito. Dessa forma, uma planta, um vaso com plantas ou uma área de terreno com plantas, podem ser utilizadas como unidades experimentais num estudo de melhoramento.

O delineamento experimental é o planejamento utilizado na experimentação, por meio do qual os tratamentos serão atribuídos às parcelas, ou seja, a estratégia como os tratamentos serão distribuídos. Trata-se da estratégia de como estimar a influência dos tratamentos e dos fatores não controláveis ou erro experimental (VIVALDI, 1999). São exemplos de delineamentos: inteiramente ao acaso, blocos casualizados, quadrado latino, blocos incompletos, reticulados e blocos aumentados.

O erro experimental trata-se da variação por razão do acaso ou variação aleatória. É o conjunto dos efeitos de fatores em que o estudo não controlou a sua exposição. Os fatores não controlados são alheios aos efeitos dos tratamentos. As pequenas diferenças de fertilidade no solo, profundidade de semeadura um pouco menor ou maior do que a prevista, variação na constituição genética de animais ou plantas e pequenas variações nas doses de adubos, que causam variações entre as parcelas atribuídas a um mesmo tratamento, são efeitos relacionados ao erro experimental. Para minimizar a influência da variação do acaso, deve-se planejar o experimento de tal maneira que se consiga isolar os efeitos de todos os fatores que podem ser controlados (KRONKA, 2017).

Uma das condições básicas para se alcançar o sucesso nos programas de melhoramento genético é a eficiência na experimentação. Ramalho et al. (2005) e Fisher (1935) apresentam os princípios básicos da experimentação, que são a base dos delineamentos experimentais clássicos: repetição, casualização e controle local. A repetição diz respeito à quantidade de parcelas que receberão um mesmo tratamento. Os tratamentos devem ser repetidos para que se possa estimar o erro experimental. Sem o erro experimental não é possível realizar testes de hipóteses. O uso de um número adequado de repetições possibilita uma boa estimativa do erro experimental, melhorando as estimativas de interesse. No entanto, o número de repetições pode ser limitado, por exemplo, pelo número de tratamentos que serão comparados, pela disponibilidade de material e de área experimental, entre outros fatores. No caso da casualização ela refere-se à distribuição aleatória dos tratamentos às parcelas de modo que todas as parcelas tenham a mesma oportunidade de receber qualquer um dos tratamentos garantindo inclusive que os erros sejam independentes (MEAD e CURNOW, 1983). O controle local possui o papel de dividir o conjunto total de parcelas em subconjuntos (blocos) que sejam os mais homogêneos possíveis. Este princípio é utilizado para atenuar problemas de heterogeneidade ambiental (PRADO, 2010).

Etapas do trabalho estatístico

A aplicação da estatística ou o desenvolvimento do trabalho estatístico pode ser definido em sete importantes etapas: (1) definição do problema; (2) definição dos objetivos; (3) planejamento; (4) coleta dos dados; (5) crítica dos dados; (6) armazenamento dos dados; e (7) interpretação dos dados.

Na etapa de definição do problema, o objetivo compreende formular corretamente o problema a ser estudado; definir o objeto de estudo e realizar uma revisão bibliográfica sobre o objeto analisado. Nessa etapa, busca-se conhecer o que será pesquisado, ou seja, definir corretamente o problema. Em geral, essa definição é feita no formato de pergunta de pesquisa, por exemplo: Os preços de produtos agrícolas produzidos no Espírito Santo são menores dos que os produzidos no restante do Brasil? Qual é a relação da oferta de tomate e o índice pluviométrico?

A etapa de definição dos objetivos possui o propósito de definir os objetivos do estudo. É feita a avaliação dos objetivos que podem ou não ser alcançados. Deve-se ter o objetivo estabelecido antes de iniciar o processo de coleta de dados, por exemplo, verificar se os preços de produtos agrícolas produzidos no Espírito Santo são menores do que os produzidos no restante do Brasil; averiguar se existe relação entre a produção de tomates e o índice de precipitação e qual seria essa relação.

Na etapa do planejamento, propõe-se definir diretrizes e ações a fim de se resolver o problema de pesquisa ora definido; determinar o procedimento a se utilizar para a resolução do problema e algumas perguntas devem ser respondidas (quais dados deverão ser coletados? Como se devem obter estes dados? Por meio de Censo ou Amostragem?); definir o cronograma de pesquisa, se for o caso, qual o delineamento experimental a ser utilizado, qual o grau de precisão exigido, quais variáveis de interesse (variáveis respostas) serão analisadas, quais fatores (fontes de variação) serão considerados para o desenvolvimento do estudo, etc.

Após a etapa do planejamento, segue-se para a etapa de coleta dos dados. Nesta etapa, será realizada a operação de obtenção dos dados que serão utilizados na pesquisa. Tais dados podem ser classificados segundo a sua fonte, sendo declarado como fonte primária os dados levantados direto no campo; e fonte secundária os dados foram levantados por outra fonte. Cada uma das fontes de dados possui suas vantagens e desvantagens conforme o caso. Destacamos como vantagens da fonte de dados primária a possibilidade de se ter um maior detalhamento no que concerne ao interesse da pesquisa; porém, como desvantagem, está o alto custo para a obtenção dos dados e do planejamento da pesquisa. Sobre a fonte secundária de dados, pode-se apresentar como uma característica vantajosa, o baixo ou, na maioria dos casos, nenhum custo de obtenção dos dados utilizados para análise. Em contrapartida, uma grande desvantagem nessa modalidade de fonte para coleta de dados é a dificuldade em se encontrar dados que sejam capazes de responder exatamente ao problema de pesquisa estudado.

A etapa de crítica dos dados compreende uma importante etapa que precede a análise dos dados. Neste momento, é feita uma verificação dos dados coletados, a fim de se evitar possíveis erros que afetariam os resultados da análise. Nesta etapa, fazem-se testes com intuito de identificar perguntas que foram mal compreendidas, que ocasionaram uma troca de respostas e/ou omissões. O processo de crítica será realizado sob dois níveis: interno e externo. A crítica externa tem o propósito de corrigir as imperfeições ocorridas no processo de coleta dos dados, por exemplo, a deficiência do observador. A crítica interna tem o objetivo de verificar a exatidão das informações obtidas.

A etapa de armazenamento dos dados tem a finalidade de resumir todos os dados por meio do seu agrupamento, da organização e da tabulação dos dados da pesquisa. Entre a forma como os dados podem ser armazenados pode-se elencar: mapas, tabelas, matrizes e gráficos.

Depois de terminadas todas as etapas anteriores, conclui-se o processo de pesquisa com a interpretação dos dados. Nesta etapa, tiram-se conclu-

sões acerca do tema de pesquisa (respondendo as perguntas de pesquisa e/ou levantando novas hipóteses); são geradas medidas estatísticas que resumem os dados e auxiliam a responder o problema estudado.

Planejamento experimental

Diferentes tipos de arranjos em delineamentos experimentais têm sido aplicados para o desenvolvimento de estudos no campo do melhoramento genético de plantas. Os principais utilizados são: arranjo fatorial, parcela subdividida, experimentos em faixa; e alguns delineamentos especiais, por exemplo, blocos incompletos, lattice (reticulado) e blocos aumentados (blocos de Federer).

Ainda sim, tais avaliações podem ser feitas em um ou em vários ambientes. Quando esses estudos são feitos em mais de um local denominam-se análise de grupo de experimentos ou análise conjunta de experimentos.

Arranjo fatorial – existem casos em que vários fatores devem ser estudados simultaneamente para que possam nos conduzir a resultados de interesse. Os experimentos fatoriais (arranjo fatorial) são exatamente aqueles nos quais são estudados, ao mesmo tempo, os efeitos de dois ou mais tipos de tratamentos. Nesse caso, os tipos de tratamentos ao referido como fatores. Nesse tipo de delineamento, cada subdivisão de um fator é chamada de nível do fator cujos tratamentos são todas as combinações possíveis entre os diversos fatores nos seus diferentes níveis. Pode-se destacar como vantagens desse tipo de delineamento a permissão de estudar os efeitos simples, efeitos principais e os efeitos das interações entre eles; a utilização de todas as parcelas no calculo dos efeitos principais dos fatores e Dops efeitos das interações, motivo pelo qual o número de repetições é elevado. Como desvantagem, cita-se a questão de que, como os tratamentos são constituídos por todas as combinações possíveis entre os níveis dos diversos fatores, a quantidade de tratamentos aumenta substancialmente. Outro ponto negativo na aplicação desse delineamento é que a análise estatística é muito

mais trabalhosa e a interpretação dos resultados se torna mais difícil à medida que aumentamos o número de níveis e de fatores no experimento.

Parcela subdividida – o delineamento em parcelas subdivididas é apropriado para experimentos fatoriais em que os fatores envolvidos, apresentam características diferentes. É comum, em experimentos fatoriais, o número de combinações de tratamentos ser superior ao número de parcelas homogêneas por bloco. Assim, pode-se optar por esse delineamento aplicando os níveis de um fator nas parcelas disponíveis, subdividindo-as espacialmente ou temporalmente para receber os níveis do outro fator. Uma vantagem desse delineamento está em poder indicar para condição de subparcela o fator que requer maior precisão para o estudo.

Experimentos em faixa – em alguns experimentos fatoriais, embora o delineamento em parcelas subdivididas pareça ser adequado, a casualização do fator secundário traz complicações de ordem técnica na instalação e na condução do experimento que podem até inviabilizar a sua implantação. Neste tipo de delineamento, os sorteios são feitos das faixas continuas para cada nível dos fatores, de maneira que as faixas de um fator se cruzem com as do outro fator, garantindo as combinações de níveis dos dois fatores. Uma ótima vantagem está em ser um delineamento de grande utilidade para experimentos em que a aplicação de ambos os fatores necessitem de máquinas agrícolas. Como desvantagem está o fato de ocorrer à diminuição dos graus de liberdade para avaliação das estimativas da variância aleatória, usada nos testes estatísticos.

Blocos incompletos – neste delineamento, o número de parcelas por bloco deve ser igual ao número de tratamentos estudados. Quando não é possível utilizar todos os tratamentos em cada um dos blocos deve-se utilizar um delineamento chamado blocos incompletos. No delineamento em blocos incompletos, não é necessário que os blocos tenham todos a mesma dimensão nem é preciso que cada tratamento se repita o mesmo número de vezes (BRITO et. al., 2009). Quando os blocos têm o mesmo número de

parcelas temos um delineamento em blocos incompletos balanceados ou parcialmente balanceados. Uma vantagem dos delineamentos em blocos incompletos está em permitir a redução do número de repetições, sem prejuízo à precisão experimental. Nessas condições, é possível a comparação de um elevado número de tratamentos com boa precisão relativa.

Blocos aumentados (blocos de Federer) – os blocos aumentados propostos por Walter T. Federer foram criados para solucionar problemas experimentais inerentes ao melhoramento genético de plantas. Nesse delineamento, escolhe-se um delineamento padrão para as variedades testemunhas e aumenta-se o número de parcelas de seus blocos para acomodar os novos clones (tratamentos novos ou adicionais). Trata-se de uma estratégia para se testar um grande número de clones. Segundo Peternelli et al. (2009), os melhoristas têm buscado alternativas que contornem situações que podem ocorrer restrições financeiras e físicas, como mão de obra, área experimental e material propagativo (SOUZA et al., 2000). Peternelli et al. (2009) afirmam que o uso de delineamentos aumentados é atrativo, pois, no caso de falta de material propagativo, os tratamentos podem ser testados com apenas uma repetição. Inclusive, nos programas de melhoramento como, por exemplo, de cana-de-açúcar, têm sido utilizados também a análise de grupo de experimentos em blocos casualizados com tratamentos comuns e o delineamento em blocos aumentados duplicados. Este último oferece, por sua vez, a vantagem de ser menos trabalhoso no momento da instalação em campo (PETERNELLI et al., 2009). Porém, vale ressaltar que devido ao fator de se ter tratamentos com apenas uma única repetição, pesquisadores que empregam delineamentos aumentados no melhoramento de plantas, tem tido problemas relativo à estimação de parâmetros genéticos e fenotípicos em razão da baixa precisão das estimativas (SOUZA, 1997). Dessa forma, carece de maior discussão o uso desse tipo de delineamento na estimação de parâmetros genéticos.

Análise multivariada

Segundo Cruz e Regazzi (1997), a divergência genética entre um grupo de progenitores tem sido avaliada com o objetivo de identificar as combinações híbridas de maior efeito heterótico e maior heterozigose[1], de tal maneira que em suas gerações seguintes se tenha maior possibilidade de recuperação de genótipos superiores.

No estudo sobre melhoramento, a divergência genética é de grande importância, pois, quando adequadamente explorada, pode reduzir a vulnerabilidade da cultura a doenças e, ao mesmo tempo, acelerar o progresso genético para determinados caracteres (CUI et al., 2001; BARBIERI et al., 2005).

Várias técnicas de análise multivariada têm sido utilizadas para avaliar a divergência entre acessos e para selecionar os descritores mais importantes na discriminação dos acessos de um banco de germoplasma (PEREIRA, 1992; RODRIGUES et al., 2002). As principais técnicas multivariadas utilizadas para o estudo da divergência genética têm sido a análise de agrupamento (também conhecida por análise de cluster), análise de componentes principais e análise por variáveis canônicas.

Os métodos aglomerativos diferem dos demais, em razão de dependerem fundamentalmente de medidas de dissimilaridade estimadas previamente, como a distância Euclidiana ou distância generalizada de Mahalanobis. Já no método dos componentes principais e também no da análise canônica, o objetivo é avaliar a similaridade dos progenitores por intermédio de uma dispersão gráfica, em que se consideram, em geral, dois eixos cartesianos (CRUZ e REGAZZI, 1997).

[1] Heterozigose diz respeito, no campo da genética, ao estado em que o indivíduo é dotado de alelos diferentes para um determinado gen.

Análise conjunta de experimentos: interação genótipo x ambiente

A análise conjunta de experimentos é de grande interesse para os melhoristas de plantas, pois, as estimativas de parâmetros genéticos baseadas em experimentos conduzidos em um único ambiente são superestimadas (RAMALHO, 1977). Isso ocorre porque, além do componente genético, há o componente da interação Genótipo x Ambiente envolvido nessas estimativas (REGAZZI et al.,1999). Segundo Gardner, em certos casos, o erro das estimativas obtidas com base em somente um ambiente é de quase 50%, mostrando que aquelas baseadas em experimentos conduzidos em dois ou mais ambientes são mais realistas (RAMALHO, 1977).

Segundo Regazzi (1999), o processo tradicional de investigar as interações Genótipo x Ambiente é a análise de variância conjunta, isto é, análise de grupos de experimentos. Por meio dessa análise, a magnitude das interações é avaliada pela variância dos efeitos de genótipos x locais; genótipos x anos; genótipos x anos x locais e outros, conforme o propósito do melhorista. Para a realização da análise conjunta de experimentos, é pressuposta a homogeneidade dos quadrados médios residuais relativos a todos os experimentos envolvidos na análise.

Squilassi (2003) afirma em seu estudo que a interação genótipos x ambiente pode ser definida como sendo o efeito diferencial dos ambientes sobre os genótipos (CHAVES, 2001). De outro modo, resulta da resposta diferencial dos genótipos à variação ambiental.

No início, a maior evidência era dada às análises estatísticas utilizadas para comparar os desempenhos de diferentes genótipos em diferentes ambientes, e em métodos estatísticos para caracterizar genótipos como estáveis (performance consistente) ou instáveis (performance inconsistente) nos diferentes locais (SQUILASSI, 2003).

Porém, isto não era o suficiente para tratar as causas do problema. Os estudiosos do melhoramento almejam saber quanto de um ganho genético

obtido em um ambiente será mantido em outro. Segundo Kang (1998), a relação da estatística e a interação genótipo x ambiente podem ser comparadas como a existente entre o bêbado e o poste de luz; serve para suporte, não para iluminação. Inclusive, o autor reforça que o estudo genótipo x ambiente é um tema prioritário para o melhoramento e não apenas um assunto biométrico (SQUILASSI, 2003).

Squilassi (2003) também afirma que em razão da importância desse tipo de estudo, o melhorista deve analisar sua magnitude e significância, quantificar seus efeitos sobre as técnicas de melhoramento e estratégias de difusão de tecnologia e fornecer subsídios que possibilitem assumir procedimentos para sua minimização e/ou aproveitamento (CRUZ e REGAZZI, 1997).

A interação genótipo x ambiente é de grande importância para os estudiosos do melhoramento no desenvolvimento de cultivares melhoradas, pois a ordem dos genótipos em diferentes locais pode diferir estatisticamente, gerando problemas para a seleção de plantas (SQUILASSI, 2003).

Em um determinado ambiente a manifestação fenotípica é o resultado da ação do genótipo sob influência do meio. Contudo, quando se considera uma série de ambientes, detecta-se, além dos efeitos genéticos e ambientais, um efeito adicional, proporcionado pela interação genótipo x ambiente (CRUZ e REGAZZI, 1997).

Segundo Squilassi (2003), o conhecimento das relações entre genótipo e fenótipo em diferentes ambientes auxilia em predições mais precisas sobre a resposta à seleção em espécies com habitats heterogêneos, quer espacial ou temporal. Se a expressão fenotípica de um genótipo para uma dada característica é dependente de condições ambientais, medidas de sua herdabilidade poderão se alterar de acordo com variações das condições ambientais.

Com a gama de ofertas de técnicas estatísticas disponíveis percebe-se que o geneticista e o melhorista têm a estatística como aliada na construção de conhecimento, uma ferramenta de uso essencial para fundamentar e orientar a sua tomada de decisão.

Referências

BARBIERI, R. L.; LEITE, D. L.; CHOER, E.; SINIGAGLIA, C. Divergência genética entre populações de cebola com base em marcadores morfológicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 303-308, 2005.

BRITO, E. de.; HASHIMOTO, E. M. Delineamento em blocos incompletos. Disponível em: <http://verde.esalq.usp.br/~jorge/cursos/seminarios_2009/BCI_Texto.pdf>. Acesso em:
05 jan. 2017.

CHAVES, L. J. Interação de genótipos com ambientes. In.: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento-plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 673-713.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1997. 390 p.

CUI, Z. et al. Phenotypic diversity of modern Chinese and North American soybean cultivars. **Crop Science**, Saint Paul, v. 41, p. 1954-1967, 2001.

FISHER, R. A. **The design of experiments**. Edinburgh: Oliver and Boyd, 1935.
p. 252.

KANG, M.S. Using genotype-by-environment interaction for crop cultivar development. **Advances in Agronomy**, v. 62, p. 199-252, 1998.

KRONKA, S. do N. **Apostila estatística experimental**. Disponível em: <http://www.abhorticultura.com.br/eventosx/trabalhos/ev_1/MINI01.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2017.

MEAD, R.; CURNOW, R. N. **Statistical methods in agricultural and experimental biology**. Chapman & Hall, 1983.

PEREIRA, A.V.; VENCOVSKY, R.; CRUZ, C. D. Selection of botanical and agronomical descriptors for the characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germoplasm. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 1, p. 115-124, 1992.

PETERNELLI, L.; SOUZA, E. F. M.; BARBOSA, M. H. P.; CARVALHO, M. P. Delineamentos aumentados no melhoramento de plantas em condições de restrições de recursos. **Ciência Rural**, v.39, n.9, dez. 2009.

PRADO, P. E. R. **Estratégias de análise de experimentos de testes clonais de Eucalyptus spp**. 2009. 48 f. Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

RAMALHO, M. A. P. **Eficiência relativa de alguns processos de seleção intrapopulacional no milho baseados em famílias não endógamas**. Dissertação (Mestrado). Piracicaba: ESALQ, 1977. 121 p.

REGAZZI, A. J.; SILVA, H. D.; VIANA, J. M. S.; CRUZ, C. D. Análise de experimentos em látice quadrado com ênfase em componentes de variância. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 11, p. 1987-1997, nov. 1999.

RODRIGUES, L. S.; ANTUNES, I. F.; TEIXEIRA, M. G.; SILVA, J. B. S. Divergência genética entre cultivares locais e cultivares melhoradas de feijão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 9, p. 1275-1284, set. 2002.

SOUZA, A. P. et al. Alternativas experimentais na avaliação de famílias em programas de melhoramento genético do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 1765-1771, 2000.

SOUZA, E. A. **Alternativas experimentais na avaliação de progênies em programas de melhoramento genético vegetal**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Piracicaba: ESALQ, 1997. 122 p.

SQUILASSI, M. G. **Interação de genótipos com ambientes**. Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003, 47 p. Disponível em: <http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2003/Livro_GXE.pdf>. Acesso em: 02 de jan. 2017.

VIVALDI, L. J. **Análise de experimentos com dados repetidos ao longo do tempo ou espaço**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1999.

MARCADORES MOLECULARES APLICADOS AO MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS

Fábio Gelape Faleiro
Renato Fernando Amabile
Carlos Bernard Moreno Cerqueira Silva

MARCADORES MOLECULARES APLICADOS AO MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS

Fábio Gelape Faleiro
Renato Fernando Amabile
Carlos Bernard Moreno Cerqueira Silva

Introdução

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), do sequenciamento automático do DNA e das modernas técnicas de genotipagem em alta escala, foram desenvolvidas poderosas técnicas para a obtenção dos marcadores genéticos moleculares. Esses marcadores têm sido aplicados com sucesso como ferramentas auxiliares em diferentes etapas do melhoramento genético de plantas e vários são os artigos que evidenciam tais aplicações (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; FALEIRO, 2007; BORÉM e CAIXETA, 2009; FALEIRO, 2011a).

Marcadores moleculares podem ser definidos como marcadores genéticos baseados na detecção de isoenzimas ou sequencias 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 a partir de cultura de células ou tecidos; a possibilidade de gerar informações genéticas por loco, no caso de marcadores codominantes; e a possibilidade de seleção indireta de características de interesse, o que pode impactar positivamente na precisão e acurácia das avaliações das plantas, aumentando o ganho genético e a eficiência dos programas de melhoramento.

Considerando suas vantagens, pode-se dizer que 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. Neste capítulo, são apresentadas informações gerais sobre os diferentes tipos de marcadores moleculares, os princípios da utilização desses marcadores no melhoramento genético vegetal, as principais aplicações dos marcadores moleculares em estudos sobre recursos genéticos, no pré-melhoramento, no melhoramento e no pós-melhoramento bem como algumas inovações tecnológicas na área dos marcadores moleculares.

Diferentes tipos de marcadores moleculares

Existem dezenas de marcadores moleculares cujos princípios metodológicos têm sido descritos por vários autores, incluindo uma ampla bibliografia produzida no Brasil (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; FALEIRO, 2007; CAIXETA et al., 2009). Cada tipo de marcador apresenta vantagens e desvantagens, sendo estas classificadas a parir da quantidade de polimorfismos gerados, da complexidade da metodologia de obtenção, da infraestrutura necessária, da velocidade de obtenção dos marcadores, da possibilidade de obtenção de informações multialélicas (marcadores codominantes), da reprodutibilidade, da precisão e da acurácia dos marcadores obtidos, da necessidade de informações prévias sobre análises de sequência da espécie-alvo para obtenção dos marcadores bem como do custo envolvido na obtenção e análise dos marcadores.

A escolha de qual tipo de marcador molecular utilizar em determinado estudo dependerá, dentre outros fatores, da infraestrutura e dos recursos financeiros disponíveis para o investimento; da disponibilidade de recursos humanos com treinamento apropriado; do nível de conhecimento prévio associado à genética e à biologia molecular da espécie a ser estudada e principalmente do objetivo do estudo e das perguntas a serem respondidas com o uso dos marcadores moleculares (FALEIRO, 2007). Muitas perguntas

podem surgir nas diferentes etapas dos programas de melhoramento genético vegetal e diferentes tipos de marcadores moleculares podem ser utilizados para auxiliar o melhorista.

Princípio científico do uso dos marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de melhoramento genético

Embora exista um grande número de marcadores moleculares, o princípio da análise de tais marcadores é o mesmo: marcadores comuns entre plantas significam semelhanças genéticas entre elas e marcadores não comuns significam diferenças. Os dados sobre semelhanças e diferenças genéticas entre plantas, acessos, seleções, variedades, cultivares permitem gerar uma grande quantidade de informações sobre a diversidade genética e os relacionamentos filogenéticos existentes entre esses materiais. Tais informações geradas pelos marcadores moleculares representam uma amostra considerável do DNA ou do genoma de cada material genético, representando, em potencial, uma porção significativa das informações responsáveis direta e indiretamente (em razão das interações moleculares e ambientais) pelas características de um determinado indivíduo. Dessa forma, se o DNA desse indivíduo é analisado, indiretamente podem ser analisadas características fenotípicas de interesse.

Faleiro et al. (2011b) descrevem algumas das principais análises que podem ser feitas com o uso de marcadores moleculares, a exemplo dos estudos de caracterização e quantificação da diversidade genética, mapeamento genético e análises filogenéticas. Em todas essas análises, diferentes etapas estão envolvidas na metodologia científica, perpassando desde a extração de amostras de DNA com qualidade e quantidade suficiente, até a amplificação, a separação e a detecção dos marcadores por meio do uso corantes, radioatividade ou fluorocromos (dependendo do tipo de marcador).

Após a detecção dos marcadores são necessárias e, na maioria dos casos, indispensáveis as análises genéticas por meio de metodologias de bioin-

formática utilizando diferentes tipos de programas ou aplicativos, muitos dos quais estão disponíveis de forma gratuita. Apesar dos avanços obtido na área da bioinformática, 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 e uso de aplicativos e de algoritmos para a organização de bancos de dados, respectivas análises e modelagem aplicadas a programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e de melhoramento genético são demandas prioritárias para a pesquisa. 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 (FALEIRO, 2011b). De toda forma, o conhecimento da genética mendeliana, molecular e quantitativa é fundamental para a correta interpretação dos dados gerados pelos diferentes tipos de marcadores moleculares.

Aplicações práticas dos marcadores moleculares

Com o uso dos marcadores moleculares é possível estimar uma grande quantidade de informações úteis para o direcionamento de ações associadas à caracterização, à conservação e ao uso de recursos genéticos, a exemplo da estimativa de identidade genética, diversidade, frequência gênica, relacionamentos filogenéticos, mapeamento genético, seleção assistida, entre outras. Na Figura 1, são apresentadas as principais aplicações dos marcadores moleculares em uma ordem cronológica, subsidiando diferentes atividades desde a coleta e a caracterização de recursos genéticos, passando por atividades relacionadas ao pré-melhoramento, ao melhoramento e ao pós-melhoramento (FALEIRO et al., 2008a). As principais aplicações em cada uma dessas etapas serão resumidamente apresentadas e exemplificadas nos tópicos seguintes.

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

Fonte: Faleiro (2011a).

Aplicações dos marcadores em estudos sobre recursos genéticos

As atividades relacionadas à conservação, à caracterização e ao uso de recursos genéticos estão entre as mais relevantes da pesquisa agropecuária brasileira e mundial (FALEIRO e JUNQUEIRA, 2011). A existência da variabilidade genética tem permitido a obtenção, via melhoramento genético, de variedades mais produtivas, resistentes a pragas e a doenças e adaptadas aos mais diferentes ambientes. Atualmente, existe uma grande preocupação com a significativa redução da variabilidade genética de plantas, a qual representa um sério risco para o avanço dos programas de melhoramento e consequentemente para a sustentabilidade da agropecuária (MARIANTE et al., 2009). Essa perda de variabilidade genética, também chamada erosão genética, significa a perda de genes ou combinações gênicas que possuem valor atual ou potencial para a agropecuária. Embora o fenômeno da erosão genética possa ser irreversível, ações devem ser tomadas para prevenir ou minimizar as suas causas, destacando-se entre tais iniciativas a conservação da variabilidade genética via formação de bancos de germoplasma (NASS, 2007).

Além da conservação dos recursos genéticos, atividades de caracterização são fundamentais para que a variabilidade genética conservada seja utilizada e aproveitada de forma prática nos programas de melhoramento genético. Diferentes grupos de características são utilizados na caracterização de acessos conservados em bancos de germoplasma, destacando-se as características ecológicas, morfológicas, agronômicas e moleculares (FALEIRO et al., 2011). Tais informações tornam-se ainda mais úteis quando avaliadas conjuntamente, a exemplo da combinação de dados oriundos dos marcadores moleculares com o Sistema de Informação Geográfica (SIG), que, juntos, permitem a análise da distribuição geográfica da variabilidade genética, identificando as regiões de maior ou menor diversidade, recuperando informações importantes sobre as condições ambientais e biológicas dos locais

de coleta de cada acesso e orientando a escolha de locais para conservação *in situ* e para coletas visando a conservação *ex situ* (COSTA et al., 2005). Essa combinação também permite estabelecer estratégias de amostragem para a coleta de recursos genéticos com relação à definição do número de acessos, tamanho de cada população, análise quantitativa e qualitativa das regiões onde serão feitas as coletas (NEBAUER et al., 1999).

Os marcadores moleculares também potencializam o sucesso da identificação de acessos duplicados ou redundantes em coleções de germoplasma. Estima-se que 33% dos acessos conservados em bancos de germoplasma são duplicados ou redundantes, o que implica maiores custos de conservação, principalmente de acessos mantidos em bancos ativos de germoplasma, especialmente acessos de espécies perenes com sementes recalcitrantes que são mantidos no campo (FALEIRO et al., 2002). Outro problema em bancos de germoplasma que pode ser equacionado com o uso de marcadores moleculares é a contaminação ou perda da estabilidade genética dos acessos. A perda da estabilidade genética é em razão das mudanças nas frequências gênicas, as quais podem ocorrer por causa da seleção, da mutação, da erosão genética e da 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 e, dessa forma, subsidiar as melhores estratégias de manutenção e manejo dos acessos no banco de germoplasma (PARZIES et al., 2000).

As análises de diversidade genética de acessos e populações e suas associações com as frequências gênicas de interesse são de grande importância em todas as etapas dos programas de conservação, caracterização e uso de recursos genéticos (FALEIRO, 2011a). Um exemplo prático da aplicação dos marcadores moleculares neste tipo de estudo é o trabalho realizado por

Faleiro et al. (2004a), em que foram identificados e selecionados clones de cacaueiro produtivos, resistentes à vassoura-de-bruxa e geneticamente distinto das tradicionais fontes de resistência a esta doença, sendo acessos de extrema importância para uso em programas de melhoramento e multiplicação para distribuição aos produtores.

Os estudos de diversidade genética utilizando marcadores moleculares também são úteis para classificação botânica e filogenia. Com relação à classificação botânica, 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. Com relação à filogenia, 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 baseadas em dados de sequências de DNA, RNA, proteínas, inserções de elementos transponíveis ou outros marcadores moleculares (ARRIEL et al., 2009). Conforme relatado por Faleiro (2011a), a despeito dos marcadores moleculares, principalmente aqueles baseados em análises de sequência, possuírem grande potencial para auxiliar em trabalhos de classificação botânica e em estudos de filogenia, origem genética e evolução, eles não substituem o trabalho essencial e de grande importância dos botânicos e taxonomistas.

O conhecimento da diversidade genética, decorrente dos estudos moleculares, também possibilitam maior sucesso na composição de coleções nucleares, coleções nucleares temáticas e coleções de trabalho. Coleção nuclear é uma subamostra de acessos da coleção completa de recursos genéticos de uma cultura, na qual se procura representar o máximo da variabilidade genética com um mínimo de redundância. Em termos médios, uma coleção nuclear apresenta ~10% dos acessos da coleção completa, representando ~80% da variabilidade genética, a exemplo das proposições apresentadas para estabelecimento de coleções associadas a seringueira (gênero *Hevea*), cacaueiro (gênero *Theobroma*), pimentas (gênero *Capsicum*) e maracujazeiro (gênero *Passiflora*) (SOUZA et al., 2015; SANTOS et al., 2015; CERQUEIRA-SILVA et al., 2014; CERQUEIRA-SILVA et al., 2015; CARVALHO et al., 2015).

O menor número de acessos selecionados para compor uma coleção nuclear, por exemplo, pode viabilizar uma caracterização mais precisa e acurada dos acessos, principalmente considerando características agronômicas quantitativas que exigem avaliações em delineamentos experimentais, preferencialmente em diferentes ambientes. As coleções nucleares temáticas são aquelas cujos acessos apresentam variabilidade genética específica de uso estratégico em programas de melhoramento genético, por exemplo, resistência a uma doença, tolerância à seca, adaptação a um sistema de produção.

Em linhas gerais, os marcadores moleculares do DNA são muito úteis na caracterização do germoplasma, complementando os demais tipos de marcadores genéticos (ecológicos, morfológicos e agronômicos). Este trabalho de caracterização é a base para subsidiar o uso prático dos recursos genéticos em programas de melhoramento genético e também seu uso direto.

Aplicações dos marcadores no pré-melhoramento

As atividades de pré-melhoramento envolvem a identificação de genes e características de interesse em germoplasma exótico ou em populações que não foram submetidas a qualquer processo de melhoramento (espécies e parentes silvestres e raças locais) e sua posterior incorporação em materiais elites agronomicamente adaptados (NASS e PATERNIANI, 2000). Tais atividades têm sido realizadas para diferentes espécies de plantas cultivadas com diferentes estratégias e vários exemplos de sucesso (FALEIRO et al., 2008b; LOPES et al., 2011).

Uma primeira etapa em atividades de pré-melhoramento que pode ser auxiliada por marcadores moleculares é a escolha de potenciais genitores para compor a base de cruzamentos inter e intraespecíficos visando à maximização da heterose e das combinações gênicas desejadas. 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. Estudos sobre o grau de parentesco, pedigree, paternidade e ascendência genética podem ser realizados com precisão e acurácia usando os marcadores moleculares. Confirmação da fecundação cruzada e de autofecundação, bem como estudos sobre o sistema reprodutivo, podem ser realizados com o auxílio dos marcadores moleculares.

Outra etapa importante em atividades de pré-melhoramento é a recuperação do genoma recorrente após a hibridação inicial. Normalmente, o método dos retrocruzamentos é utilizado para este fim. Nesse método, após cada ciclo de retrocruzamento, a proporção do genoma do genitor recorrente é recuperada e a do genitor doador é reduzida pela metade, de forma 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 e 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 a 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 (FALEIRO et al., 2004b; FONSECA et al., 2009).

A utilização dos marcadores moleculares nas atividades de pré-melhoramento também perpassa a construção de mapas genéticos e mapas comparativos. 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. 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 e TANKSLEY, 1993). Essas análises são chamadas de mapeamento comparativo ou mapeamento de sintenia genômica.

Aplicações dos marcadores no melhoramento

As atividades envolvendo os métodos de seleção e recombinação são o eixo principal de qualquer programa de melhoramento. Para a identificação, a seleção e a introgressão de novos genes, o uso de marcadores moleculares mostram-se como ferramentas de grande importância. O desenvolvimento de um número praticamente ilimitado de marcadores genéticos moleculares associados à evolução dos aparatos computacionais para cálculos de cossegregação, de agrupamento e de distâncias entre as marcas e sua associação com características de interesse tem permitido o mapeamento de importantes genes em diferentes espécies (CARNEIRO e VIEIRA, 2002). Esse mapeamento tem sido feito tanto para genes associados a características qualitativas quanto para genes associados a características quantitativas. O mapeamento gênico apresenta muitas aplicações como possibilitar os estudos de herança e de efeitos dos genes em características de interesse, o isolamento de genes e a seleção assistida, ou seja, a seleção indireta de características de interesse com base em marcadores moleculares (SAMM).

Considerando as informações passíveis de serem obtidas, com o auxílio dos marcadores moleculares, a exemplo da identificação de acessos geneticamente divergentes e/ou convergentes, o mapeamento de genes e/ou conjuntos de genes, a utilização dos marcadores moleculares na seleção assistida de características qualitativas tornam-se uma realidade, embora existam, ainda, algumas restrições por parte dos melhoristas. Nesse contex-

to, 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 características 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, 2011a).

Quando pensamos em características quantitativas, ou seja, características controladas por vários genes e fortemente influenciadas pelo ambiente, a seleção assistida por marcadores moleculares é mais complexa. Existem, na literatura científica, numerosos trabalhos de detecção e mapeamento de locos para características quantitativas Quantitative Trait Loci (QTLs)) utilizando marcadores moleculares, entretanto poucos são os exemplos de variedades comerciais obtidas com o auxílio de marcadores moleculares na seleção desses QTLs. Pode-se citar algumas dificuldades da utilização da seleção assistida de características quantitativas por marcadores moleculares como a baixa variabilidade genética dos genitores utilizados nos trabalhos de mapeamento, a baixa qualidade da informação de ligação dos marcadores moleculares e os QTLs, as interações entre os QTLs identificados e o ambiente, a dificuldade de selecionar concomitantemente vários QTLs e várias características muitas vezes correlacionadas. Outra dificuldade é validar os QTLs para outras populações e outros ambientes de seleção.

Apesar das inúmeras dificuldades citadas, existem casos de sucesso na SAMM de características quantitativas como a transferência de QTLs de efeito maior para genótipos elite (EATHINGTON et al., 1997), a identificação e a posterior transferência de alelos (QTLs) de interesse agronômico de acessos não adaptados ou silvestres para genótipos elite (TANKSLEY et al., 1996). 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 e RANGEL, 2005). A integração do método dos retrocruzamentos com a SAMM de características quantitativas tem sido referenciada na literatura como retrocruzamento avançado de QTLs (AB-QTLs) (FERREIRA e RANGEL, 2005; FERREIRA e FALEIRO, 2008). Uma nova alternativa para a SAMM de características quantitativas é um novo método de seleção chamado seleção genômica ampla (SGA) ou Genomic Wide Selection (GWS) proposto por Meuwissen et al. (2001). Recentemente, com o desenvolvimento de marcadores do tipo Single Nucleotide Polymorphism (SNP), com as novas tecnologias de sequenciamento de alto desempenho High Throughput (HT) e Ultra High Throughput (UHT) 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 e YU, 2007).

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 esses autores, 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 de interesse, podendo ser utilizados na seleção indireta.

Marcadores moleculares também tem uma importante aplicação no melhoramento relacionada à predição de desempenho de híbridos simples. De forma complementar aos testes de capacidade geral e específica de combinação e estimativas de distância genética entre genitores para inferências sobre a heterose, marcadores moleculares podem ser utilizados para a predição do desempenho de híbridos baseada no uso de modelos mistos, mais

especificamente do Best Linear Unbiased Predictor (BLUP). 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.

Aplicações dos marcadores no pós-melhoramento

As atividades de pós melhoramento envolvem o conhecimento detalhado da cultivar quanto a sua genética e o seu comportamento em diferentes ambientes de cultivo. Envolvem também o processo sistematizado e controlado de produção de sementes e mudas com identidade e qualidade genética, as quais serão comercializadas e utilizadas pelos produtores. Entre as aplicações dos marcadores moleculares nessa fase dos programas de melhoramento, pode-se citar a análise da homogeneidade e pureza genética das sementes. 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).

Segundo Schuster et al. (2009), o monitoramento e o 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. Misturas genética podem ocorrer nas fases finais dos programas de melhoramento genético, nos campos de multiplicação de sementes e nos locais de estocagem e armazenamento.

A análise da identidade genética (*fingerprinting*), a caracterização molecular de variedades e cultivares e sua utilização na proteção da propriedade

intelectual ou do direito do obtentor são também aplicações diretas dos marcadores moleculares no pós-melhoramento (SCHUSTER et al., 2009). As cultivares melhoradas tendem a ser muito parecidas, sendo mais difícil de discriminá-las, com base em características morfológicas. 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. 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.

Inovações tecnológicas na área dos marcadores moleculares

Nos últimos anos, houve uma verdadeira revolução nas técnicas de obtenção de marcadores moleculares, de genotipagem em larga em escala e de estudos de associação dos marcadores a características de interesse e sua seleção assistida. Essa revolução trouxe uma nova perspectiva para a obtenção e o uso de marcadores moleculares em programas de melhoramento vegetal.

Uma inovação tecnológica de grande impacto é o sequenciamento de alto desempenho, de alta escala ou de nova geração, chamado de Next-Generation Sequencing (NGS) ou High-Throughput Sequencing (DAVEY et al., 2011; GRATTAPAGLIA et al., 2011; SANSALONI et al., 2011; HIRSCH et al., 2014). Essa tecnologia envolve um número de técnicas modernas de sequenciamento como a llumina (Solexa), Roche 454, Ion torrent: Proton/PGM e SOLiD, que permitem o sequenciamento de DNA e RNA de forma muito mais rápida e com custo muito menor que a tradicional técnica de sequenciamento de Sanger, o que tem revolucionado os estudos genômicos e de biologia molecular, principalmente os estudos envolvendo a genotipagem por sequenciamento (GbS) (POLAND e RIFE, 2012; ELSHIRE et al., 2011; TRUONG et al., 2012; SCHLOTTERER et al., 2014). Outra inovação foi o desenvolvimento dos

marcadores moleculares Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) ou marcadores de polimorfismos de nucleotídeo único. Os SNPs são marcadores bialélicos; podem ocorrer em regiões codificadoras, regulatórias ou em espaços intergênicos; são extremamente abundantes no genoma e distribuídos de forma homogênea, o que permite a construção de mapas genéticos extremamente densos e estudos muito precisos e acurados de associação genômica ampla ou Genome-Wide Association Study (GWAS). Por meio do GWAS, é possível identificar marcadores SNPs associados a características de interesse e utilizá-los em na seleção genômica ampla ou Genome-Wide Selection (GWS). Por meio desses estudos de associação em mapas com alta cobertura de SNPs, é possível explicar toda variabilidade genética aditiva de uma característica por meio dos efeitos dos SNPs distribuídos no genoma, o que permite estimar o valor genético de um indivíduo com base nos genótipos de todos os marcadores associados com a característica de interesse, ou seja, o seu valor genômico (MEUWISSEN et al., 2001).

A detecção de SNPs distribuídos de forma densa pelo genoma se dá por meio do alinhamento de uma sequência de um fragmento aleatório do genoma contento o SNP com uma sequência consenso ou de referência, a qual é obtida por meio do sequenciamento completo da espécie alvo ou de uma espécie relacionada. Há pouco tempo, esse procedimento era limitado pela baixa capacidade de geração e análise de sequências de DNA, entretanto, com a grande evolução nas metodologias de sequenciamento de alto desempenho e das ferramentas de bioinformática, o desenvolvimento de SNPs e sua utilização prática têm sido possíveis e viáveis para praticamente todas as espécies de interesse para programas de melhoramento genético. Tais inovações tecnológicas têm permitido o sequenciamento completo de um genoma em apenas algumas horas, não mais sendo necessário o envolvimento de várias pessoas, vários laboratórios e o consequente tempo de duração de anos e alto custo envolvido.

Outra inovação tecnológica de grande impacto é a técnica de genotipagem em larga escala por meio dos chips de DNA (Figura 2). São metodologias

para genotipar dezenas de milhares até um milhão de SNPs em um único ensaio. Chips de genotipagem de alta densidade já foram gerados e validados para várias espécies animais e vegetais e trouxeram uma verdadeira revolução nos estudos de mapeamento genético e identificação de marcadores moleculares associados a características de interesse (Figura 2).

Figura 2. Ilustração de tecnologias de genotipagem em chips de DNA, mapeamento genético, associação e seleção genômica ampla.

Além dos estudos de mapeamento genético e associação, a genotipagem usando chips de DNA tem permitido estudos muito precisos e acurados de caracterização molecular e todas as suas aplicações práticas nas diferentes etapas dos programas de conservação, de caracterização e de uso de recursos genéticos, pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento que foram discutidas neste capítulo. Outra grande vantagem da tecnologia é a sua reprodutibilidade e sua disponibilidade na forma de serviço terceirizado. A obtenção e a análise dos marcadores são feitas de forma totalmente automatizadas e os erros de genotipagem são inferiores a 0,01% (CAETANO, 2009). Também importante mencionar a vantagem de agregar informações moleculares de indivíduos genotipados em diferentes momentos, ou seja, pode-se realizar o processo de genotipagem de diferentes indivíduos em diferentes etapas e depois unir todas as informações. Essa vantagem é especialmente importante para a caracterização de bancos de germoplasma em que novas introduções de acessos são feitas ao longo do tempo e também para programas de melhoramento em que novos indivíduos são selecionados a cada ciclo de seleção-recombinação.

Considerações finais

Existem diferentes tipos de marcadores moleculares e várias aplicações desses marcadores como ferramenta auxiliar em programas de conservação, de caracterização e de uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal. Diante dessa diversidade de aplicações, ficam evidentes os potenciais ganhos que qualquer programa de melhoramento genético vegetal estão sujeitos, quando auxiliados pelo uso de marcadores moleculares. Nesse contexto dinâmico de avanços, é necessária uma integração cada vez mais intensiva entre as avaliações fenotípicas e os marcadores moleculares bem como entre os profissionais ligados à genética molecular e a áreas mais tradicionais do melhoramento genético, como os fisiologistas, fitopatologistas e melhoristas clássicos. Tais interações devem 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 ligadas ao melhoramento genético de plantas.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Dário Grattapaglia pela leitura e análise do trabalho.

Referências

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.

ARRIEL, N. H. C. et al. Outras aplicações dos marcadores moleculares. In: BOREM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: Editora Folha de Viçosa, 2009. p. 209-274.

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

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

CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, número especial, p. 64-71, 2009.

CAIXETA, E. T. et al. Tipos de marcadores moleculares. In: BOREM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.) **Marcadores moleculares**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 2009. p. 11-94.

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

CARVALHO, S.I.C.; RAGASSI, C.F.; FALEIRO, F.G. Organização de coleções nucleares para conservação. In: VEIGA, R.F.A.; QUEIRÓZ, M.A. (Ed.) **Recursos fitogenéticos: a base da agricultura sustentável no Brasil.** Viçosa, MG: Ed. UFV. 2015. p. 259-262.

CERQEIRA-SILVA, C. B. M. et al. Molecular genetic variability of commercial and wild accessions of passion fruit (*Passiflora* spp.) targeting ex situ conservation and breeding. **International Journal of Molecular Sciences** (Online), v. 15, p. 22933-22959, 2014.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M. et al. Characterization and selection of passion fruit (yellow and purple) accessions based on molecular markers and disease reactions for use in breeding programs. **Euphytica**, v. 202, p. 345-359, 2015.

DAVEY, J.W. et al. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. **Nature Reviews Genetics,** v.12, p. 499-510, 2011.

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.

ELSHIRE, R.J. et al. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GbS) approach for high diversity species. **Plos One**, v. 6 (5): e19379. doi:10.1371/journal.pone.0019379, 2011.

FALEIRO, F. G. et al. 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.

FALEIRO, F. G. et al. 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, 2004a.

FALEIRO, F. G. et al. Use of molecular markers to accelerate the breeding of common bean lines resistant to rust and anthracnose. **Euphytica,** v. 138, p. 213-218, 2004b.

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

FALEIRO, F.G.; FARIAS NETO, A.L.; RIBEIRO JÚNIOR, W.Q. **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008a. 184p. il.

FALEIRO, F.G. et al. 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, 2008b. p. 43-62.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. Recursos genéticos: conservação, caracterização e uso. In: FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M.; REIS JÚNIOR, F.B. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. p. 513-551.

FALEIRO, F.G. Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal. In: FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M.; REIS JÚNIOR, F.B. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011a. p. 55-118.

FALEIRO, F.G. Princípio científico e análises genéticas utilizando marcadores moleculares. In: FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M.; REIS JÚNIOR, F.B. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011b. p. 31-52.

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.; 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. et al. 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.

GRATTAPAGLIA, D. et al. High-throughput snp genotyping in the highly heterozygous genome of eucalyptus: Assay success, polymorphism and transferability across species. **BMC Plant Biology,** v. 11, p. 65, 2011.

HIRSCH, C. D. et al. Reduced representation approaches to interrogate genome diversity in large repetitive plant genomes. **Brief Functional Genomics**, v. 13, p. 257-267, 2014.

LOPES, M. A. et al. **Pré-melhoramento de plantas: estado da arte e experiências de sucesso.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. 2011. 614 p.

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.** Brasilia, DF: Embrapa Technological Information, 2009. 236 p.

MEUWISSEN, T. H. E.; HAYES, B. J.; GODDARD, M.E. Prediction of total genetic value using genome wide dense marker maps. **Genetics,** v. 157, p. 1819-1829, 2001.

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. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 858 p.

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.

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**, v. 84, p. 476-486, 2000.

POLAND, J.A.; RIFE, T.W. Genotyping-by-sequencing for plant breeding and genetics. **Plant Genome,** v.5, p. 92-102, 2012.

SANTOS, E. S. L. ; CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; MORI, G.M. ; AHNERT D. ; MELO, D. ; PIRES, JL ; CORREA, R. X. ; SOUZA, A.P. Genetic structure and molecular diversity of cacao plants established as local varieties for more than two centuries: the genetic history of cacao plantations in Bahia, Brazil. **Plos One,** v. 10, p. e0145276, 2015.

RESENDE, M. D. V. et al. Seleção genômica ampla (GWS) e maximização da eficiência do melhoramento genético. **Pesquisa Florestal Brasileira,** Colombo, v. 56, p. 63-77, 2008.

SANSALONI, C. et al. Diversity Arrays Technology (DArT) and next-generation sequencing combined: genome-wide, high throughput, highly informative genotyping for molecular breeding of *Eucalyptus*. **BMC Proceedings**, v. 5 (Suppl 7), p. 54, 2011.

SCHLOTTERER, C. et al. Sequencing pools of individuals - mining genome-wide polymorphism data without big funding. **Nature Reviews Genetics,** v. 15(11), p. 749-763, 2014.

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.

SOUZA, L. M. et al. Genetic diversity strategy for the management and use of rubber genetic resources: more than 1,000 wild and cultivated accessions in a 100-genotype core collection. **Plos One,** v. 10, p. e0134607, 2015.

TANKSLEY, S. D. et al. 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.

TRUONG, H.T. et al. Sequence-Based Genotyping for Marker Discovery and Co-Dominant Scoring in Germplasm and Populations. **Plos One**, v.7(5): e37565. doi:10.1371/journal.pone.0037565, 2012.

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.

CULTURA DE TECIDOS APLICADA AO MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS

Jonny Everson Scherwinski-Pereira

CULTURA DE TECIDOS APLICADA AO MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS

Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Introdução

A cultura de tecidos de plantas, também denominada de micropropagação ou cultivo *in vitro*, consiste em cultivar assepticamente células, tecidos ou fragmentos de órgãos de uma determinada planta em meio de cultura artificial, sob ambiente controlado, visando o desenvolvimento de novas plantas. De fato, um dos primeiros fundamentos do cultivo *in vitro* de plantas foi a formulação da teoria da totipotencialidade por Matthias Schleiden & Theodor Schwann, em 1838/1839, na qual a célula é autônoma e capaz de originar um organismo completo, desde que determinadas condições físicas e nutricionais sejam providas à célula vegetal em cultivo.

Em 1902, estudos realizados por Haberlandt, considerado o pai da cultura de tecidos, chamaram a atenção, pois relatavam os primeiros trabalhos de cultivo de tecidos somáticos de plantas. Mas a teoria da totipotência só começou a se confirmar a partir da multiplicação de trabalhos na área, entre os quais se destacaram o do cultivo i*n vitro* de embriões imaturos de crucíferas por Hanning (1904), o cultivo de embriões de híbridos interespecíficos de orquídeas por Knudson (1922) e a recuperação de embriões a partir de híbridos incompatíveis de *Linum* por Laibach (1925).

O descobrimento e a utilização de fitormônios, especialmente auxinas (WENT, 1926) e citocininas (MILLER et al., 1955), tiveram importância fundamental para o avanço das técnicas de cultura de tecidos de plantas, visto essas substâncias possuírem grande influência no padrão de desenvol-

vimento vegetal. Desde então, inúmeras aplicações da cultura de tecidos de plantas têm sido verificadas em diversas áreas da agricultura (Figura 1), entre as quais, algumas serão tratadas mais especificamente neste trabalho.

Figura 1. Aplicações da cultura de tecidos de plantas em diversas áreas da agricultura.

Por que a cultura de tecidos de plantas?

Várias têm sido as vantagens associadas à utilização de técnicas de cultura de tecidos de plantas, entre as quais destacam-se:

- A rápida propagação comercial de novas cultivares.
- Normalmente não destrói a planta mãe/matriz, na qual o propágulo inicial é retirado.
- Pode fornecer continuamente plantas ao longo do ano, pois independe da época do ano em que a técnica é utilizada.

- Pode gerar plantas livres de vírus, inclusive partindo-se de plantas infectadas.
- Plantas ou mudas são mais fácil de serem transportadas/intercambiadas.
- Pode proporcionar seleção mais rápida para o melhoramento genético de culturas.
- Gera clones verdadeiros.
- A técnica pode ser utilizada para qualquer tipo de planta.

Usos e aplicações

Micropropagação

A propagação *in vitro* de plantas, também conhecida como micropropagação, têm sido indiscutivelmente a técnica mais utilizada e de maior aplicabilidade entre todas as demais. A utilização da micropropagação em escala comercial teve início possivelmente na Europa, ainda na década de 1960, utilizando especialmente espécies ornamentais.

Atualmente, seu uso tem sido aplicado em diversos países e em inúmeras espécies de plantas, com êxito não apenas em espécies frutíferas e ornamentais, mas também em florestais, medicinais e olerícolas. A micropropagação compreende basicamente de quatro a cinco fases: (a) preparativa ou de seleção das plantas matrizes; (b) estabelecimento ou início de cultivo; (c) multiplicação; (d) enraizamento, além daquela (e) de transplantio e aclimatização. O êxito ou o fracasso na obtenção de plantas de alta qualidade fitossanitária no final do processo depende de diversos fatores que devem ser controlados adequadamente em cada etapa.

Limpeza clonal

A utilização de técnicas de cultura de tecidos para obtenção de plantas livres de patógenos é bastante difundida nos dias atuais. Maior atenção tem sido dada ao cultivo de meristemas e ápices meristemáticos visando a pro-

dução de plantas livres de vírus, em razão da diversidade de espécies infestadas por vírus, como a batata, o morangueiro, o alho e a cana-de-açúcar.

Esta técnica refere-se à cultura propriamente dita do meristema ou do ápice meristemático (meristema recoberto por primórdios foliares), geralmente com dimensões não superiores a 1,0 mm. Embora a regra geral seja que a utilização de explantes menores aumente a chance de sucesso na obtenção de plantas livres de patógenos, quanto menor o tamanho do propágulo a ser cultivado, mais difícil será sua sobrevivência e desenvolvimento *in vitro*.

A utilização de explantes meristemáticos para a produção de plantas livres de vírus se deve ao fato de ser o meristema o explante mais indicado na multiplicação clonal *in vitro*, permitindo inclusive a obtenção de clones sadios a partir de plantas infectadas. Acredita-se que a maior atividade de síntese proteica no tecido meristemático e a incipiente ligação vascular do meristema com o restante dos tecidos da planta desfavoreçam a multiplicação do patógeno, além de proporcionar uma menor distribuição das partículas patogênicas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Além de permitir a produção ou a recuperação de plantas livres de patógenos, outra vantagem da técnica é a manutenção da identidade genética da planta regenerada, já que esse tecido é de origem somática. Some-se a isso, o fato de ser o ápice uma estrutura organizada, que pode desenvolver-se diretamente em parte aérea, em meio de cultura adequado, sem passar pela fase de calo (crescimento desordenado de células), o que poderia ocasionar alterações genéticas no material.

Sucessos na eliminação de vírus em plantas já foram registrados para inúmeras espécies, entre as quais: amendoim, morangueiro, batata e bananeira (GAMA, 1988; MORRIS et al., 1997; COLLIN e EDWARDS, 1998; HELLIOT et al., 2001). No que se refere à eliminação de fungos, também já foram alcançados resultados positivos com cravo e gladíolo infectados por *Fusarium roseum* e *F. oxysporum*, respectivamente (PIERIK, 1990). Albuquerque et al.

(2000), avaliando a viabilidade do uso da técnica de ápices caulinares *in vitro* para a limpeza clonal de plantas de abacaxizeiro infectadas por *Fusarium subglutinans*, verificaram que ápices caulinares de aproximadamente 1,0 mm apresentaram 100% das plantas regeneradas livres de patógenos (fusariose). Já Helliot et al. (2001) observaram que a taxa de eliminação de vírus em genótipos de bananeira infectados é altamente dependente do tipo de vírus (CMV, BBTV e BSV).

Embriogênese somática

Embriogênese somática, adventícia ou assexual são termos usualmente empregados ao processo pelo qual células haploides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que para isso ocorra a fusão de gametas (WILLIAMS e MAHESWARAM, 1986). Foi originalmente desenvolvida para satisfazer dois objetivos: micropropagação massal e desenvolvimento de ferramenta celular para o melhoramento genético, como por exemplo, a transformação genética e a fusão de protoplastos. Essa técnica consiste no uso de reguladores de crescimento (auxinas) para induzir a desdiferenciação de tecidos e a formação de tecidos e/ou células embriogênicas que, ao final, servirão para o desenvolvimento de plantas inteiras (STROSSE et al., 2003).

Uma particularidade dos embriões somáticos é a presença de um sistema vascular fechado, sem conexão vascular com os tecidos do explante inicial, característica esta que aliada à sua bipolaridade (estrutura constituída de ápice caulinar e radicular) os diferem dos propágulos obtidos por meio da micropropagação e da organogênese (GUERRA et al., 1998).

Em razão de seu considerável potencial de multiplicação, a embriogênese somática constitui-se numa importante ferramenta para a propagação clonal em larga escala de plantas-elite (ETIENNE-BARRY et al., 1999). Porém, apesar do alto potencial de regeneração, essa técnica pode não ser indicada para a produção massal de algumas espécies de plantas, como a da bananeira, pela possibilidade de incremento no nível de variação somaclo-

nal, quando comparado a outras técnicas clássicas de propagação, como a cultura de ápices caulinares. No entanto, para essa cultura, a embriogênese somática pode justificar-se para trabalhos que envolvam transformação genética e fusão de protoplastos (STROSSE et al., 2003).

Atualmente, a embriogênese somática já foi relatada para mais de 300 espécies e para as mais diferentes finalidades, incluindo desde a produção massal de plantas até a produção de plantas transgênicas.

Cultivo de células em suspensão

O cultivo de células em suspensão destina-se à obtenção e à proliferação de células em meio nutritivo líquido, sob condições de agitação, aeração e temperatura controlada, sendo essencial que as células suspensas se dividam e se multipliquem ativamente (CID, 1998). Contudo, salienta-se que, de acordo com a composição do meio de cultivo, o padrão de diferenciação (lignificação e/ou alongamento), a divisão e a senescência celular podem ser afetadas.

A vantagem dessa técnica é atribuída a sua elevada taxa de multiplicação celular, sendo, dessa forma, eficiente para a rápida multiplicação e aplicações diretas em estudos de bioquímica, genética, citologia, fisiologia vegetal e fitopatologia. Esse tipo de cultivo também é empregado na produção de metabólitos secundários ou material clonal em escala comercial pela utilização de biorreatores.

Porém, dois aspectos devem ser considerados no cultivo de células em suspensão: a formação de agregados celulares e a existência de mosaicismo ou mixoploidia, isto é, a coexistência de diferentes populações celulares com bases genéticas distintas. Atualmente, vários são os estudos com células vegetais cultivadas em reatores biológicos visando à produção de metabólitos secundários.

Obtenção de mutantes *in vitro*

Mutações são definidas como sendo mudanças herdáveis que representam as bases genéticas das variações e pode servir como matéria-prima aos processos de melhoramento genético e evolutivo (RAMALHO et al., 2000). Em razão de a frequência de ocorrência de mutações espontâneas ser muito baixa, isso requer a utilização de métodos mais eficientes, como o emprego de agentes mutagênicos.

Técnicas de indução de mutação associadas às de seleção *in vitro* têm sido recomendadas, por facilitar não apenas a indução de variabilidade genética, mas por permitir a seleção e a propagação de mutantes promissores (MARK et al., 1996). Essas técnicas foram empregadas com sucesso em bananeira para redução do porte e tolerância à salinidade ou em outras espécies para a obtenção de tolerância a metais pesados, a herbicidas e a certas doenças (TULMANN-NETO et al., 1990; KIDO, 2003).

Cultura e/ou resgate de embriões

Desde os estudos de Hanning (1904), acerca da fisiologia e do desenvolvimento de embriões, a técnica de cultivo destes tem se expandido e contribuído muito para os estudos básicos da fisiologia do desenvolvimento do embrião. Essa técnica tem contribuído ativamente para programas de melhoramento genético, por meio da recuperação de híbridos de interesse, oriundos de cruzamentos incompatíveis, bem como para a superação de dormência de sementes em algumas espécies (FERREIRA et al., 1998).

As principais aplicações do cultivo de embriões zigóticos *in vitro* estão na coleta, intercâmbio e conservação de germoplasma e na propagação de híbridos raros, que não germinam por meio de processos naturais. Além disso, essa ferramenta pode ser coadjuvante no processo de introdução de genes exógenos no genoma de um organismo (HU e FERREIRA, 1998; SILVA, 2002), como também para viabilizar a produção racional de mudas por meio da uniformização e da redução do período de germinação de sementes (SILVA,

2002). Além do mais, pode oferecer um sistema controlado para estudar os problemas nutricionais, fisiológicos e bioquímicos nos diferentes estágios de desenvolvimento do embrião (RAGHAVAN, 2003).

Em citros, a ocorrência de poliembrionia entre as espécies resulta, normalmente, em elevada taxa de aborto do embrião zigótico, em razão da competição exercida sobre ele pelos embriões nucelares, geralmente mais vigorosos (PASQUAL et al., 2003). Assim, a cultura de embriões é de grande importância no melhoramento genético dessa cultura, pois possibilita o resgate de embriões híbridos imaturos, oriundos de cruzamentos interespecíficos e intergenéricos (HU e FERREIRA, 1998).

Além de citros, diversas são as culturas em que se tem empregado a técnica de cultura de embriões, entres as quais, *Cocos nucifera* L. (SILVA, 2002), *Coffea* sp. (ANDRADE et al., 2001; RIBEIRO et al., 2003); *Euterpe oleracea* L. (LEDO et al., 2001), *Aniba rosaeodora* Ducke (HANDA et al., 2005), *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. (MELO et al., 2001), *Astrocaryum ulei* (PEREIRA et al., 2006), entre outras.

Conservação *in vitro* e intercâmbio de germoplasma

Em razão da intensa atividade extrativista de espécies nativas e endêmicas, assim como pela expansão desordenada de novas áreas de cultivo, é importante que medidas de conservação de germoplasma sejam empregadas, principalmente àquelas espécies ameaçadas de extinção. Nesse sentido, o uso de técnicas de conservação *in vitro* constitui-se como métodos promissores à conservação de recursos genéticos vegetais, sendo uma alternativa atrativa tanto do ponto de vista econômico, quanto prático. As técnicas de culturas de tecidos de plantas podem contribuir em todas as etapas do processo de conservação de germoplasma, incluindo coleta, indexação para doenças, quarentena, multiplicação, caracterização, avaliação, armazenamento e distribuição.

De modo geral, a conservação *in vitro* fundamenta-se na manutenção de coleções em laboratório, realizando-se, para tanto, alterações no ambiente de cultivo, como redução da temperatura, adição de retardantes osmóticos e hormonais ao meio, redução das concentrações salinas e dos componentes orgânicos do meio de cultivo, submersão das culturas em óleo mineral ou armazenamento de propágulos a ultrabaixas temperaturas (-196 ºC), denominado criopreservação, podendo ser utilizados isolados ou em associação (GEORGE, 1993). O objetivo principal é desacelerar ou suprimir o crescimento de células, tecidos e órgãos, aumentando ao máximo o intervalo entre os subcultivos, fato que consequentemente reduziria a mão de obra e o espaço necessários para a sua conservação. Entre as vantagens da conservação *in vitro*, citam-se: a manutenção de um grande número de acessos num pequeno espaço físico e livre dos riscos ambientais existentes no campo; acesso imediato a todo o germoplasma da coleção (GEORGE, 1993); além de facilitar o intercâmbio internacional de germoplasma entre instituições de pesquisa.

De acordo com Engelmann (1998), a utilização das técnicas de cultura *in vitro* é de grande interesse para a conservação de germoplasma de espécies com sementes recalcitrantes; que apresentem baixa viabilidade de sementes ou baixa produção; que se propagam vegetativamente ou ainda genótipos-elite e material geneticamente modificado.

Contudo, o sucesso do uso dessa técnica depende em muito das características fisiológicas da espécie a ser conservada. Entre os tecidos e os órgãos empregados, os meristemas são os mais indicados, em razão da menor probabilidade de ocorrência de alterações genéticas, de serem livres de patógenos e, na maioria das vezes, os melhores explantes para a micropropagação.

Diversas são as culturas em que essa ferramenta tem sido empregada com sucesso: mandioca, bananeira, abacaxizeiro, batata, cafeeiro, orquídeas, espécies florestais, kiwi, macieira, pereira, ameixeira, cerejeira, videira, morangueiro, maracujazeiro, beterraba, batata-doce, forrageiras e cana-de-açúcar.

No Brasil, germoplasma de várias espécies de plantas tem sido conservado *in vitro* ou criopreservadas, como na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília. Outras instituições de destaque na conservação *in vitro* de germoplasma são o CIRAD, em Montpellier na França e o INIBAP em Leuven, Bélgica (VIEIRA, 2000).

Apesar das potencialidades mencionadas, existe o risco de instabilidade genética das culturas submetidas às técnicas de conservação *in vitro*. Além disso, os sistemas *in vitro* não eliminam por completo a importância de se manter recursos genéticos *in situ*, pois são métodos que se completam e ambos podem se constituir em bancos ativos de germoplasma. No entanto, pode tornar-se dispendioso manter coleções *in situ*, principalmente pelas intempéries e necessidade de grandes áreas e práticas de manejo (VIEIRA, 2000).

Em relação ao intercâmbio de germoplasma por meio de cultura *in vitro*, tem-se notado consideráveis vantagens práticas por proporcionar menor volume e peso dos materiais destinados ao transporte, assim como também pela facilidade de maior controle das culturas com relação às doenças. As culturas para as quais se aplica rotineiramente o intercâmbio de germoplasma *in vitro* incluem bananeira, batata e mandioca. Em geral, as culturas são transportadas como brotos em meio de cultivo ou como minitubérculos no caso de culturas como batata e inhame (NG, 1994). Outras ferramentas biotecnológicas, como a tecnologia de sementes sintéticas, foram utilizadas como alternativa de distribuição de germoplasma de bananeira (RAO et al., 1993) por meio do encapsulamento de microbrotos, assim como para inhame e batata (HASAN e TAKAGI, 1995), utilizando o encapsulamento de segmentos nodais.

Cultura de ovários

Esta técnica fornece um controlado sistema para estudos acerca dos aspectos nutricionais e fisiológicos do desenvolvimento de frutos, bem como para a formação de sementes e para ser utilizada como propagação de plantas,

indução de haploides partenogênicos, recuperação de híbridos interespecíficos e intergenéricos (CASTILLO e CISTUÉ, 1993; BROWN et al., 1997).

Cultura de protoplastos

Definem-se protoplastos como células vegetais que, por meio de mecanismos mecânicos ou enzimáticos, tiveram sua parede celular removida. Assim, células vegetais sob essa condição podem ser manipuladas, conservando ainda as potencialidades de células vegetais completas. A priori, protoplastos podem ser isolados de qualquer tecido vegetal, mas em geral, preferem-se tecidos como o do mesófilo foliar ou de calos friáveis. É uma técnica aplicável em diversas áreas da pesquisa vegetal, mas é principalmente no melhoramento de genético de plantas que vislumbra as maiores potencialidades de uso. Assim, pode ser empregado para a obtenção de plantas transgênicas, híbridos somáticos e mutantes ou variantes somaclonais, além de possibilitar estudos da expressão gênica e sua regulação (MANTELL et al., 1994).

Na cultura de citros, a partir da década de 1980, a hibridação somática pela fusão de protoplastos também passou a ser utilizada em programas de melhoramento dessa espécie, superando as barreiras genéticas impostas à hibridação sexual, possibilitando a obtenção de alotetraploides que combinam o genoma nuclear de ambos os parentais (GROSSER e GMITTER JUNIOR, 1990).

Atualmente, a cultura de protoplastos vem sendo empregada em estudos básicos na área de fisiologia vegetal, biologia molecular e celular e pesquisas aplicadas em Biotecnologia.

Produção de plantas transgênicas

A cultura de tecidos é de fundamental importância em estudos visando à obtenção de plantas geneticamente modificadas. Sua utilização é requerida em praticamente todo o processo, incluindo desde a transformação pro-

priamente dita (biobalística, *Agrobacterium tumefasciens*, etc.) até a regeneração e a multiplicação das plantas transformadas (SÁ et al., 2000). Contudo, cabe salientar que o sucesso da utilização da cultura de tecidos na obtenção de plantas transgênicas está sob a condição de otimização de protocolos para cada espécie em uso.

Referências

ALBUQUERQUE, C. C. A. et al. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de abacaxizeiro para limpeza clonal em relação à fusariose. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 363-366, abr./jun. 2000.

ANDRADE, L.M. da C.O. et al. Cultura in vitro de embriões de *Coffea arabica*: influência de ANA e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 5, p. 1063-1070, set./out., 2001.

BROWN, J. et al. Intergeneric hybridization between *Synapsis alba* and *Brassica napus*. **Euphytica**, v. 93, p. 163-168, 1997.

CASTILLO, A. M.; CISTUÉ, L. Production of gynogenic haploids of *Hordeum vulgare* L. **Plant Cell Reports**, v. 12, p. 139-143, 1993.

CID, L. P. B. Suspensão celular. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP, EMBRAPA, CNPH, 1998. p. 331-353.

COLLIN, H. A.; EDWARDS, S. **Plant Cell Culture**. New York: Springer-Verlag, 1998. 158p.

ENGELMANN, F. *In vitro* germplasm conservation. In: DREW, R.A. [ed.]. **Tropical & Subtropical Species**, p. 41-47, 1998.

ETIENNE-BARRY, D. et al. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 111-117, 1999.

FERREIRA, J. M. S. et al. Melhoramento genético do coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S. F.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. **A cultura do coqueiro no Brasil**. Brasília: Embrapa, SPI, 1998. p. 189-254.

GAMA, M. I. C. S. Produção de plantas de batata-doce livres de vírus por termoterapia e cultura de meristemas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 13, p. 283-286, 1988.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. Exegetic: Edington, 1993, 547 p.

GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G. Somatic hybridization of Citrus with wild relatives for germplasm enhancement and cultivar development. **HortScience**, Alexandria, v. 25, n. 2, p. 147-151, 1990.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA, 1998. v. 2, p. 533-568.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. In.: TORRES, A**. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura** de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA, 1998. v. 1, p. 183-260.

HANDA, L.; SAMPAIO, P. de T. B.; QUISEN, R. C. Cultura *in vitro* de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazônica**, v. 35, n. 1, p. 29-33, 2005.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 371-393.

HASAN, S. M. Z.; TAKAGI, H. Alginate-coated nodal segments of yam (*Dioscoria* pp.) for germplasm exchange and distribution. IPGRI/FAO. **Plant Genetic Resources Newsletters**, v. 103, p. 32-35, 1995.

HELLIOT, B. et al. Development of i*n vitro* techniques for elimination of virus diseases from Musa. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 560, p. 535-538, 2001.

KIDO, L. M. H. **Irradiação de gemas axilares, suspensão celular e protoplastos de bananeira cv. Maçã (*Musa* spp.), visando a seleção de mutantes resistentes à salinidade**. 2003. 136 p. Tese. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

LEDO, A. da S. et al. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açaizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, 2002.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. AZEVEDO, J. L. de; AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; VELLO, N. A. (trad.). Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 344 p.

MARK, C. et al. Novaria – um nuevo mutante de banana inducido por radiación gama. **Infomusa**, v. 5, n. 1, p. 35-37, 1996.

MELO, B. de. et al. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (MART.) BECC.]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1301-1306, nov./dez., 2001.

MORRIS, J. B. et al. Meristem culture for virus elimination and peanut interspecific hybrid preservation. **Crop Science**, v. 37, p. 591-594, 1997.

NG, S. Y. C. Production and distribution of virus-free yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). **Acta Horticulturae**, v. 380, p. 324-328, 1994.

PASQUAL, M. et al. Desenvolvimento *in vitro* de embriões imaturos oriundos de tangerineira 'Poncã' x laranjeira 'Pêra' em diferentes fotoperíodos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v. 27, n. 3, p. 535-540, maio/jun., 2003.

PEREIRA, J. E. S. et al. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 251-256, mar./abr., 2006.

PIERIK, R. L. M. Produccion de plantas libres de enfermedades. In: PIERIK, R.L.M. (Ed.) **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Ediciones Mundi-Pronsa, 1990. p. 169-180.

RAO, P. S.; GANAPATHI, T. R.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V.A. Encapsulated shoot tips of banana: a new propagation and delivery systems. **InfoMusa**, v. 2, p. 4-5, 1993.

RAGHAVAN, V. One hundred years of zygotic embryo culture investigations. **In Vitro Cellular Development Biology**, v. 39, p. 437-442, 2003.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. Lavras: UFLA, 2000. 472 p.

RIBEIRO, L. de S. et al. Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de *Coffea arabica*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. Ed. especial, p. 1479-1483, dez., 2003.

SÁ, M. E. L. de; CANÇADO, G. M. de A.; SOUZA, C. M. de. Cultivo de plantas *in vitro* e suas aplicações. In: Biotecnologia. **Informe Agropecuário**, v. 21, n. 204, p. 116-123, mai./jun. 2000.

SILVA, V. dos S. **Regeneração *in vitro* de embriões de *Cocos nucifera* L**. 2002. 78p. Dissertação. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

STROSSE H.; DOMERGUE, R.; PANIS, B.; ESCALANT, J. V.; CÔTE, F. **Banana and plantain embryogenic cell suspensions**. VÉZINA, A.; PICQ, C. (ed). 2003. 36 p. INIBAP Technical Guidelines 8. The International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France.

TULMANN-NETO, A.; MENDES, B. M. J.; ANDO, A. Indução e uso de mutação "in vitro". In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP, EMBRAPA, CNPH, 1990. p. 341-378.

VIEIRA, M.L.C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, n. 14, p. 18-20, maio/jun., 2000.

WILLIAMS, E. S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v. 57, p. 443-462, 1986.

CONSERVAÇÃO, DOMESTICAÇÃO E MELHORAMENTO DE ESPÉCIES NATIVAS DO CERRADO

Lázaro José Chaves

CONSERVAÇÃO, DOMESTICAÇÃO E MELHORAMENTO DE ESPÉCIES NATIVAS DO CERRADO

Lázaro José Chaves

Introdução

Desde as primeiras experiências com cultivo de plantas, há cerca de 10 mil anos, diferentes povos em diferentes épocas, vêm modificando geneticamente, de maneira intencional ou não, espécies de plantas úteis. Por milênios, algumas destas espécies disseminaram-se muito além de sua região de origem e constituíram a base para o surgimento de civilizações, em diferentes continentes. Uma base alimentar sólida, fundada na agricultura, é condição essencial para o desenvolvimento tecnológico dos povos, como aconteceu notadamente na Europa e Ásia (DIAMOND, 2001). Com as grandes navegações, a partir do final do século XV, houve um intenso intercâmbio de espécies entre os continentes, reconfigurando os hábitos alimentares em muitas regiões do mundo. Assim, culturas como o arroz, o trigo e a cana-de-açúcar, domesticadas no Velho Mundo, ocuparam importante papel nas colônias do Novo Mundo. Da mesma forma, o milho, a batata e a mandioca, culturas das Américas, tornaram-se importantes alimentos em países da Europa, Ásia e África. Após a Revolução Industrial, com o surgimento de uma agricultura de base tecnológica e voltada para o mercado, muitas espécies de plantas cultivadas localmente deixaram de ser utilizadas. O mesmo aconteceu com grande número de variedades tradicionais das espécies mais cultivadas. Esse fato gerou uma perda de diversidade nos campos de cultivo, apontada como um problema de segurança alimentar. Com isso, a humanidade é altamente dependente de poucas espécies de plantas para suprimento de suas necessidades alimentares, pois 15 espécies respondem por mais de 80% das calorias consumidas e destas, apenas 4 (arroz, trigo, milho e batata) representam mais de 50% dessa necessidade energética (CORADIN et al., 2016).

Além da garantia de segurança alimentar, pelo aumento da produção de alimentos, a agricultura tem também de garantir a segurança nutricional, contribuindo com a produção de alimentos mais nutritivos. Uma forma eficiente de garantir melhor segurança nutricional é a diversificação da oferta de produtos alimentícios (BALDERMANN et al., 2016). Desta forma, um grande número de espécies vegetais negligenciadas ou subutilizadas possui potencial para diversificar a dieta da população, entre elas as espécies silvestres com potencial alimentício.

O Cerrado brasileiro é a savana com maior biodiversidade vegetal do planeta, com mais de 12 mil espécies catalogadas (MENDONÇA et al., 2008). Devido ao alto grau de endemismo e dos riscos de erosão genética provocados pela ocupação do bioma, o Cerrado é considerado um dos *hotspots* para fins de conservação da biodiversidade (MYERS et al., 2000). Entre as inúmeras espécies vegetais úteis do Cerrado, chama a atenção o grupo das espécies que produzem frutos comestíveis. Em um estudo prospectivo realizado por iniciativa do Ministério do Meio Ambiente, denominado *Plantas do Futuro*, foram catalogadas 58 plantas frutíferas com potencial de uso, na região do Cerrado, sendo algumas delas constituídas por mais de uma espécie botânica, como é o caso do murici (*Byrsonima spp.*) e gabiroba (*Campomanesia spp.*), por exemplo, (AGOSTINI-COSTA et al., 2010). Destas, 16 foram destacadas como prioritárias para pesquisa e conservação, sendo 8 consideradas com alto potencial de exploração sustentada em curto prazo. São elas: Araticum (*Ana crassiflora* Mart.), Baru (*Dipteryx alata* Vog.), buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.), cagaita (*Eugenia dysenterica* (Mart.) DC.), caju-do-cerrado (*Anacardium occidentale* L.), mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes), maracujá-do-cerrado (*Passiflora spp.*) e pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess.). Informações detalhadas sobre cada uma das espécies prioritárias podem ser acessadas em Vieira et al. (2010) e Coradin et al. (2016).

A importância das frutas do Cerrado para os primeiros habitantes do sertão pode ser atestada pelos inúmeros relatos de viajantes e expedicionários desde o início do século XIX (ex. SAINT-HILLAIRE, 1975; POHL, 1976).

Diante da escassez de alimentos no interior, essas frutas tinham um papel importante na alimentação da população, em certas épocas do ano. Duas espécies, em particular, tiveram um papel preponderante para as populações do sertão, o pequi, nas terras altas e o buriti, associado às áreas úmidas (NAVES, 1999). Nos últimos anos, as frutas do Cerrado têm recebido atenção de uma parcela de consumidores interessados em alimentos naturais, o que tem levado a uma pressão extrativista sobre algumas destas espécies. O pequi, por exemplo, possui uma cadeia já bem estruturada de extrativismo, transporte e comércio. O incentivo ao consumo das frutas do Cerrado, de maneira sustentável, precisa da garantia de fornecimento de produtos, sem comprometer a viabilidade das populações naturais. Para que isto seja possível, sistemas sustentáveis de cultivo precisam ser pesquisados e implantados, possibilitando ainda, fonte de renda complementar aos produtores rurais, principalmente aqueles ligados à agricultura familiar.

Conservação

A literatura sobre formas e técnicas de conservação de recursos genéticos é bastante vasta. Uma boa coletânea de capítulos sobre temas relacionados pode ser encontrada em Nass (2007). No caso das frutíferas nativas, a conservação *in situ* deve ser priorizada, garantindo a continuação do processo evolutivo e mantendo o papel ecológico das espécies. Deve ser lembrado que os frutos comestíveis coevoluiram com seus dispersores, sendo essenciais na manutenção da fauna silvestre e, portanto, no equilíbrio de todo o ecossistema. A conservação *ex situ*, nesse caso, teria um papel complementar, podendo contribuir para a conservação de parte da variabilidade genética das espécies, em ambiente controlado.

Para que estratégias eficientes de conservação sejam estabelecidas, seja em condição *in situ*, seja *ex situ*, algumas informações sobre a espécie alvo são essenciais. A área de ocorrência, bem como a forma de distribuição das populações, contínua ou agregada, ampla ou restrita, é informação primária necessária para os passos seguintes. Essas informações, quando não dispo-

níveis, requerem estudo de prospecção amplo e oneroso. Para as principais espécies frutíferas do Cerrado, essas informações já estão disponíveis de forma satisfatória, a partir de levantamentos florísticos anteriores (ex. RIBEIRO et al., 1997; NAVES, 1999) e informações de herbários.

A próxima questão a ser respondida é sobre a magnitude e distribuição da variabilidade genética da espécie em sua área de ocorrência ou região-alvo para conservação. Para caracteres quantitativos, como a maioria dos caracteres de interesse agronômico, a variação fenotípica entre plantas e entre populações (ou subpopulações) é influenciada pela variação ambiental. Isto torna a quantificação da variabilidade genética uma tarefa difícil e onerosa, exigindo a avaliação em ambiente controlado e com delineamento experimental, que permita estimar a componente genética da variância fenotípica. Uma alternativa que facilita muito os estudos genéticos em populações naturais é o uso de marcadores moleculares, que cresceu muito nas últimas décadas e permitiu um grande avanço no conhecimento da estrutura da variabilidade genética, inclusive de espécies frutíferas do cerrado. Os marcadores moleculares mais utilizados permitem acessar diretamente o polimorfismo em regiões específicas da molécula de DNA, sendo livres de efeitos ambientais. Isto possibilita a análise de material vegetal de plantas de populações naturais de forma relativamente rápida e com custos aceitáveis. Entre os marcadores moleculares, os microssatélites ou SSR (Single Sequence Repeats) têm sido muito utilizados em estudos de genética de populações de plantas por serem codominantes e multialélicos. Deve-se atentar, contudo, para o fato de que os marcadores moleculares são, na maioria, seletivamente neutros, ou seja, não estão sujeitos aos efeitos da seleção. Dessa forma, a estrutura da variação captada por estes marcadores é aquela moldada pelo balanço entre a deriva genética e o fluxo gênico, desconsiderando o pequeno efeito das mutações. Mesmo assim, as informações geradas a partir de dados de marcadores moleculares são de grande utilidade na definição de estratégias de conservação. Um modelo simples para estudo da estrutura genética de populações de plantas baseia-se na avaliação de subpopulações, também chamadas de populações locais, amostradas na região-alvo

do estudo. De cada subpopulação, material vegetal (folhas geralmente) é coletado individualmente em uma amostra representativa do conjunto de plantas adultas ocorrentes naquela área. Os dados resultantes da genotipagem do conjunto de indivíduos constituem a base para as análises moleculares.

Para fins de definição de estratégias de conservação, uma informação importante diz respeito à distribuição da variabilidade genética entre e dentro de subpopulações, ou seja, o grau de estruturação da variabilidade genética. Esta informação está sumarizada no parâmetro F_{ST} de Wright que representa a proporção da variabilidade genética entre subpopulações em relação à variabilidade total. O tamanho efetivo de uma amostra, que é uma medida de representatividade genética, é altamente influenciado pelo F_{ST} (VENCOVSKY; CROSSA, 2003; VENCOVSKY et al., 2012). Considerando uma amostra com muitos indivíduos e populações compostas por grande número de subpopulações, como acontece com as espécies com distribuição ampla, o tamanho efetivo depende basicamente do número de subpopulações amostradas (*S*), sendo o seu limite máximo dado por $N_e = /2F_{ST}$ (VENCOVSKY; CROSSA, 2003). Dado um valor mínimo requerido de tamanho efetivo e o valor de F_{ST}, o número mínimo de subpopulações a serem amostradas pode ser obtido, então, por $S = 2F_{ST}Ne$.

Estudos genéticos com espécies arbóreas do Cerrado têm mostrado valores significativos e com diferentes magnitudes para o as estimativas de F_{ST} (Tabela 1). Como exemplo, para conservação in situ de uma espécie com e considerando um tamanho efetivo mínimo de 500, o número de subpopulações a serem conservadas deveria ser de, pelo menos, 150. Mesmo se considerarmos menores valores de F_{ST}, ou seja, populações menos estruturadas, o número de subpopulações requeridas para manter tamanho efetivo adequado continua alto. Isto implica a impossibilidade de delinear uma estratégia de conservação baseada apenas em unidades de conservação públicas, reforçando a importância das reservas particulares (áreas de preservação permanente e reservas legais) em um plano de conservação. A maior dificuldade, neste caso, diz respeito ao manejo destas reservas. Em geral, são

reservas com pequenos fragmentos da vegetação original, portanto com pequeno número de indivíduos de uma dada espécie, o que pode tornar a população local inviável em longo prazo devido a efeitos de endogamia e deriva genética (CHAVES et al., 2011). Outro fator importante e que merece ser mais estudado, são os efeitos da ausência do fogo, que pode levar a uma mudança na composição florística do fragmento e consequente perda de adaptação de espécies de cerrado aberto. Portanto, um plano de manejo com foco em recursos genéticos nativos deveria incluir o monitoramento de um número suficiente de reservas particulares, em sistema de cooperação com os proprietários rurais.

Tabela 1. Parâmetros genético-populacionais (estatísticas *F* de Wright) em algumas espécies nativas do cerrado.

Espécie	Marcador	F_{IT} [1/]	F_{ST}	F_{IS}	Referência
Baru	SSR	0,161	0,174	-0,028	SOARES (2009)
Cagaita	Isoenzima	0,442	0,154	0,243	TELLES et al. (2003)
Cagaita	SSR	0,238	0,250	-0,017	ZUCCHI et al. (2003)
Cagaita	SSR	0,299	0,175	0,150	BARBOSA et al. (2015)
Pequi	SSR	0,172	0,070	0,110	COLLEVATTI et al. (2001)
Pequi	SSR	0,164	0,066	0,108	MOURA (2011)
Jatobá-do-cerrado	SSR	0,230	0,161	0,082	BRAGA (2015)
Mangaba	SSR	0,365	0,190	0,216	RODRIGUES (2009)

[1/] De acordo com a nomenclatura de Cockerham (1973) .

Outro aspecto importante que pode ser revelado por análises moleculares é a diversidade interna de cada subpopulação, o que pode ser usado na escolha de subpopulações prioritárias para conservação. A Figura 1 mostra resultado de um estudo usando microssatélites realizado com baru (*Dipteryx alata*), um importante recurso genético do Cerrado (SOARES et al., 2015). Foram amostradas 23 subpopulações naturais em grande parte da área de ocorrência da espécie, nos estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo, totalizando 583 indivíduos genoti-

pados. O mapa mostra subpopulações mais diversas no centro e sudoeste da região de ocorrência da espécie. Uma abordagem para incorporar informações da variabilidade intraespecífica em programas de conservação *in situ* ou *ex situ* é apresentada por Diniz-Filho et al. (2012), utilizando dados de barueiro como exemplo.

Figura 1. Áreas de coleta de baru (*Dipteryx alata* Vog.) e resultados de diversidade genética (heterozigosidade esperada – He) de cada subpopulação (adaptado de SOARES et al., 2015). Em cinza a área do bioma Cerrado.

Para conservação *ex situ,* as mesmas informações genéticas fornecem a base para planejamento das coletas a serem realizadas *in situ*. As coleções de germoplasma de espécies arbóreas do Cerrado existentes até o momento estão em condição *in vivo*, ou seja, em condições de campo. Uma forma de maximizar o aproveitamento destas coleções é integrar a conservação com estudos genético-agronômicos e melhoramento. Para manter uma boa amostra da variabilidade genética, várias subpopulações devem ser coletadas, em áreas representativas da região de ocorrência da espécie. A coleção pode ser implantada em esquema de procedências e progênies, coletando-se uma amostra de plantas matrizes por subpopulação, com várias plantas por família materna. No campo, cada família constituiria um tratamento, com

delineamento experimental adequado. Neste esquema, a coleção permite avaliar a estrutura genética da população para caracteres quantitativos e a estimação de parâmetros úteis ao melhoramento, além da conservação propriamente dita. Para maximizar o tamanho efetivo da coleção, deve-se priorizar o maior número possível de subpopulações amostradas, mesmo que isto acarrete a diminuição do número de matrizes por subpopulação e o número de plantas por progênie. Exemplos de coleções nesse esquema são as coleções de baru, cagaita e jatobá-do-cerrado da Universidade Federal de Goiás, em Goiânia. Para cada espécie, as coletas foram realizadas em 25 subpopulações, com 6 matrizes por subpopulação e 4 repetições de cada família no campo, em parcelas com plantas individuais, totalizando 600 plantas de 150 famílias maternas.

Domesticação

Entre as frutíferas arbóreas do cerrado, nenhuma chegou a ser completamente domesticada, embora haja sinais de cultivo de algumas delas pelos indígenas, como o pequi e mangaba, na região do Alto Xingu (VILLAS BÔAS, 2012). A definição do potencial para cultivo de uma espécie frutífera nativa deve levar em conta vários fatores (VIEIRA et al., 2016). Do ponto de vista agronômico devem ser observados aspectos como a facilidade de propagação via sementes ou assexuada, a adaptação em ambientes de cultivo, o tempo provável para início de produção e produção plena, a ocorrência natural de pragas e doenças etc. A qualidade nutricional do produto e sua aceitação pela população local constituem outro aspecto importante a ser considerado, além da disponibilidade de técnicas de conservação e processamento pós-colheita. Ademais, impactos ambientais, econômicos e sociais complementam a lista de requerimentos para iniciar pesquisas visando ao cultivo de uma espécie nativa, devendo ser dada especial atenção ao potencial do mercado (CLEMENT, 2001). Certamente, é difícil encontrar em uma mesma espécie todas as condições favoráveis para cultivo. Por exemplo, o buriti, apesar de todo seu valor alimentar e potencial favorável de impactos sócio econômicos, apresenta grandes restrições para adaptação a am-

bientes drenados. No entanto, poderia ser espécie chave na recuperação de áreas úmidas degradadas.

A domesticação é um processo em longo prazo que envolve mudanças complexas em características morfológicas e fisiológicas das populações. Uma vez iniciado o processo de cultivo, diferentes graus de domesticação podem ser alcançados até que a espécie possa ser considerada completamente domesticada (CLEMENT, 2001). Tratando-se de espécies nativas em estado silvestre, o que se pode almejar é apenas criar as condições mínimas necessárias para o cultivo, que constitui o primeiro passo para a domesticação. A primeira condição seria conhecer o processo de propagação e estabelecer um processo viável de produção de mudas. A propagação sexuada por sementes é possível em todas as espécies frutíferas arbóreas mais importantes. A maioria das espécies produz frutos no final da estação seca e início da estação chuvosa e suas sementes não apresentam dormência. Neste grupo encontram-se o caju-do-cerrado, a cagaita, o baru, o jatobá-do-cerrado, a mangaba, a gabiroba, a pera-do-cerrado, além de outras. Estas espécies não apresentam, geralmente, problemas para produção de mudas a partir de sementes, devendo-se atentar para o período de armazenamento das mesmas, já que algumas são recalcitrantes. Algumas espécies desenvolveram mecanismos de dormência de sementes, com frutificação mais tardia, de meados ao final da estação chuvosa, época desfavorável para o desenvolvimento das plântulas já que teriam de enfrentar a estação seca antes do desenvolvimento adequado do sistema radicular. São exemplos destas espécies o pequi e o araticum.

A propagação assexuada artificial seria outra opção, comum nas espécies frutíferas cultivadas. Para algumas espécies já existem estudos que mostram a viabilidade deste tipo de propagação, principalmente a enxertia, como o pequi (PEREIRA et al., 2002a) e a mangaba (PEREIRA et al., 2002b). No entanto, há ainda carência de estudos que mostrem a persistência e desenvolvimento em longo prazo das plantas enxertadas.

Outro aspecto a ser considerado nas experiências de plantio é o sistema de cultivo, se exclusivo, em consórcio com culturas anuais ou com pastagem, ou mesmo mistura de diferentes espécies arbóreas perenes. Cultivos exclusivos devem ser considerados com cautela, principalmente em plantios mais extensos, pelo risco de vulnerabilidade a pragas e doenças. Para espécies de maior porte, como baru, pequi ou cagaita, o consórcio com pastagem poderia ser uma alternativa interessante. Neste caso, a espécie frutífera poderia ser implantada em espaçamentos maiores, intercaladamente com culturas anuais nos primeiros anos, implantando-se a pastagem após a frutífera ter alcançado um porte suficiente para permitir o pastejo de animais de menor porte. Para que se possam recomendar sistemas de cultivo com segurança são necessárias pesquisas experimentais em longo prazo.

Plantios experimentais de algumas espécies frutíferas do cerrado iniciaram-se na Universidade Federal de Goiás a partir de 1997. Pela experiência acumulada até o momento, tem-se verificado como de grande potencial em cultivo a mangaba e o baru, pela aceitação comercial, facilidade de propagação, bom desenvolvimento inicial e produção relativamente precoce, pelo menos de parte das plantas. Outra espécie que merece destaque é o pequi pela sua grande aceitação por parte dos consumidores. No entanto, algumas dificuldades de propagação ainda persistem, além do elevado tempo para início de produção.

Melhoramento

A viabilização de atividades de cultivo de uma espécie nativa precisa aliar estudos fitotécnicos com ações de melhoramento que busquem genótipos mais aptos às condições de cultivo e com características que valorizem o produto obtido. O primeiro passo é estabelecer um ou mais ideotipos para a espécie em questão. Como características gerais podem-se citar o bom desenvolvimento inicial, precocidade de produção, tolerância a pragas e

doenças, alta produtividade e produto com qualidade adequada. Algumas caraterísticas podem variar com o sistema de cultivo, como o porte da planta, por exemplo.

As principais espécies frutíferas arbóreas do cerrado são alógamas ou predominantemente alógamas e as populações naturais apresentam, em geral, alta variabilidade genética. Assim sendo, o melhoramento pode iniciar-se aproveitando esta grande variabilidade natural, sem a necessidade de realizar cruzamentos dirigidos. Os estudos relacionados ao melhoramento destas espécies, até o momento, têm enfatizado a avaliação da variabilidade genética de caracteres de interesse e o potencial para seleção de populações naturais ou coleções experimentais (ex. AGUIAR et al., 2009; GANGA et al., 2009; MOURA et al., 2013; ALMEIDA JÚNIOR et al., 2014).

Um programa de melhoramento em longo prazo poderia iniciar-se com a formação de uma boa coleção de germoplasma de trabalho a partir de coletas realizadas *in situ*. Se a coleção tiver objetivo também de conservação de recursos genéticos *ex situ*, a coleta deve abranger muitas subpopulações e ser realizada de forma mais ou menos aleatória, de forma a amostrar bem a variabilidade genética da população alvo, conforme já enfatizado. Se o objetivo for apenas o melhoramento, a coleta pode ser dirigida a subpopulações mais promissoras, se esta informação estiver disponível e, em cada subpopulação, matrizes com características superiores podem ser selecionadas individualmente (MOURA et al., 2013). A coleta individualizada de sementes de cada matriz permite a instalação de ensaios de procedências e progênies, um delineamento clássico para seleção de plantas perenes muito utilizado em pesquisas florestais. Para fins de melhoramento, não se requerem tamanhos efetivos elevados como para conservação *in situ*. O ideal, recomendado pelos textos sobre o assunto, seria manter um tamanho efetivo em torno de 100, sendo 50 um valor mínimo requerido. Se houver a disponibilidade de técnica eficiente de propagação assexuada para a espécie em questão, uma alternativa seria a coleta de material vegetal para clonagem e consequente instalação de um ensaio de comparação de clones. No estágio

atual de conhecimento sobre as espécies frutíferas nativas do cerrado esta alternativa parece não ser a mais adequada.

A partir de uma coleção de trabalho *in vivo* um programa de melhoramento em longo prazo poderia utilizar o método de seleção recorrente, associado ou não à seleção de clones (CHAVES, 2006). No modelo clássico de avaliação de procedências e progênies a seleção pode ser feita em todos os níveis hierárquicos. Em plantas alógamas, espera-se que a maior proporção da variabilidade genética esteja entre plantas dentro de subpopulações, com menor proporção entre subpopulações, o que pode ser comprovado pelos valores de F_{ST} da Tabela1. No ensaio, grande parte da variabilidade genética encontra-se dentro de progênies. Supondo famílias de meios irmãos, a variância genética entre progênies corresponde a 1/4 da variância aditiva total, restando 3/4 da variância aditiva e toda a variância de dominância, dentro de progênies. Assim, a seleção poderia ser realizada tomando-se as melhores progênies, desconsiderando o nível de subpopulações, e as melhores plantas dentro de cada progênie selecionada. Nesse caso, deve-se dar preferência para seleção entre progênies de caracteres mais influenciados pelo ambiente, selecionando-se dentro para caracteres de maior herdabilidade em nível individual. Técnicas de genética quantitativa ajudam a simular diferentes opções de seleção para diferentes caracteres, permitindo maior acerto nas alternativas escolhidas. As matrizes selecionadas poderiam ser utilizadas para coleta de sementes melhoradas de primeira geração (pomar de sementes) e/ou gerarem novas progênies a serem avaliadas em ensaio para o novo ciclo de seleção. Esse esquema corresponde à seleção em apenas um sexo, ou seja, seleção materna, com polinização livre. Para que a seleção se dê nos dois sexos seria necessária a eliminação das plantas não selecionadas o que desmancharia o ensaio original. Uma vez viabilizada a reprodução assexuada, as matrizes selecionadas poderiam ainda ser utilizadas para gerar clones a serem testados em ensaios específicos. No caso do uso de clones para plantio comercial, seria recomendável o plantio de mais de um genótipo para diminuir a vulnerabilidade genética do pomar.

No caso de espécies autoincompatíveis, como a mangaba, essa prática seria obrigatória, para garantir a fertilização no campo de produção.

Uma alternativa mais simples seria o plantio de acessos individuais, sem delineamento experimental. Neste caso, por seleção massal as melhores plantas seriam selecionadas constituindo as matrizes do pomar de sementes. Eliminando-se as plantas não selecionadas a seleção se daria nos dois sexos. Este esquema poderia dar bons resultados em populações com alta variabilidade genética para os caracteres de interesse. Permitiria ainda o plantio adensado, já que uma grande proporção das plantas seria eliminada. Especial atenção deveria ser dada ao tamanho efetivo da população resultante, selecionando-se um número suficiente de plantas matrizes.

Referências

AGOSTINI-COSTA, T. S.; SILVA, D. B.; VIEIRA, R. F.; SANO, S. M.; FERREIRA, F. R. Espécies de maior relevância para a Região Centro-Oeste. In: VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. S.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. (Ed.) **Frutas nativas da Região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. p. 11-24.

AGUIAR, A. V.; VENCOVSKY, R.; CHAVES, L. J.; MOURA, M. F.; MORAIS, L. K. Genetics and expected selection gain for growth traits in *Eugenia dysenterica* DC. populations. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 3, p. 629-637, 2009.

ALMEIDA JÚNIOR, E. B.; CHAVES, L. J.; SOARES, T. N. Genetic characterization of a germplasm collection of cagaiteira, a species native to the cerrado. **Bragantia**, v. 73, p. 246-252, 2014.

BALDERMANN, S.; BLAGOJEVIC, L.; FREDE, K; KLOPSCH, R.;NEUGART, S.; NEUMANN, A.; NGWENE, B.; NORKEWEIT, J.; SCHROTER, D.; SCHROTER, A.; SCHWEIGERT, F. J.; WISNER, M.; SCHREINER, M. Are neglected plants the food for the future? **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 35, p. 106-119, 2016.

BARBOSA, A. C. O. F.; COLLEVATTI, R. G.; CHAVES, L. J.; GUEDES, L. B. S.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; TELLES, M. P. C. Range-wide genetic differentiation of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) populations in Brazilian Cerrado. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 59, p. 288-296, 2015.

BRAGA, R. S. **Genética geográfica de *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae)**. 2015. 134 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

CHAVES, L. J. Recursos genéticos no Cerrado. In: SILVA JR, J. F.; LÉDO, A. S. **A cultura da mangaba**. Aracaju, SE: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. p. 75-84.

CHAVES, L. J.; VENCOVSKY, R.; SILVA, R. S. M.; TELLES, M. P. C.; ZUCCHI, M. I.; COELHO, A. S. G. Estimating inbreeding depression in natural plant populations using quantitative and molecular data. **Conservation Genetics**, v. 12, p. 569-576, 2011.

CLEMENT, C. R. Melhoramento de espécies nativas. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos Genéticos & Melhoramento – Plantas**. Rondonópolis, MT: Fundação MT, 2001. p. 423-441.

COCKERHAM, C. C. Analysesof gene frequencies. **Genetics**, v. 74, p. 679-700, 1973.

COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species Caryocar brasiliense, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology,** v. 10, p. 349-356, 2001.

CORADIN, L.; CAMILLO, J.; OLIVEIRA, C. N. S. A iniciativa plantas para o futuro. In: VIEIRA, R. F.; CAMILLO, J.; CORADIN, L. (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: Região Centro-Oeste**. Brasília, DF: MMA, 2016. p. 27-66. (Série Biodiversidade; 44).

DIAMOND, J. **Armas, germes e aço: os destinos das sociedades humanas**. Rio de Janeiro, RJ: Record, 2001. 472 p.

DINIZ-FILHO, J. A. F.; MELO, D. B.; OLIVEIRA, G.; COLLEVATTI, R. G.; SOARES, T. N.; NABOUT, J. C.; LIMA, J. S.; DOBROVOLSKI, R.; CHAVES, L. J.; NAVES, R. V.; LOYOLA, R. D.; TELLES, M. P. C. Planning for optimal conservation of geographical genetic variability within species. **Conservation Genetics**, v. 13, p. 1085-1093, 2012.

GANGA, R. M. D.; CHAVES, L. J.; NAVES, R. V. Parâmetros genéticos em progênies de *Hancorniaspeciosa* Gomes do Cerrado. **Scientia Forestalis**, v.37, p. 395-404, 2009.

MENDONÇA, R.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M.; SILVA, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E. N.; FAGG, C. W. Flora vascular do Bioma Cerrado: Checklist com 12356 espécies. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. (Ed.) **Cerrado: ecologia e flora**. Planaltina, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 422-442.

MOURA, N. F. **Caracterização de frutos e progênies de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) do Cerrado.** 2011. 150 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

MOURA, N. F.; CHAVES, L. J.; NAVES, R. V.; AGUIAR, A. V.; SOBOERAJSKI, G. R. Variabilidade entre procedências e progênies de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Scientia Forestalis,** v. 41, p. 103-112, 2013.

MYERS, N.; METTERMEIER, R. A.; METTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENTS, J. Biodiversity hot spots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

NAVES, R. V. **Espécies frutíferas nativas dos cerrados de Goiás:** caracterização e influências do clima e dos solos. 1999. 227 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1999.

NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 858 p.

PEREIRA, A. V.; PEREIRA, E. B. C.; FIALHO, J. F.; JUNQUEIRA, N. T. V.; GOMES, A. C. Avaliação de métodos de enxertia em mudas de pequizeiro. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n. 51, 2002a. 15 p.

PEREIRA, E. B. C.; PEREIRA, A. V.; CHARCAHR, M. J. A. PACHECO, A. R.; JUNQUEIRA, N.T. V.; FIALHO, J. F. Enxertia de mudas de mangabeira. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. **Documentos**, n. 65, 2002b. 27 p.

RIBEIRO, J. F.; RATTER J. A.; BRIDGEWATER, S.; PROENÇA, C. B.; FELFILE, J. M.; NOGUEIRA, P. E.; RESENDE, A. V.; WALTER, B. M. T.; MUNHOZ, C. B. R.; ALMEIDA, S. P.; FILGUEIRAS, T. Caracterização e manutenção da biodiversidade da flora lenhosa da região do cerrado. In: Embrapa/CPAC. **Relatório Técnico Anual do CPAC 1991-1995**. Brasília, DF: Embrapa/CPAC. 1997. p. 35-37.

RODRIGUES, A. J. L. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites e estrutura genética de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae)**. 2009. 111 f. Tese (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

POHL, J. E. **Viagem no interior do Brasil**. São Paulo, SP: Edusp, 1976.

SAINT-HILLAIRE, A. **Viagem pelas províncias de Rio de Janeiro e Minas Gerais**. Belo Horizonte, MG: Itatiaia, 1975.

SOARES, T. N. **Estrutura genética populacional e fluxo gênico em *Dipteryx alata* Vogel (Fabaceae) no cerrado.** 2009. 120 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

SOARES, T. N.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; NABOUT, J. C.; TELLES, M. P. C.; TERRIBILE, L. C.; CHAVES, L. J. Patterns of genetic variability in central and peripheral populations of Dipteryx alata (Fabaceae) in the Brazilian Cerrado. **Plant Systematics and Evolution**, v. 301, p. 1315-1324, 2015.

TELLES, M. P. C.; COELHO, A. S. G.; CHAVES, L. J.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; VALVA, F. D. Genetic diversity and population structure of: spatial analysis and implications for conservation and management *Eugenia dysenterica:* Spatial analysis and implications for conservation and management DC. ("cagaiteira" – Myrtaceae) in Central Brazil. **Conservation Genetics**, v. 4, p. 685-695, 2003.

VENCOVSKY, R.; CROSSA, J. Measurements of representativeness used in genetic resources conservation and plant breeding. **Crop science**, v. 43, n. 6, p. 1912-1921, 2003.

VENCOVSKY, R.; CHAVES, L. J.; CROSSA, J. Variance effective population size for dioecious species. **Crop science**, v. 52, n. 1, p. 79-90, 2012.

VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. S.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. (Ed.) **Frutas nativas da Região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. p. 11-24.

VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. S.; SILVA, D. B.; SANO, S. M.; FERREIRA, F. R. Espécies alimentícias nativas da Região Centro-Oeste. In: VIEIRA, R. F.; CAMILO, J.; CORADIN, L. (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: Plantas para o futuro – Região Centro-Oeste**. Brasília, DF: MMA, 2016. p. 109-118.

VILLAS BÔAS, O.; VILLAS BÔAS, C. **A marcha para o oeste: A epopeia da expedição Roncador-Xingu**. São Paulo, SP: Companhia das Letras, 2012. 638 p.

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. P. V.; PINHEIRO, J. B.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Geneticsand Molecular Biology**, v. 26, p. 449-457. 2003.

Promoção

SBMP
Regional/DF

ISBN 978-85-540487-3-0

Organização

FAV/UnB

Embrapa

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

GOVERNO
FEDERAL