

Marcadores moleculares abrem campo para introdução de novas espécies em pastagens

Técnica desenvolvida no CBMEG deve auxiliar melhoramento genético de leguminosas

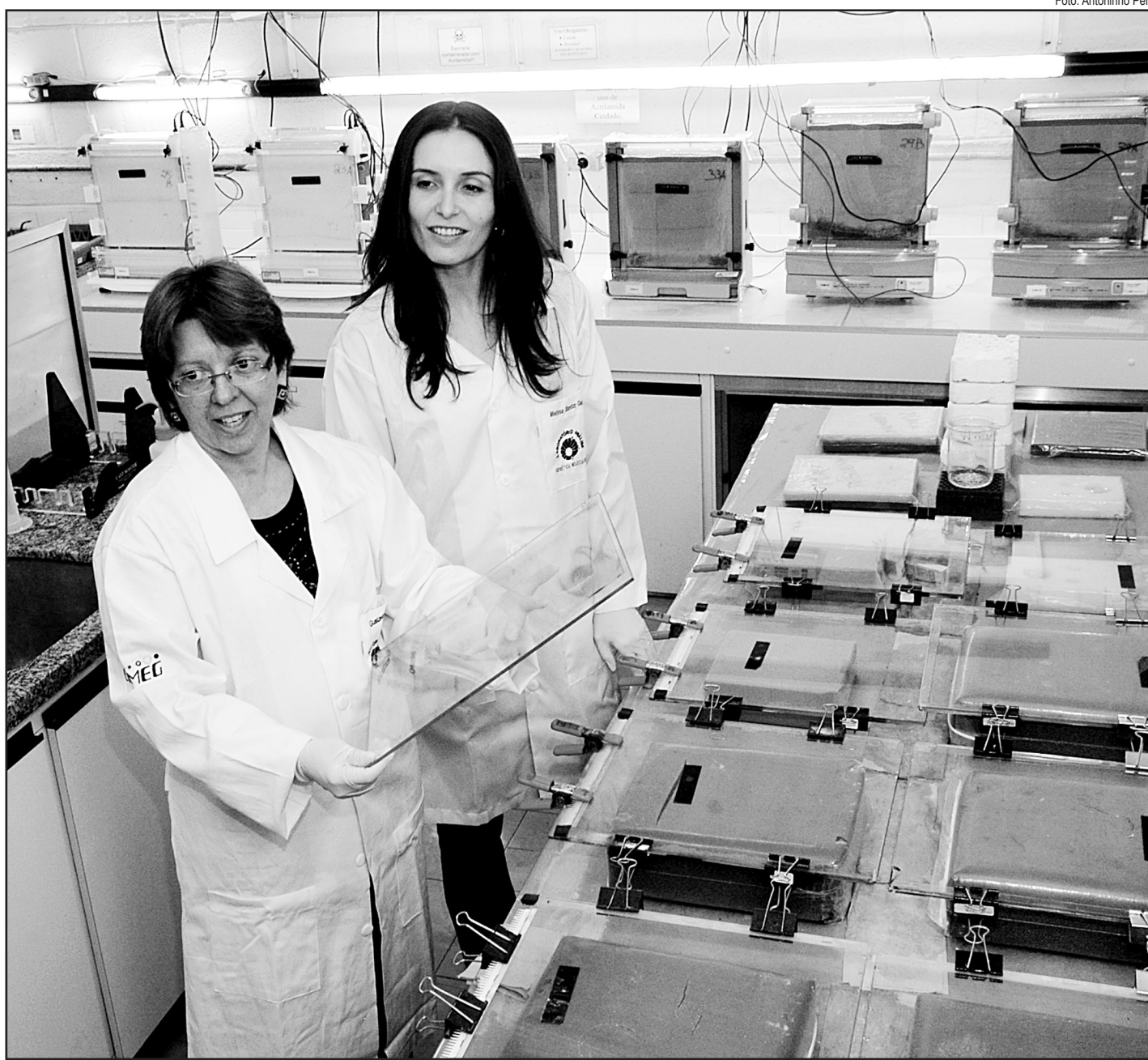
MARIA ALICE DA CRUZ
halice@unicamp.br

Marcadores moleculares do tipo microssatélites desenvolvidos pela pesquisadora Melissa de Oliveira Santos-Garcia no Laboratório de Análise Genética e Molecular do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Unicamp devem auxiliar no melhoramento das leguminosas do gênero *Stylosanthes*, passíveis de ser usadas em pastagens pelo setor agropecuário. Três espécies do gênero, *S. guianensis*, *S. macrocephala* e *S. capitata*, estudadas por meio dos marcadores, apresentaram variabilidade genética e taxas de cruzamento relevantes para melhoramento e produção de sementes. Por serem espécies nativas, essas forrageiras, associadas às gramíneas - comumente usadas em pastagens - podem representar redução de custos para o setor. Segundo a pesquisadora, em estudos anteriores, essas espécies se mostraram eficientes em solos de baixa fertilidade, além de conter nutrientes importantes para o animal.

Melissa explica que, devido à capacidade das leguminosas de transformar o nitrogênio atmosférico e fixá-lo no solo, seu uso é indicado como uma alternativa mais econômica para a recuperação das pastagens. "Além de serem propensas ao cruzamento e apresentarem vários acessos disponíveis em bancos de germoplasma (unidades conservadoras de material genético de uso imediato ou com potencial de uso futuro), essas forrageiras são facilmente encontradas no Brasil, maior centro de origem e diversidade do gênero". Mas, mesmo sendo o primeiro, o país tem pouca informação disponível sobre a composição, a distribuição e a variação genética das espécies do gênero. Nesse sentido, marcadores do tipo microssatélite podem fornecer informações úteis inclusive na obtenção de sementes de qualidade genética superior, segundo Melissa.

"Realizar o cruzamento a partir de dados genéticos é fundamental em programas de melhoramento e conservação genética porque permite delinear melhores estratégias de amostragem da variabilidade e selecionar modelos mais adequados para as estimativas de parâmetros genéticos de interesse", afirma Melissa. O conhecimento da quantidade e da distribuição da diversidade genética dentro das coleções investigadas é importante para que os programas de melhoramento possam utilizar de forma adequada os bancos de germoplasma.

A pesquisa, desenvolvida durante a tese de doutorado de Melissa, "Estudo da diversidade genética e da taxa de cruzamento em *Stylosanthes* spp. através de marcadores microssatélites", orientada pela professora Anete Pereira de Souza, do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp e do CBMEG, e co-orientado pela pesquisadora Rosângela Resende (Embrapa Gado de Corte/MS), já rendeu a publicação de três artigos nas revistas especializadas *Molecular*



A professora Anete Pereira de Souza, orientadora, e a pesquisadora Melissa de Oliveira Santos-Garcia, autora da tese: leguminosas apresentaram variabilidade genética e taxas de cruzamento relevantes

Espécies surpreendem pela variedade genética

Cada amostra representativa de um indivíduo ou de vários indivíduos de uma população que entra em um banco de germoplasma é chamada de acesso. Em *S. guianensis*, a pesquisadora avaliou 150 acessos escolhidos para representar o banco de germoplasma da Embrapa Cerrados, com base nos agrupamentos observados em um trabalho anterior que avaliou 437 acessos da mesma coleção. "Foi possível relacionar os grupos formados por meio da análise dos microssatélites com as diferentes variedades botânicas propostas com base em caracteres morfológicos, sendo que uma dessas variedades apresentou uma estruturação por região de coleta", explica. A relação entre dados moleculares e as variedades botânicas de *S. guianensis*, segundo Melissa, tinha começado a ser estudada em um trabalho anterior.

A análise da variabilidade em 134 acessos da espécie *S. macrocephala*, de acordo com a pesquisadora, levou à formação de cinco grupos distintos, mostrando uma ampla diversidade genética nesta coleção. Os acessos avaliados são pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Cerrados.

A distância genética nas duas espécies foi maior que a observada a partir de outros marcadores moleculares anteriormente utilizados, tanto nessas quanto em outras espécies de *Stylosanthes*, mostrando a utilidade dos microssatélites para estudar a diversidade genética e a estrutura populacional do gênero.

Estimulando os melhoristas

"É importante para os melhoristas saber que existe variabilidade. As plantas podem parecer todas semelhantes, mas geneticamente são diferentes. Ou podem ser muito diferentes na aparência e ser semelhantes geneticamente", pontua Anete. A professora afirma que antes não havia técnicas poderosas para

mostrar isso de forma clara e efetiva.

No início do trabalho do projeto, os melhoristas não tinham tanta confiança nos marcadores moleculares, mas, ao longo do desenvolvimento, viram como os dados eram capazes de trazer esclarecimentos para eles. Diante disso, o interesse por marcadores de

análise genética, segundo Anete, foi crescendo de forma tão visível, a ponto de se expandir. "Hoje, pesquisadores da Embrapa nos procuram o tempo todo, pedindo informações que consideram importantes para seus programas de melhoramento. As primeiras informações surpreendiam pela clareza

e pela consistência", declara.

Os resultados das pesquisas, segundo Anete, são muito promissores e consistentes e, aos poucos, contribuem para que a área de melhoramento de plantas forrageiras se aprimore.

Melissa complementa dizendo que a taxa de cruzamento é uma

informação básica do melhoramento. "Até mesmo para manutenção da coleção. Quem vai produzir sementes tem de ter cuidado para saber como proceder." Os marcadores, segundo ela, colaboram para se obter mais rapidamente as novas variedades, aumentando assim a eficiência do melhoramento.

Ecology Resources e *Conservation Genetics Resources*, dos Estados Unidos. De acordo com a pesquisadora, três artigos estão em revisão.

"O Brasil tem mais cabeças de gado que gente", diz a orientadora Anete, que prossegue informando que o agonegocio de sementes de forrageiras é do mesmo tamanho que o de sementes de milho. "O agonegocio é igual ao do milho, mas há poucas pesquisas e poucas empresas envolvidas, portanto, é altamente rentável para quem está nele atuando. É um mercado aberto para entrada de novos participantes, além da necessidade de se produzir mais variedades e sementes de variedades melhoradas para atender ao mercado existente", acrescenta.

Os marcadores constituem ferramentas importantes para estudos futuros que possam auxiliar no melhoramento e na conservação das espécies, assim como no entendimento da estrutura de populações naturais, segundo Melissa. Eles não se limitam às espécies contempladas na tese, pois outros pesquisadores, a partir de agora, podem aprimorar o conhecimento de características de outras espécies.

A pesquisadora enfatiza que muitos métodos de determinação da taxa de cruzamento ainda são baseados apenas na taxonomia e na biologia floral das plantas, mas a união das metodologias de análise oferece respostas mais precisas quanto às taxas

de cruzamento e ao conhecimento da variabilidade genética existente. Ela explica que, antes da pesquisa com marcadores, acreditava-se em taxas próximas de zero, mas, ao final do estudo, a espécie *S. capitata* apresentou taxa de 31% e a *S. guianensis*, 26%. Grande parte das espécies do gênero, segundo Melissa, tem suas taxas de cruzamento desconhecidas ou estimadas apenas com base em caracteres morfológicos, que podem sofrer influência do ambiente. Os métodos modernos, como os marcadores de Melissa, devem contribuir para a facilitação de futuras investigações sobre números e tipos de alelos (partes diferenciadas do gene) que levem a um cruzamento adequado com vistas ao melhoramento.

Controvérsias

Os resultados obtidos com os marcadores devem causar uma mudança significativa no entendimento da classificação da espécie *S. guianensis*, que apresenta uma taxonomia (classificação) controversa. O que se tinha até o momento na literatura, segundo a pesquisadora, eram dois estudos: o do pesquisador holandês t'Mannetje, que considera que *S. guianensis* é composta por sete variedades botânicas; e outro do português Nuno Costa, que, durante sua permanência no Brasil, afirmou que seis dessas "variedades" sugeridas

por t'Mannetje são outras espécies. "O dr. Nuno Costa viu que só dentro de uma das variedades havia uma variação muito grande e que ela poderia ser classificada como uma nova espécie e ainda dividida em quatro variedades com base nessa variação.", afirma Melissa.

"Até o momento, todos na literatura apoiam a classificação feita pelo holandês, mas, agora, com os resultados obtidos pelos marcadores, pudemos reafirmar a classificação feita por Nuno Costa", revela Anete Pereira de Souza.

O impasse de mais de 20 anos entre as classificações portuguesa e holandesa justificam a importância do desenvolvimento de marcadores moleculares, como os desenvolvidos por Melissa. "É muito importante para o uso de diferentes plantas em cruzamentos conhecer suas relações filogenéticas. Além disso, é preciso saber se uma é próxima da outra ou não, conhecer as relações genéticas para se ter uma classificação correta. É preciso saber se a planta se autofecunda ou cruza com outras plantas", acrescenta a pesquisadora.

O trabalho foi realizado a partir do Banco de Germoplasmas de *Stylosanthes* da Embrapa Gado de Corte (Campo Grande-MS) e da Embrapa Cerrados, em Brasília, parceiras da orientadora Anete Pereira de Souza em projeto sobre o desenvolvimento

de plantas forrageiras, financiado pelo CNPq e pela Fapesp, dentro do qual vários alunos do Laboratório participam desde 2005.

A Unicamp, ao lado da Embrapa, intensifica o desenvolvimento de trabalhos com plantas forrageiras. A professora explica que são trabalhos de pré-melhoramento, que podem contribuir em muito para o trabalho de melhoristas. "Cada vez que apresentamos os resultados dos trabalhos com marcadores, os melhoristas se surpreendem com a quantidade e a qualidade das informações, muito úteis aos programas de melhoramento", acrescenta Anete.

A orientadora explica que existiam alguns estudos com gramíneas, mas na área de desenvolvimento de marcadores para forrageiras leguminosas tropicais o de Melissa é um dos primeiros. "Apesar de estudos feitos anteriormente, nenhum privilegiava a área de pré-melhoramento", observa Anete.

Ela acrescenta que quando foi procurada pela Embrapa, existiam 15 espécies de interesse aos programas de melhoramento, nos bancos de germoplasma sem conhecimentos genéticos básicos e necessários. "Havia um grande potencial que não era usado por falta de conhecimento. São forrageiras exóticas e brasileiras. O projeto é tão gratificante e necessário que, com o tempo, outras unidades da Embrapa foram se envolvendo", informa.