

# **Tópicos Especiais em Genética Aplicada**

**Volume 4**

Jaboticabal, São Paulo

Funep - 2017

Copyright©: Fundação de Apoio à Pesquisa, Ensino e Extensão - Funep

*Editoração e Impressão Gráfica:*  
Funep

ISBN 978-85-7805-171-6

---

T674 Tópicos especiais em genética aplicada / Coordenador Carla Resende Bastos ... [et al.]. -- Jaboticabal : Funep, 2017  
v. 4, vi, 131 p. : il.

Inclui bibliografia

1. Genética. 2. Plantas transgênicas. 3. Genética quantitativa. 4. Reação da Polimerase em Cadeia. 5. RNA. I. Bastos, Carla Resende. II. Título.

CDU 575

---

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação - Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



2017  
Proibida a reprodução total ou parcial.  
Os infratores serão punidos na forma da lei.  
Fundação de Apoio à Pesquisa,  
Ensino e Extensão - Funep  
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/nº  
14884-900 - Jaboticabal - SP  
Fone: (16) 3209-1300 / Fax: (16) 3209-1301  
Site: <http://www.funep.org.br>

# Prefácio

O Curso de Inverno de Genética é realizado anualmente, desde 2004, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, FCAV/UNESP, pelos discentes e docentes dos cursos de Pós-Graduação, a fim de abordar diferentes temas relacionados à genética vegetal e animal, à genética de microrganismos e humana, bem como àqueles relacionados às "ômicas" e à bioinformática. Desde a 10ª edição do curso, o livro "Tópicos Especiais em Genética" é elaborado para difundir as informações científicas apresentadas e discutidas nos diferentes minicursos.

Em decorrência da enorme aceitação dos assuntos tratados nos volumes anteriores deste livro, esta edição, denominada "Tópicos Especiais em Genética Vol. IV", busca apresentar uma linguagem ainda mais acessível sobre melhoramento clássico de plantas, transgenia na agricultura, filogenética, bioinformática, métodos de biologia molecular e ferramentas atuais que auxiliam o controle biológico. Assim, esta edição vem ao encontro dos interesses não somente dos estudantes como também de profissionais atuante na área de genética.

Agradecemos aos docentes e discentes dos programas de Pós-Graduação (Genética e Melhoramento de Plantas, Microbiologia Agropecuária, Genética e Melhoramento Animal, Zootecnia, Produção Vegetal, Entomologia e Medicina Veterinária) que não mediram esforços para a realização de mais uma edição do Curso, à direção da FCAV/UNESP, à FUNEP, pelo apoio ao evento e, em especial, à Comissão Organizadora do 13º Curso de Inverno de Genética pelo empenho e comprometimento no desenvolvimento desta obra.

*Carla Resende Bastos  
Janete Aparecida Desidério  
Maria Laura Viola Augusto  
Nestor Darío Franco  
Paula Castanho Borges*



# Sumário

## Capítulo 1

### Resistência genética: estratégia de controle

<b>de doenças em hortaliças.....</b>	<b>09</b>
1. Introdução.....	09
2. Identificação de genótipos resistentes .....	10
3. Resistência vertical e horizontal.....	11
4. Herança da resistência a doenças.....	11
5. Interação entre patógeno-hospedeiro .....	12
6. Principais métodos de melhoramento de hortaliças....	13
7. Referências bibliográficas.....	17

## Capítulo 2

### Fisiologia do estresse vegetal e metabolismo

<b>antioxidante de resposta.....</b>	<b>19</b>
1. Introdução.....	19
2. Estresses abióticos .....	19
3. O estresse oxidativo nas plantas .....	22
4. Mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo .....	23
5. Considerações finais .....	25
6. Referências bibliográficas.....	26

## Capítulo 3

### Principais eventos transgênicos utilizados na agricultura .31

1. Introdução.....	31
2. Eventos transgênicos.....	32
3. Considerações finais .....	39
4. Referências bibliográficas.....	40

## **Capítulo 4**

### **Polymerase Chain Reaction (PCR): Protocolo Básico, Troubleshooting e Estratégias para a Otimização da técnica e na customização de primers para diagnóstico molecular ..43**

1. Introdução .....	43
2. Polimerase Chain Reaction - PCR .....	44
3. Inibidores de PCR .....	45
4. Design de Primers .....	46
5. Otimização .....	48
6. Evitando a contaminação da PCR.....	49
7. Troubleshooting.....	50
8. Referências bibliográficas .....	53

## **Capítulo 5**

### **Controle Biológico de Pragas: Histórico,**

### **Avanços e Perspectivas .....**57

1. Introdução .....	57
2. Controle Biológico: Conceito .....	58
3. Tipos de Controle Biológico .....	59
4. Entomófagos .....	59
5. Controle Biológico Aplicado.....	62
6. Novas tecnologias utilizadas no Controle Biológico ....	62
7. RNA de interferência (RNAi) .....	62
8. CRISPR/Cas na Edição Gênica.....	64
9 Referências bibliográficas .....	66

## **Capítulo 6**

### **Melhoramento de plantas no contexto de**

### **estresses bióticos e abióticos .....**71

1. Introdução .....	71
2. Eficiência no uso de nitrogênio .....	71
3. Eficiência de uso da água.....	73
4. Resistência de plantas a doenças .....	74

5. Resistência de plantas aos insetos-praga .....	76
6. Métodos de Melhoramento de Plantas voltados para Estresses Abióticos e Bióticos.....	77
7. Referências bibliográficas .....	79

## Capítulo 7

### Extração, manipulação e aplicações do RNA

<b>total de plantas e bactérias</b> .....	83
1. Introdução .....	83
2. Manipulação do RNA .....	85
3. Coleta de material e extração de RNA.....	85
4. Verificação da Concentração e Integridade de RNA ....	87
5. Aplicações da Molécula de RNA .....	89
6. Referências bibliográficas .....	93

## Capítulo 8

### Análises filogenéticas: conceitos e ferramentas .....

1. Introdução .....	97
2. Procedimentos após o sequenciamento .....	98
3. Referências bibliográficas .....	105

## Capítulo 9

### Transformação genética de plantas de tabaco

#### (*Nicotiana tabacum*) via *Agrobacterium tumefaciens*:

<b>conceitos teóricos e práticos</b> .....	109
1. Introdução .....	109
2. Identificação de genes candidatos .....	109
3. Métodos de transformação genética de plantas .....	111
4. Referências bibliográficas .....	116

## Capítulo 10

### Minireview sobre abordagens, métodos e

<b>conceitos para análise de um microbioma</b> .....	119
--	-----

1. Introdução .....	119
2. Referências bibliográficas .....	125

## **Capítulo 11**

### **Princípios da Genética de Populações**

<b>e Genética Quantitativa .....</b>	<b>129</b>
1. Introdução .....	129
2. Genética de populações .....	130
3. Genética Quantitativa .....	131
4. Genômica .....	134
5. Referências bibliográficas .....	136



# Resistência genética: estratégia de controle de doenças em hortaliças

*Edgard Henrique Costa Silva, Carolina Andrade Franco, Renato Silva Soares, Roberta Luiza Vidal, Bruna Fukumoto Kobayashi, Leila Trevisan Braz*

## 1 Introdução

As doenças são responsáveis por perdas significativas em culturas olerícolas, sendo os principais agentes fitopatogênicos: fungos, bactérias, vírus e nematoides. Devido ao consumo *in natura* deste segmento, além das perdas quantitativas no sistema de produção, as qualitativas merecem destaque. Algumas doenças, embora não reduzam a quantidade produzida de maneira significativa, depreciam o produto, impedindo sua comercialização.

A intensificação da produção de olerícolas com a utilização de sistemas e tecnologias de cultivo mais eficientes favorece o aumento da incidência e severidade de algumas doenças. Nestes ambientes, a ausência de medidas de controle que dificultem a multiplicação do patógeno gera, potencialmente, perdas de até 100% da produção.

Muitas são as medidas de controle utilizadas no manejo de doenças de plantas, todavia o uso de materiais resistentes tem papel de destaque. A resistência genética é a alternativa que apresenta maior segurança no controle, menor custo e menor risco de contaminação ambiental, tanto para o produtor quanto para o consumidor. Vale ressaltar que algumas doenças apenas podem ser controladas de maneira satisfatória por meio da utilização de cultivares geneticamente resistentes, como é o caso de algumas viroses.

No entanto, é importante destacar que apenas a utilização de resistência genética não garante proteção duradoura, principalmente quando a resistência explorada é do tipo vertical. Neste caso, a pressão de seleção exercida pela cultivar resistente pode favorecer o surgimento de novas raças do patógeno que venham a quebrar esta resistência.

Desta maneira, outras estratégias de controle também devem ser aplicadas, somadas à utilização de cultivares resistentes. Não obstante, o uso de resistência genética desempenha papel fundamental no manejo integrado de doenças e, por este motivo, é foco crescente em programas de melhoramento genético de hortaliças.

## **2 Identificação de genótipos resistentes**

Em um programa de melhoramento genético de plantas, uma das etapas fundamentais consiste na escolha dos genitores a serem utilizados. Assim, é necessário realizar estudos dos materiais disponíveis, caracterizando-os quanto à reação à doença que se deseja trabalhar, a fim de fornecer informações para a condução dos programas.

Visando a identificação de materiais resistentes, devem-se submeter as plantas à ação do patógeno que se deseja controlar. Esta triagem de genótipos deve seguir alguns passos para que ela seja realizada de maneira eficiente.

Um dos pontos importantes no estudo da reação dos materiais é quanto à preocupação de se utilizar isolados que sejam patogênicos. Ou também, no caso de patógenos com alta variabilidade, ou que possuam raças fisiológicas, buscar utilizar os de maior representatividade, ou seja, aquelas de maior ocorrência e/ou de maior severidade na cultura.

Outro fator que deve ser ponderado é submeter as plantas a adequado nível do patógeno, pois se o teste não for suficientemente severo, corre-se o risco de plantas suscetíveis não manifestarem a doença e, em caso de avaliação demasiadamente rigorosa, materiais com algum nível de resistência podem ser erroneamente descartados.

A triagem dos genótipos em ambiente protegido é encorajada pela possibilidade de melhor controle de fatores climáticos, como temperatura e luz. Todavia, recomenda-se que estudos de reação conduzidos em casa de vegetação e/ou em laboratórios sejam complementados com avaliações em condições de campo, por expor as plantas a condições reais de cultivo e variabilidade ambiental.

Comumente, quando se seleciona para resistência a uma doença, pode ser verificada a perda de resistência para outro patógeno. Dessa

maneira, faz-se importante, ainda, que os materiais selecionados também sejam avaliados para outras doenças-chave da cultura em questão.

### **3 Resistência vertical e horizontal**

De acordo com Van der Plank (1968, 1984), a resistência genética pode ser classificada em dois tipos: vertical e horizontal. A resistência do tipo vertical é expressa quando a cultivar é resistente a uma ou a poucas raças do patógeno, havendo interação entre os genes de resistência da planta com genes de avirulência/virulência do patógeno. Este tipo de resistência é geralmente associado a um ou a poucos genes e apresenta alta herdabilidade, podendo ser facilmente explorado em programas de melhoramento. No entanto, é facilmente quebrada pelo surgimento de novas raças do patógeno.

Quando a cultivar é igualmente resistente a todas as raças do fitopatógeno, a resistência é dita horizontal. Neste caso, a resistência costuma estar ligada a vários genes de pequeno efeito, como uma característica quantitativa, apresentando baixa herdabilidade. Assim, seu manuseio em programas de melhoramento é difícil e complexo, porém a resistência atingida tende a ser mais duradoura.

### **4 Herança da resistência a doenças**

Um vez constatada a resistência genética em um material, deve-se estudar o controle genético ou herança do caráter. Conhecendo a hereditariedade da resistência, o melhorista poderá planejar o programa de melhoramento mais eficientemente, escolhendo métodos de melhoramento mais adequados.

Biffen (1905) relatou pela primeira vez que a herança da resistência de uma doença apresentava padrões mendelianos, ao trabalhar com a ferrugem amarela do trigo (*Puccinia glumarum*), estabelecendo padrão de um único gene recessivo. A partir daí, vários trabalhos foram conduzidos objetivando estabelecer a hereditariedade de resistência a doenças em plantas (WALKER, 1965).

Os materiais que serão utilizados no estudo do controle genético devem ser contrastantes para a característica que está sendo trabalhada, por exemplo, quando o caráter é resistência a uma doença, faz-se necessário que se tenha genitores altamente suscetíveis e resistentes ao patógeno. Ademais, faz-se importante que os genótipos que serão utilizados sejam puros, visando a evitar segregação

Após a seleção dos genitores contrastantes, procede-se ao cruzamento entre eles para obtenção de híbridos  $F_1$ . Em seguida, deve-se obter a geração  $F_2$ , a fim de gerar segregação nos materiais. Há duas maneiras principais de obtenção da geração  $F_2$ , sendo a primeira por meio de sementeira isolada da geração  $F_1$  com intercruzamento espontâneo, e a segunda por meio da autofecundação das plantas  $F_1$  (RAMALHO et al., 2012). Faz-se importante proceder ao retrocruzamento da geração  $F_1$  com os dois genitores (P1 e P2). Após a obtenção da geração  $F_2$ , todas as gerações devem ser avaliadas quanto à reação à doença que está sendo abordada. As respostas de resistência, suscetibilidade ou comportamentos intermediários são tabuladas para a avaliação das segregações obtidas.

Para obter o tipo de herança, devem-se utilizar recursos estatísticos que testem hipóteses de segregação. Quando o programa de melhoramento objetiva a obtenção de cultivares resistentes a doenças, a reação ao patógeno deve ser verificada ao fim de cada geração. Com base nas observações e testes realizados, pode-se testar quantos alelos estão envolvidos na resistência e se estes apresentam efeito dominância sobre o outro.

## 5 Interação entre patógeno-hospedeiro

Os primeiros estudos com hereditariedade de resistência eram realizados levando em consideração apenas a reação do hospedeiro, sem abordar a virulência do patógeno (BUENO et al., 2006). Flor (1956, 1971), estudando a ferrugem-do-linho, causada por *Melampsora lini*, determinou uma interação entre planta e patógeno. Esse autor definiu que, para cada gene que condiciona uma reação de resistência no hospedeiro, existe um gene complementar no patógeno que condiciona a avirulência. Essa interação ficou conhecida como teoria da interação

gene a gene. Em outras palavras, o resultado de uma interação entre um gene de avirulência dominante (*Avr*) no patógeno e um gene de resistência (*R*), também dominante, no hospedeiro, condiciona resistência (BORÉM; MIRANDA, 2013).

Atualmente, a interação gene a gene é baseada em uma relação receptor-elicitor. Assim, o alelo de avirulência (*Avr*) codifica uma molécula elicitora que é reconhecida por um receptor específico, codificado pelo gene de resistência (*R*) da planta hospedeira. O reconhecimento da molécula elicitora do patógeno inicia uma rota de transdução de sinais que ativam genes envolvidos na resposta de hipersensibilidade (HR), levando à incompatibilidade, ou seja, ausência de doença. Por outro lado, se o patógeno não possuir o gene de avirulência (*Avr*), este não será reconhecido pelo hospedeiro, resultando em interação compatível, suscetibilidade. Assim, a resistência só ocorre quando o hospedeiro possui o gene de resistência (*R*), e o patógeno, o gene de avirulência (*Avr*) correspondente. Em qualquer outra condição, o resultado será a suscetibilidade (CAMARGO, 1995; JOHAL et al., 1995).

Para muitos autores, essa teoria é uma simplificação da relação patógeno-hospedeiro e que se aplica somente nos casos de resistência vertical. Assim, a relação entre patógeno e hospedeiro é bem mais complexa e pode ser baseada em outros fatores de compatibilidade entre o patógeno e a planta, sendo necessário estudo aprofundado dessas condições, para tornar a resistência a fitopatógenos mais durável e efetiva (BORÉM; MIRANDA, 2013).

Algumas técnicas podem ser utilizadas na busca de tornar a resistência a doenças mais duradoura. Por exemplo: fazer rotação de genes, utilizar cultivares com vários genes (piramidação), ou realizar plantio com linhagens semelhantes, mas que contenham genes diferentes (multilinhas) (CAMARGO, 1995).

## **6 Principais métodos de melhoramento de hortaliças**

O melhoramento de hortaliças enfatiza a escolha específica de parentais que contenham a fonte de resistência à doença cujo controle se deseja e valida a reação das progênies frente ao agente patogênico.

Tanto com espécies alógamas como com autógamias tem-se como objetivo fundamental a obtenção de novos híbridos, ou linhagens com alto grau endogâmico. Com a obtenção das linhagens, são instituídos cruzamentos entre elas, avaliando a capacidade combinatória em nível expressivo para produzirem recombinações favoráveis (NICK; BORÉM, 2016). No Brasil, a introdução de germoplasma tem contribuído consideravelmente para a expansão da obtenção de novas cultivares, a fim de aumentar a variabilidade genética, a partir de novos cruzamentos entre esses genótipos.

Em seguida, serão apresentados os principais métodos utilizados no melhoramento de hortaliças visando à resistência a doenças.

## **6.1 Obtenção de híbridos $F_1$**

Para produção de híbridos, são obtidas linhagens puras que contêm características desejáveis. Posteriormente, é realizada a hibridação artificial (BORÉM; MIRANDA, 2013). Este método tem sido estratégia para lançamento de cultivares comerciais, pois, em geral, as populações subsequentes apresentam segregação para características qualitativas e resistência a patógenos. No entanto, para algumas hortaliças, a produção de híbridos torna-se inviável ou dificultada, devido ao tamanho da estrutura floral de algumas espécies, como de alface, por exemplo, não apresentando tecnologia viável economicamente de produção de sementes híbridas.

## **6.2 Retrocruzamento**

O método de retrocruzamento também envolve hibridações, porém com objetivos e metodologia específicos. É o mais utilizado quando se deseja a transferência de uma característica monogênica ou oligogênica. O objetivo do método é a recuperação de características do genitor recorrente, na qual a característica que se deseja eliminar é substituída pela desejável do doador, por exemplo, a introdução de genes que conferem resistência à doença. Este método é mais conveniente para introgressão de genes de maior efeito, favorecendo a resistência vertical. Na transferência de resistência horizontal, não é método muito adequado,

devido à grande quantidade de genes envolvidos (BORÉM; MIRANDA, 2013). Apesar de não apropriada, a transferência de resistência horizontal é possível com sucessivos retrocruzamentos, permitindo a piramidação de genes, ou seja, o acúmulo de genes em uma única linhagem (PINTO, 2009).

### **6.3 Método genealógico ou *pedigree***

O método genealógico é o mais empregado pelos melhoristas de plantas autógamas, principalmente pela possibilidade de se obter completo registro da origem da família e, assim, orientar o processo seletivo (CASTOLDI et al., 2013). O método *pedigree* é baseado na seleção de plantas individuais na população segregante, em que os indivíduos selecionados são avaliados com teste de progênie separadamente, sendo a seleção praticada com base no genótipo dos indivíduos (BORÉM, 2001). As seleções entre e dentro da progênie permitem obtenção de linhagens com aspectos favoráveis.

### **6.4 Outros métodos clássicos de melhoramento de hortaliças**

Além desses métodos, pode ser citado o método descendente de uma única semente (SSD), que permite o avanço de gerações segregantes até atingir alto nível de homozigose a partir de uma única semente de cada indivíduo, estabelecendo a geração subsequente (BRIM, 1966). Outro método de melhoramento utilizado é o da seleção massal, em que as plantas com elevado desempenho fenotípico são selecionadas e intercruzadas, aumentando a média geral da população.

### **6.5 Técnicas biotecnológicas**

O uso da biotecnologia no melhoramento de hortaliças permitiu, ao longo dos anos, avanços significativos no desenvolvimento de novas cultivares com características desejáveis. As técnicas biotecnológicas são utilizadas como ferramentas para acelerar com precisão as atividades usadas no melhoramento convencional e para criar variabilidade

genética através da engenharia genética (SINGH et al., 2013).

Entre as técnicas biotecnológicas utilizadas no melhoramento de hortaliças, visando à resistência a doenças, destacam-se a caracterização de germoplasma por marcadores moleculares, a fusão de protoplastos para obtenção de híbridos interespecíficos, o resgate de embrião, a seleção assistida por marcadores moleculares (SAMM) e a transgenia.

O uso de marcadores moleculares tem sido uma importante ferramenta auxiliar no estudo, na caracterização e na seleção de genes ligados à resistência de hortaliças a doenças. Marcadores estreitamente ligados aos alelos de resistência são utilizados particularmente nas etapas iniciais e intermediárias do programa de melhoramento. A SAMM, em teoria, é rápida e segura, sendo indicada pelo aumento da precisão e da eficiência da seleção, quando comparada aos métodos de seleção fenotípica.

A fusão de protoplastos é uma técnica de hibridação somática utilizada, principalmente, na obtenção de híbridos interespecíficos. Esta técnica possibilita combinar características citoplasmáticas, presentes em espécies não aparentadas, rompendo os limites impostos pela reprodução sexuada. Com a fusão de protoplastos, Hansen e Earle (1995) conseguiram transferir a resistência a *Xanthomonas campestris* de *Brassica napus* para *B. oleracea*.

A técnica de resgate de embrião é utilizada quando ocorre incompatibilidade em cruzamentos intraespecíficos. Com o resgate de embriões, foi possível realizar o cruzamento entre espécies de *Brassica* e conseguir com êxito transferir a resistência a *Xanthomonas campestris* de *B. carinata* para *B. oleracea* (DEY et al., 2015).

No melhoramento de hortaliças, a transgenia ainda é pouco explorada quando comparada a grandes culturas, como soja, milho e algodão. No entanto, há registros do uso dessa técnica no desenvolvimento de cultivares de tomate e batata quanto ao aumento de componentes nutracêuticos. Para resistência a doenças, há estudos sendo desenvolvidos com pimentão para resistência a *Cucumber Mosaic Virus* (LEE et al., 2009), tomate, para resistência a *Cladosporium fulvum* e nematoides de galha (HAMMOND-KOSACK et al., 1998; DUTTA et al., 2015), entre outras espécies, porém sem registro de lançamento comercial.

## 7 Referências Bibliográficas

BIFFEN, R. H. 1905. Mendel's laws of inheritance and wheat breeding. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 1, n. 1, p. 4-48, 1905. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S002185960000137>.

BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2001.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 6. ed. Viçosa: Editora UFV, 523p., 2013.

BRIM, C. A. A modified pedigree method of selection in soybeans. **Crop Science**, Madison, v. 6, p. 220, 1966.

BUENO, L. C. S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. **Melhoramento Genético de Plantas: princípios e procedimentos**. Lavras: UFLA, 2006.

CAMARGO, L. E. A. Análise genética da resistência e da patogenicidade. In: BERGAMIN FILHO, A. et al. (edit.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronomica Ceres, v. 1, p. 470-492, 1995.

CASTOLDI, R.; CHARLO, H. C. O.; BOTELHO, A. P.; MELO, D. M.; DALPIAN, T.; BRAZ, L. T. Utilização do método genealógico para obtenção de progênies de alface resistentes ao míldio. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, S3006-S3013, 2011.

DEY, S. S.; SHARMA, K.; DEY, R. B.; KUMAR, G. S.; SINGH, D.; KUMAR, R.; PARKASH, C. Inter specific hybridization (*Brassica carinata* x *Brassica oleracea*) for introgression of black rot resistance genes into Indian cauliflower (*B. oleracea* var. *botrytis* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 204, n. 1, p.149-162, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1352-0>.

DUTTA, T. K.; PAPOLU, P. K.; BANAKAR, P.; CHOUDHARY, D.; SIROHI, A.; RAO, U. Tomato transgenic plants expressing hairpin construct of a nematode protease gene conferred enhanced resistance to root-knot nematodes. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, p. 260-267, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00260>.

FLOR, H.H. The complementary geict systems in flax and flax rust. **Advances in Genetics**, New York, v. 8, p. 29-54, 1956. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)60498-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60498-8).

\_\_\_\_\_. Current status of the gene-to-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 9, p. 275-296, 1971.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; TANG, S.; HARRISON, K.; JONES, J. D. G. The Tomato Cf-9 disease resistance gene functions in tobacco and potato to confer responsiveness to the fungal avirulence gene product avr 9. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, n. 8, p.1.251–1.266, 1998.

HANSEN, L. N.; EARLE, E. D. Transfer of resistance to *Xanthomonas campestris* pv *campestris* into *Brassica oleracea* L. by protoplast fusion. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v. 91, n. 8, p. 1.293-1.300, 1995. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00220944>.

JOHAL, G. S.; GRAY, J.; GRUIS, D.; BRIGGS, P. Convergent insights into mechanisms determining disease and resistance response in plant-fungal interactions. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, n. 1, p. 468-474, 1995. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1139/b95-284>.

LEE, Y. H.; JUNG, M.; SHIN, S. H.; LEE, J. H.; CHOI, S. H.; HER, N. H.; LEE, J. H.; RYU, K. H.; PAEK, K. Y.; HARN, C. H. Transgenic peppers that are highly tolerant to a new CMV pathotype. **Plant Cell Reports**, Berlim, v. 28, n. 2, p. 223–232, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-008-0637-3>.

NICK, C.; BORÉM, A. **Melhoramento de hortaliças**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 464p., 2016.

PINTO, R. J. B. **Introdução ao melhoramento genético de plantas**. 2. ed. Maringá: Editora da UEM, 351p., 2009.

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B.; SANTOS, J. B.; NUNES, J. A. R. **Aplicações da genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas**. Lavras: Editora UFLA, 2012. 522p.

SINGH, P. H.; PANDEY, V.; SINGH, M.; SHARMA, S. R. Genetic improvement of cauliflower. **Vegetable Science**, Nova Deli, v. 40, n. 2, p. 121-136, 2013.

VAN der PLANK, J. E. **Disease resistance in plants**. 1. ed. New York: Academic Press, 1968. 206p.

\_\_\_\_\_. **Disease resistance in plants**. 2. ed. New York: Academic Press, 1984. 194p.

WALKER, J. C. 1965. Disease resistance in the vegetable crops. III. **The Botanical Review**, v. 31, n. 3, p. 331-380. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02859130>.



# Fisiologia do estresse vegetal e metabolismo antioxidante de resposta

*Leticia Rodrigues Alves; Mirela Vantini Checchio; Gilmar da Silveira Sousa Junior; Rita de Cassia Alves; Sonia Maria Raymundo Carregari e Priscila Lupino Gratão*

## 1 Introdução

Assim como todos os organismos vivos, as plantas estão inseridas em um ambiente complexo, no qual se desenvolvem e reproduzem-se concomitantemente a uma gama de fatores abióticos que variam com decorrer do tempo e do espaço geográfico (TAIZ; ZEIGER, 2013). Por serem organismos sésseis, as plantas estão continuamente expostas a estes fatores que podem gerar uma situação de estresse, levando à indução de uma cadeia de alterações moleculares, bioquímicas, fisiológicas e morfológicas nos vegetais, em que, a resposta destes vegetais perante os estresses abióticos podem ser complexas e dependerão do tecido ou do órgão acometido, do estágio de desenvolvimento da planta, assim como do tempo de exposição ao estresse (CRAMER et al., 2011). Além disso, estresses simultâneos podem causar respostas distintas quando comparados com algum estresse isolado (MITTLER, 2006).

## 2 Estresses abióticos

Diante das condições ambientais adversas intensificadas, devidas às alterações das mudanças climáticas e também às intensas atividades humanas, encontram-se, dentre os diversos estresses abióticos, a seca, a salinidade, a luminosidade, a temperatura e a contaminação por metais pesados como sendo os mais prevalentes (AHMAD, 2016).

## 2.1 Estresse hídrico

A deficiência hídrica do solo é responsável por acarretar o estresse hídrico, danificando o desenvolvimento das plantas e, consequentemente, a produtividade mundial (UZILDAYA et al., 2012). A redução de água disponível para a planta faz com que ocorra um decréscimo das taxas fotossintéticas (AZEVEDO, 2011), ocasionando também a diminuição da turgescência, sendo esta uma das primeiras respostas perante a escassez de água (MORAIS et al., 2003), assim como a redução do crescimento da planta.

O estresse hídrico também pode ser provocado devido ao alagamento do solo, levando a uma situação de hipóxia (diminuição da difusão do oxigênio), que interfere nas trocas gasosas entre o sistema radicular e o solo (ZABALZA, 2008), afetando o metabolismo energético, já que ocorre queda na taxa de respiração das raízes. Com isso, reduz-se a produção de ATP e, por consequência, prejudica o crescimento e o desenvolvimento da planta (FUKAO, 2004).

## 2.2 Salinidade

Devido à crescente escassez de recursos hídricos, a utilização de água de qualidade inferior tornou-se uma alternativa e também uma problemática. Grande parte dos produtores rurais que utilizam sistemas de irrigação, faz uso de água coletada em reservatórios superficiais que podem apresentar elevada concentração de sais dissolvidos, potencializando o problema de salinização dos solos e causando sérios prejuízos sobre o setor agrícola. Desta forma, a salinização é considerada uma das principais ameaças aos sistemas de cultivo, afetando diretamente a produtividade, o crescimento e o desenvolvimento das culturas globalmente.

A salinidade pode ocasionar efeitos no desenvolvimento das plantas de duas formas: osmótica e iônica. Em uma situação inicial, ou quando há níveis moderados de sais em contato com o sistema radicular, surge o efeito osmótico, decorrente da diminuição do potencial hídrico, acarretando a redução da disponibilidade de água para a planta, restringindo a abertura estomática e a assimilação fotossinté-

tica de CO<sub>2</sub>. Conforme ocorre o acúmulo exacerbado de íons salinos (principalmente Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>) no citosol das células, ocorre a alteração da homeostase celular, surgindo problemas de toxicidade nas plantas expostas à salinidade, sendo este o efeito iônico ou tóxico (SILVEIRA et al., 2010). Processos metabólicos, como a fotossíntese, a síntese proteica e o metabolismo lipídico, poderão ser afetados se acometidos por esta problemática (HAMDIA, 2010).

### **2.3 Metais pesados**

A contaminação ambiental por metais pesados é considerada um dos graves problemas mundiais, em virtude das características que estes contaminantes apresentam, como a elevada toxicidade, a persistência no ambiente e a bioacumulação nas plantas, podendo causar prejuízos ambientais, declínio na produtividade das culturas e graves ameaças para a saúde animal e humana (VENEGAS, 2015). Decorrem principalmente devido à intensa poluição industrial e a atividades antropogênicas, como o uso de fertilizantes inorgânicos e orgânicos, as atividades de mineração e fundição, os despejos de resíduos industriais, a queima de carvão mineral e de petróleo e a corrosão de resíduos comerciais (PAZ-FERREIRO, 2014;ALVES et al.,2016).

Alguns metais, como o ferro (Fe) e o zinco (Zn), por exemplo, são necessários para as plantas em níveis adequados; já outros podem ser nocivos para os vegetais. O cádmio (Cd), por exemplo, pode ser considerado como o mais tóxico dos metais pesados pelo fato de ser um elemento químico não essencial para a manutenção dos vegetais e não exercer funções fisiológicas (SHAKIROVA et al., 2016). Quando as plantas são expostas a certos níveis tóxicos destes metais, podem desencadear diversas alterações fisiológicas e metabólicas (VILLIERS et al., 2011); e conforme for o nível destes metais nas células vegetais, eles podem levar à inibição e também ao aumento na capacidade de enzimas (HMID, 2015).

### **2.4 Temperaturas extremas**

Alterações climáticas são frequentes em todo o globo, para a pro-

dução agrícola, sendo essa oscilação de temperatura um dos fatores mais preocupantes (HASANUZZAMAN, 2013). De maneira geral, as plantas exibem respostas distintas em função da temperatura ambiental em que se encontram. A manifestação do estresse por altas e baixas temperaturas pode causar alterações em diversos processos metabólicos, principalmente a fotossíntese (ZINN, 2010).

Além de provocar malefícios à fotossíntese, o estresse, quando ocasionado pelo calor, afeta o transporte de elétrons, diminuindo sua eficiência, e também contribui para a produção elevada de espécies reativas de oxigênio (ERO) (ASTHIR, 2015). Por outro lado, no estresse por frio, além da fotossíntese, ocorrem alterações na composição e na fluidez da membrana (ARBONA, 2013), e produção das EROs, acarretando danos à planta, desde a baixa taxa de germinação das sementes até a clorose e redução da expansão foliar (YADAV, 2010).

### 3 O estresse oxidativo nas plantas

O estresse oxidativo é gerado durante uma condição de estresse biótico ou abiótico, como consequência de um grave desequilíbrio celular causado por uma alta produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que o sistema antioxidante não consegue eliminar, gerando grandes desafios para o metabolismo vegetal (GRATÃO et al., 2015). As EROs são formadas constantemente em baixa concentração por vários processos metabólicos no cloroplasto, mitocôndria, peroxissomos, membrana plasmática, apoplasto e núcleo (GILL; TUTEJA; SANDALIO et al., 2013). Por exemplo, durante a respiração aeróbia, ocorre a redução do oxigênio molecular  $O_2$  a  $H_2O$ , e nessa reação pode ocorrer a transferência de um, dois ou três elétrons para  $O_2$ , formando radicais como superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e hidroxil (OH) e não radicais como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (DEMIDCHIK, 2015).

Embora as EROs sejam caracterizadas por causar sérios desequilíbrios celulares, trabalhos recentes relatam a importância destas como reguladores intrínsecos da progressão do ciclo celular (VIVANCOS et al., 2010). Provavelmente, há uma tênue regulação espacial e temporal

da produção e acúmulo das EROs durante o desenvolvimento da planta e as respostas ao estresse (XIA et al., 2015).

#### 4 Mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo

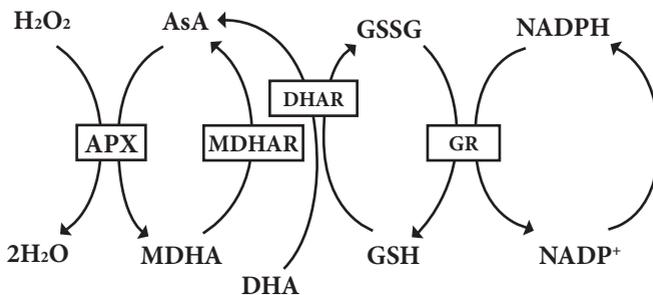
As plantas têm inúmeras estratégias para resistir ao estresse oxidativo (GILL; TUTEJA, 2010). A primeira linha de defesa é a ativação e a síntese de enzimas antioxidantes e de compostos não enzimáticos para lidar com a produção excessiva e a eliminação das EROs. Existem muitas enzimas antioxidantes que mostram afinidade específica para cada ERO, como a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), a catalase (CAT, EC 1.11.1.6), o ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), a glutationa redutase (GR, EC 1.6.4.2), o monodeidroascorbato redutase (MDHAR, EC 1.6.5.4), deidroascorbato redutase (DHAR, EC 1.8.5.1), Glutationa peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9), a guaicolperoxidase (GPOX, EC 1.11.1.7), a peroxidase (POX), a glutationa-S-transferase (GST, EC 2.5.1.18). Além disso, compostos antioxidantes não enzimáticos são essenciais para o combate das EROs, tais como ácido ascórbico (AsA), glutationa (GSH), prolina, poliaminas, betaína, carotenoides e flavonoides. Outras substâncias podem reduzir a atividade catalítica de metais de transição, tais como fitoquelatinas, pectinas e outros polissacarídeos de parede celular e proteínas estruturais (ZAGORCHEV et al., 2013). Tanto os compostos antioxidantes como as enzimas antioxidantes funcionam em conjunto para interromper a cascata descontrolada de oxidação e para evitar o dano celular (GRATÃO et al., 2005).

A enzima SOD (EC 1.15.1.1) é a primeira linha do sistema de defesa contra a toxicidade das EROs. Essa enzima atua na dismutação de  $O_2 \cdot$  para  $H_2O_2$  e  $O_2$  em todos os compartimentos subcelulares, incluindo cloroplastos, mitocôndrias, núcleos, peroxissomas, citoplasma e apoplastos (GILL et al., 2015). A SOD exibe três isoformas bem conhecidas: Mn-SOD presente apenas nas mitocôndrias, Cu/Zn-SOD localizada em citosol, cloroplastos e peroxissomas, e a Fe-SOD é encontrada em peroxissomas, apoplasto e principalmente em cloroplastos (CORPAS et al., 2006).

$H_2O_2$  é uma molécula altamente reativa e tóxica para o metabo-

mo celular, portanto deve ser rapidamente convertida em  $H_2O$  e  $O_2$ . A CAT e outras peroxidases fazem parte da defesa antioxidante e são responsáveis por fazer esta reação em diferentes compartimentos celulares (GARG; MANCHANDA, 2009). A CAT ocorre nos peroxissomos, glioxissomas e organelas semelhantes. Esta enzima é muito eficiente na eliminação das EROs, exibindo a maior taxa de rotatividade de reação, que pode dismutar cerca de 6 milhões de moléculas de  $H_2O_2$  por minuto (GILL; TUTEJA, 2010). Além disso, a CAT não utiliza nenhum agente redutor, atuando diretamente durante a conversão do  $H_2O_2$ . A maioria dos animais contém um único gene que codifica a CAT, enquanto as angiospermas contêm três genes (CAT1, CAT2 e CAT3) (FRUGOLI et al., 1996). O gene CAT1 expressa-se principalmente em sementes e pólen, CAT2 em raízes, sementes e tecidos fotossintéticos, enquanto CAT3 é encontrado em tecidos vasculares e folhas (MCCLUNG, 1997). Foram descritas seis isoformas de CAT em *Arabidopsis* (MICHAEL ; MCCLUNG, 2002). No entanto, este número não é exato entre os membros do reino vegetal, e algumas plantas exibem apenas duas isoformas, como a cevada (SKADSEN et al., 1995) e o pêssego (BAGNOLI et al., 2004).

APX (E.C. 1.11.1.11) e GR (EC 1.6.4.2) desempenham papel crucial no ciclo Ascorbato-Glutationa, pois atuam na eliminação das EROs. O ascorbato (AA) e o  $H_2O_2$  são convertidos em monodehidroascorbato (MDHA) pela enzima APX. O MDHA formado é regenerado em AA pela atividade da monodehidroascorbato redutase (MDHAR)(ANJUM et al., 2014). O dehidroascorbato (DHA) também é regenerado a AA através da enzima dehidroascorbato redutase, a partir da oxidação da glutationa (GSH). A GR catalisa a redução da glutationa oxidada (GSSG) de volta à sua forma reduzida (GSH), onde o NADPH é necessário, atuando como agente redutor (ANJUM et al., 2012). Além disso, o GSH formado também será utilizado pela GPX e pela desidroascorbato redutase (DHAR). A glutationa peroxidase (GPX EC 1.11.1.9) converte o desidroascorbato (DHA) em  $H_2O$  e AsA, respectivamente (GILL et al., 2013).



**Figura 1.** Ciclo ascorbato-glutationa atua na eliminação do peróxido de hidrogênio

As sequências genômicas e de DNA complementar da APX foram obtidas a partir de uma grande variedade de espécies de plantas, provando que a APX está amplamente distribuída entre as plantas superiores. Esta enzima pertence a uma enzima familiar multigênica de heme peroxidases que reduz o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, usando o ascorbato como doador de elétrons. As APX são codificadas por pequenas famílias de genes (PASSARDI et al., 2007), e a classificação de suas isoformas varia de acordo com a localização subcelular, como a APX estromal (sAPX), a APX ligada ao tilacoide (tAPX) em cloroplastos, mitocôndrias (mitAPX), a APX ligada à membrana de peroxissoma (mAPX) e APX citosólica (cAPX) (TEIXEIRA et al., 2006), enquanto a GR faz parte de um grupo de flavoenzimas que contém um grupo dissulfeto essencial, (GHISLA; MASSEY, 1989). Existem três isoformas de GR conhecidas em plantas, que são estimuladas por diferentes sinais ambientais e exibem diversas funções em condições adversas (YOUSUF et al., 2012).

## 5 Considerações finais

Os vegetais não possuem mecanismos de defesa específicos contra diversos tipos de estresses abióticos, e sua sobrevivência depende exclusivamente dos próprios meios de defesa naturais; sendo assim, a principal defesa das plantas ao estresse oxidativo ocorre através dos

mecanismos antioxidantes capazes de neutralizar as EROs.

Salienta-se que o equilíbrio celular depende de diversos mecanismos interligados e extremamente complexos, de forma que a defesa antioxidante não segue um modelo único de ação; com isso, essa forma de defesa pode variar em decorrência de diversos fatores, como espécies, estressor e idade da planta, o que faz necessário um mecanismo de estudo e de pesquisa dinâmico e adaptável.

## 6 Referências Bibliográficas

AHMAD, P.; LATEF, A. A.H. A.; RASOOL, S.; AKRAM, N. A.; ASHRAF, M.; GUCCEL, S. Role of Proteomics in Crop Stress Tolerance. **Frontiers in Plant Science**. v. 7, 2016. DOI: 10.3389/fpls.2016.01336.

ALVES, L.R.; REIS, A.R.; GRATÃO, P.L. Heavy metals in agricultural soils: from plants to our daily life (a review). *Cientifica*. v.44, n.3, p.346–361, 2016.

ANJUM, N. A.; AHMAD, I.; MOHMOOD, I.; PACHECO, M.; DUARTE, A. C.; PEREIRA, E.; UMAR, S.; AHMAD, A.; KHAN, N. A.; IQBAL, M.; PRASAD, M. N. V. Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids—a review. **Environmental and Experimental Botany**. v. 75, p. 307–324, 2012. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2011.07.002.

ANJUM, N. A.; GILL, S. S.; GILL, R.; HASANUZZAMAN, M.; DUARTE, A. C.; PEREIRA, E.; AHMAD, I.; TUTEJA, R.; TUTEJA, N. Metal/metalloid stress tolerance in plants: role of ascorbate, its redox couple and associated enzymes. **Protoplasma**. v. 251. n. 6, p. 1.265–1.283, 2014. DOI: 10.1007/s00709-014-0636-x.

ARBONA, V.; MANZI, M.; OLLAS, C.; GÓMEZ-CADENAS, A. Metabolomics as a Tool to Investigate Abiotic Stress Tolerance in Plants. **Int. J. Mol. Sci**. v. 14(3), p. 4.885-4.911, 2013.

ASTHIR, B. Mechanisms of heat tolerance in crop plants. **Biol. Plant**. v. 59 p. 620–628, 2015. DOI: 10.1007/s10535-015-0539-5.

AZEVEDO, R. A.; CARVALHO, R. F.; CIA, M. C.; GRATÃO, P. L. Sugarcane Under Pressure: Na Overview of Biochemical and Physiological Studies of Abiotic Stress. **Tropical Plant Biology**. v. 4, p. 442-451, 2011. DOI: 10.1007/s12042-011-9067-4.

- BAGNOLI, F.; DANTI, S.; MAGHERINI, V.; COZZA, R.; INNOCENTI, A. M.; RACCHI, M. L. Molecular cloning, characterisation and expression of two catalase genes from peach. **Functional Plant Biology**. v. 31, n. 4, p. 349–357, 2004. DOI: 10.1071/FP03203.
- CORPAS, F. J.; FERNÁNDEZ-OCAÑA, A.; CARRERAS, A.; VALDERRAMA, R.; LUQUE, F.; ESTEBAN, F. J.; RODRÍGUEZ-SERRANO, M.; CHAKI, M.; PEDRAJAS, J. R.; SANDALIO, L. M.; DEL RÍO, L. A.; BARROSO, J. B. The expression of different superoxide dismutase form siscell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves. **Plant Cell Physiology**. v. 47, n. 7, p. 984–994, 2006. DOI: 10.1093/pcp/pcj071.
- CRAMER, G.R.; URANO, K.; DELROT, S.; PEZZOTTI, M.; SHINOZAKI, K. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. **BMC Plant Biology**, p.11-163. 2011.
- DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**. v. 109, p. 212–228, 2015. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2014.06.021.
- DEMIDCHIK, V.; STRALTSOVA, D.; MEDVEDEV, S.; POZHVANOV, G.; SOKOLIK, A.; YURIN, V. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K<sup>+</sup>-permeable channels and involvement to programmed cell death and metabolic adjustment. **Journal of Experimental Botany**. v. 65, n. 5, p. 1.259-1.270, 2014. DOI: 10.1093/jxb/eru004.
- FRUGOLI, J. A.; ZHONG, H. H.; NUCCIO, M. L.; MCCOURT, P.; MCPEEK, M. A.; THOMAS, T. L.; MCCLUNG, C. R. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Physiology**. v. 112, n.1, p. 327–336, 1996.
- FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J. Plant responses to hypoxia – is survival a balancing act?. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 449-456, 2004.
- GARG, N.; MANCHANDA, G. ROS generation in plants: boon or bane? **Plant Biosystems**. v. 143, n. 1, p. 81–96, 2009. DOI: 10.1080/11263500802633626.
- GHISLA, S.; MASSEY, V. Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions. **European Journal of Biochemistry**. v.181, n. 1, p. 1-17, 1989.
- GILL, S. S.; ANJUM, N. A.; GILL, R.; YADAV, S.; HASANUZZAMAN, M.; FUJITA, M.; MISHRA, P.; SABAT, S. C.; TUTEJA, N. Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. **Environmental Science and Pollution Research International**. v. 22, n. 14, p. 10.375–10.394, 2015. DOI 10.1007/s11356-015-4532-5.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 48, n. 12, p. 909–930, 2010. DOI: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.

GILL, S. S.; ANJUM, N. A.; HASANUZZAMAN, M.; GILL, R.; TRIVEDI, D. K.; AHMAD, I.; PEREIRA, E.; TUTEJA, N. Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 70, p. 204–212, 2013. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.05.032.

HAMDIA, M. A.; SHADDAD, M. A. K. Salt tolerance of crop plants. **J. Stress Physiol. Biochem.** p.664–690, 2010.

HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; ALAM, M. M.; ROYCHOWDHURY, R.; FUJITA, M. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. **Int. J. Mol. Sci.** v. 14, p. 9.643–9.684, 2013. DOI: 10.3390/ijms14059643.

HMID, A.; CHAMI, Z. A.; SILLEN, W.; DE VOCHT, A.; VANGRONSVELD, J. Olive mill waste biochar: a promising soil amendment for metal immobilization in contaminated soils. **Environ SciPollut Res.** v. 22, p. 1.444–1.456, 2015. DOI: 10.1007/S11356-014-3467-6.

LIU, J.; ZHANG, H.; ZHANG, Y.; CHAI, T. Silicon attenuates cadmium toxicity in *Solanum nigrum* L. by reducing cadmium uptake and oxidative stress. **Plant Physiol. Biochem.** v. 68, p. 1–7, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.03.018>.

MCCLUNG, C. R. Regulation of catalases in *Arabidopsis*. **Free Radical Biology and Medicine**. v.23, n. 3, p. 489–496, 1997.

MICHAEL, T. P.; MCCLUNG, C. R. Phase-specific circadian clock regulatory element in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**. v. 130, n. 2, p. 627–638, 2002. DOI: 10.1104/pp.004929.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**.v.11, n. 1, p. 15–19, 2006.

MORAIS, H.; MARUR, C. J.; CARAMORI, P. H.; RIBEIRO, A. M. A.; GOMES, J. C. Características fisiológicas e de crescimento de cafeeiro sombreado com guandu e cultivado a pleno sol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 38, n. 10, p. 35–40, 2003.

NAJAMI, N.; JANDA, T.; BARRIAH, W.; KAYAM, G.; TAL, M.; GUY, M.; VOLOKITA, M. Ascorbateperoxidase gene family in tomato: Its identification

and characterization. **Molecular Genetics and Genomics**. v. 279, n. 2, p. 171-182, 2008. DOI: 10.1007/s00438-007-0305-2.

PASSARDI, F.; BAKALOVIC, N.; TEIXEIRA, F. K.; MARGIS-PINHEIRO, M.; PENEL, C.; DUNAND, C. Prokaryotic origins of the nonanimal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. **Genomics**. v. 89, n. 5, p. 567-579, 2007. DOI: 10.1016/j.ygeno.2007.01.006.

PAZ-FERREIRO, J.; LU, H.; FU1, S.; MÉNDEZ, A.; GASCÓ, G. Use of phytoremediation and biochar to remediate heavy metal polluted soils: a review. **Solid Earth**. v.5, p.65-75, 2014.

SANDALIO, L. M.; RODRÍGUEZ-SERRANO, M.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; DEL RÍO, L. A. Role of peroxisomes as a source of reactive oxygen species (ROS) signaling molecules. **Sub cellular Biochemistry**. v. 69, p. 231-255, 2013. DOI: 10.1007/978-94-007-6889-5\_13.

SHAKIROVA, F.M.; ALLAGULOVA, C.R.; MASLENNIKOVA, D.R.; KLYUCHNIKOVA, E.O.; AVALBAEY, A.M.; BEZRUKOVA, M.V. Salicylic acid-induced protection against cadmium toxicity in wheat plants. **Environ. Exp. Bot**, v. 122, p. 19-28, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/>

SILVEIRA, J.A.G.; SILVA, S.L.F.; SILVA, E.N.; VIEGAS, R.A. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. In: GHEYI, H.R.; DIAS, N.S.; LACERDA, C.F. (Eds.). Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados. Fortaleza: **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade**, p. 161-179, 2010.

SKADSEN, R. W.; SCHULZE-LEFERT, P.; HERBST, J. M. Molecular cloning, characterization and expression analysis of two catalase isozyme genes in barley. **Plant Molecular Biology**. v. 29, n. 5, p. 1.005-1.014, 1995.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 954p, 2013.

TEIXEIRA, F. K.; MENEZES-BENAVENTE, L.; GALVÃO, V. C.; MARGIS, R.; MARGIS-PINHEIRO, M. Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. **Planta**. v. 224, n. 2, p. 300-314, 2006. DOI: 10.1007/s00425-005-0214-8.

UZILDAYA, B.; TURKANA, I.; SEKMENA, A. H.; OZGURA, R.; KARAKAYA, H. C. Comparison of ROS formation and antioxidant enzymes in *Cleome gynandra* (C4) and *Cleome spinosa* (C3) under drought stress. **Plant Science**. v. 182, p. 59-70, 2012.

VENEGAS, A.; RIGOL, A.; VIDAL, M. Viability of organic wastes and biochars as amendments for the remediation of heavy metal-contaminated soils. **Chemosphere**. v.119, p.190-198, 2015.

VILLIERS, F.; DUCRUIX, C.; HUGOUVIEUX, V. Investigating the plant response to cadmium exposure by proteomic and metabolomic approaches. **Proteomics**. v. 11(9) p. 1.650–1.663, 2011.

VIVANCOS, P. D.; DONG, Y.; ZIEGLER, K.; MARKOVIC, J.; PALLARDÓ, F. V.; PELLNY, T. K.; VERRIER, P. J.; FOYER, C. H. Recruitment of glutathione into the nucleus during cell proliferation adjusts whole-cell redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana* and lowers the oxidative defense shield. **The Plant Journal**. v.64, n. 5, p. 825–838, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04371.x.

XIA, X. J.; ZHOU, Y. H.; SHI, K.; ZHOU, J.; FOYER, C. H.; YU, J. Q.. Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 10, p. 2.839–2.856, 2015. DOI:10.1093/jxb/erv089.

YADAV, S. K. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. **Agro-nomy for Sustainable Development**, Springer Verlag/EDP Sciences/INRA, 2010.

YOUSUF, P. Y.; HAKEEM, K. U. R.; CHANDNA, R.; AHMAD, P. Role of glutathione reductase in plant abiotic stress. **Abiotic Stress Responses in Plants**. p. 149-158, 2012. DOI: 10.1007/978-1-4614-0634-1\_8.

ZABALZA, A.; DONGEN, J.T.V.; FROEHLICH, A.; OLIVER, S.N.; FAIX, B.; GUPTA, K.J.; SCHMÄLZLIN, E.; IGAL, M.; ORCARAY, L.; ROYUELA, M.; GEIGENBERGER, P. Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration. **Plant Physiology**, v.149, p.1.087-1.098, 2008.

ZAGORCHEV, L.; SEAL, C. E.; KRANNER, I.; ODJAKOVA, M. A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 14, n. 4, p. 7.405–7.432, 2013. DOI: 10.3390/ijms14047405.

ZIN, K. E.; TUNC-OZDEMIR, M.; HARPER, J. F. Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. **Journal of Experimental Botany**. v. 61(7), p. 1.959-1.968, 2010. DOI: 10.1093/jxb/erq053.



# Principais eventos transgênicos utilizados na agricultura

*Kian Eghrari, Carlos Henrique Caprio, Luiz Eduardo Tilhaqui Bertasello, Lucas Tadeu Mazza Revolti, Elcio Hissagy Samecima Júnior, Gustavo Vitti Môro*

## 1 Introdução

Os transgênicos, também conhecidos como organismos geneticamente modificados (OGMs), conquistaram seu espaço na agricultura brasileira nos últimos 10 anos. Eventos transgênicos na agricultura são desenvolvidos de modo a facilitar e a reduzir os custos do cultivo das plantas pelo produtor rural. A Comissão Nacional de Biossegurança (CTNBIO), órgão responsável pela liberação comercial de OGMs no Brasil, aprovou desde 2008 eventos transgênicos para as culturas do algodão, eucalipto, feijão, milho e soja (CTNBIO, 2017). O milho, a soja e o algodão, culturas que apresentam eventos transgênicos liberados comercialmente, possuem mais de 93% da área produzida ocupada com cultivares transgênicas (CÉLERES, 2016). Tolerância a estresses abióticos, resistência a doenças e pragas, tolerância a herbicidas, modificação da qualidade do produto, sistema de controle de polinização e crescimento acelerado foram o foco para o desenvolvimento de eventos transgênicos nos últimos anos (ISAAA, 2017).

A CTNBio, antes da liberação comercial de qualquer organismo geneticamente modificado (OGM), independentemente se a espécie é destinada para a alimentação humana e animal ou utilizada para outra finalidade, como a produção de biomassa na cultura do eucalipto, investiga os impactos que tal evento exerce sobre o meio ambiente, incluindo a composição química do OGM frente ao genótipo convencional, influência do OGM na saúde animal e humana, transferência de pólen geneticamente modificado para outros genótipos da mesma espécie e seu efeito nos agentes polinizadores (CTNBIO, 2017).

A obtenção de plantas transgênicas é viável pelo fato de o material

genético de todos os seres vivos, DNA e RNA, possuir os mesmos nucleotídeos (adenina, guanina, citosina, timina e uracila) e, desse modo, caracterizar o código genético como universal. Sendo assim, a transformação genética, técnica para obtenção de organismos transgênicos, é dividida em três etapas:

1. Constatar a falta de uma característica essencial do organismo de interesse;
2. Encontrar esta característica em outro organismo e extrair sua sequência codificadora;
3. Introduzir, por meio de vetor ou biobalística, a nova sequência no organismo de interesse.

A partir do exposto, este capítulo tem como objetivo apresentar as características de cada evento transgênico e sua importância para a agricultura.

## 2 Eventos transgênicos

### 2.1 Alteração de crescimento e produção

Evento H421 – *Eucalyptus sp* (eucalipto). Este evento, desenvolvido pela Futuragene do Brasil Tecnologia Ltda., no ano de 2015, possui a expressão de duas proteínas transgênicas. A proteína Cell1, advinda de *Arabidopsis thaliana*, promove crescimento acelerado da planta, o que influencia no aumento do volume de madeira produzido em menor tempo. A segunda proteína, NPTII, cuja fonte é a bactéria *E. coli*, é um marcador de seleção resistente a antibióticos aminoglicosilados, o que facilita a identificação do material transformado durante o processo de transgenia (CTNBIO, 2017; ISAAA, 2017).

Evento MON87403 – *Zea mays* (milho). Liberado comercialmente nos EUA e Canadá, em 2015, MON87403 expressa o gene *athb17* de *A. thaliana* introduzido no milho (ISAAA, 2017). A proteína ATHB17, codificada pelo evento, regula o crescimento e o desenvolvimento da planta, aumentando o tamanho, o peso e a capacidade de emitir estímulos da espiga durante a fase reprodutiva (RICE et al., 2014).

Evento MON87712 – *Glycine max* (soja). Com aprovação apenas

nos EUA, em 2013, o evento MON87712 apresenta o gene *cp4 epsps* atuando como marcador de seleção, e o gene *bbx32* de *A. thaliana*, que regula a biologia diurna da planta e também contribui positivamente para o crescimento e o desenvolvimento reprodutivo (ISAAA, 2017). Plantas com o gene *bbx32* apresentam maior altura de planta e maior tamanho dos nós, além de maior quantidade de flores, vagens e grãos, o que contribui para aumentar a produtividade da cultura. Contudo, estas alterações fenotípicas devem-se ao prolongamento do desenvolvimento reprodutivo (PREUSS et al., 2012).

A produtividade das culturas é um caráter quantitativo, no qual vários genes influenciam na expressão desta característica. Os eventos para a alteração do crescimento e da produção das plantas visam ao aumento da capacidade produtiva das plantas, por meio da inserção de transgenes que atuam em vias específicas para o aumento da produtividade.

## 2.2 Modificação da qualidade do produto

A utilidade da transgenia para modificar algum produto das plantas envolve a produção de fármacos e aminoácidos, o aumento da capacidade de produzir biocombustíveis, a alteração na pigmentação de flores ornamentais, o aumento no teor de óleo dos grãos, maior durabilidade de frutos, alteração de polissacarídeos e várias outras aplicações. Essas modificações são aplicadas nas seguintes culturas ao redor do mundo: alfafa, arroz, batata, canola, cravo, maçã, melão, milho, peônia, soja, tabaco e tomate (ISAAA, 2017).

No Brasil, o único evento que altera a qualidade do produto e que é regulamentado pela CTNBio é o SYN-E3272-5, responsável por aumentar a produção de etanol do milho através da estabilização da amilase utilizada para degradar o amido. O milho contendo esta tecnologia só pode ser destinado para alimentação animal através de sua importação, ou seja, não pode ser cultivado nem mesmo usado para consumo humano (ISAAA, 2017).

O tomate FLAVR SAVR™ atrasa o amadurecimento dos frutos devido ao silenciamento do gene responsável pela produção de poligalacturonase; a maçã Arctic™ impede que os frutos fiquem amarronzados

após o corte; a rosa e o cravo possuem transgenes que possibilitam a alteração da cor das flores; e o tabaco, apresentando redução de um precursor da nicotina, são alguns dos eventos transgênicos de destaque na modificação da qualidade do produto ao redor do mundo.

### 2.3 Sistema de controle de polinização

O controle de polinização para a restauração de fertilidade ou a indução da macho-esterilidade nas plantas vem sendo aplicado por transgenia desde meados da década de 1990 em canola, chicória e milho. Normalmente, os genes que controlam a esterilidade e a fertilidade são inseridos em conjunto com marcadores de seleção para a identificação da transgenia e também em conjunto com genes de tolerância a herbicidas (ISAAA, 2017).

No Brasil, o único evento aprovado pela CTNBio é o DP-32138 da Dupont Pioneer Hi-Bred, no ano de 2015, para a cultura do milho. Este evento, nomeado de “Seed Production Technology” (SPT), possui três genes que agem em conjunto para a identificação de plantas transgênicas restauradoras de fertilidade: *ms45*, *zm-aa1* e *dsRed2*. O gene *ms45* expressa a proteína MS45, que é produzida no tapetum das anteras e é responsável por restaurar a fertilidade em genótipos estéreis, com o gene mutante *ms45/ms45* em homozigose recessiva. A proteína ZM-AA1 é produzida somente na formação do grão de pólen, impedindo a polinização pela ação da  $\alpha$ -amilase. O *dsRed2* é um gene marcador utilizado para identificar as plantas SPT por apresentar coloração avermelhada na camada de aleurona das sementes (CTNBIO, 2017; WU et al., 2016).

O SPT é inserido em uma linhagem de milho com genótipo *ms45/ms45*, a fim de torná-la uma linhagem mantenedora, com o objetivo de multiplicar linhagens macho-estéreis (*ms/ms*). Pela sua capacidade de restaurar a fertilidade da linhagem macho-estéril, ao cruzar-se a linhagem SPT com a macho-estéril, a progênie obtida é 100% macho-estéril não transgênica, pois todos os gametas transgênicos são degradados pela ação da ZM-AA1. Por outro lado, a multiplicação da linhagem SPT é feita através da autofecundação, onde 50% da progênie será macho-estéril não transgênica e os outros 50% serão transgênicos devido

ao efeito materno. A separação das sementes transgênicas e convencionais é feita pela identificação da coloração avermelhada das sementes que possuem o gene *dsRed2* e, conseqüentemente, o evento SPT (CT-NBIO, 2017; WU et al., 2016).

A tecnologia SPT dispensa o despendoamento do milho e, assim, promove menor compactação dos solos pelo uso de maquinário; diminui os custos com combustível; dispensa a contratação de safristas; e aumenta a produtividade de linhagens femininas, pois não há redução de fotossíntese e exposição da planta a doenças causadas pelo despendoamento (WU et al., 2016).

## 2.4 Tolerância a estresses abióticos

Evento MON87460 – milho. Este evento, desenvolvido pela Monsanto e BASF, foi doado para instituições de pesquisa e desenvolvimento do setor público em cinco países na África subsaariana, incluindo: África do Sul, Quênia, Uganda, Moçambique e Tanzânia, sendo um projeto de parceria público-privada chamado “Water Efficient Maize for Africa – WEMA” (Milho de Uso Eficiente da Água para a África). O evento possui a expressão de duas proteínas transgênicas: a proteína de choque a frio, codificada pelo gene *cspB* advinda de *Bacillus subtilis*, que mantém as funções celulares normais em condições de estresses hídricos; e a proteína codificada pelo gene *nptII*, a qual advém da bactéria *E. coli*, e é utilizada como marcador de seleção. Este evento foi autorizado no Brasil em 2016 para cultivo, alimentação animal e humana (ISAAA, 2017).

Evento IND-00410-5 – soja. Desenvolvido pela Verdeca, possui o gene *hahb-4*, tendo como fonte a planta *Helianthus annuus* (Girassol). O fator de transcrição Hahb-4 liga-se a uma região de regulação de desidratação da planta, ajudando para que a planta em condições de estresse hídrico não desidrate. Este evento foi autorizado somente na Argentina, em 2015 (ISAAA, 2017).

Evento NXI-1T – cana-de-açúcar. Possui três genes introduzidos: *EcBetA*, *nptii* e *aph4* (*hpt*), todos provindos da bactéria *E. coli*. A proteína colina desidrogenase (CD), expressa pelo gene *EcBetA*, catalisa a produção do composto de osmoproteção da glicina betaína, conferindo

tolerância ao estresse hídrico. As proteínas neomicina fosfotransferase (NPTII) e higromicina-b-fosfotransferase (HPT), produtos da expressão dos genes *nptII* e *aph4* (*hpt*), são utilizadas como marcadores de seleção. Este evento foi autorizado na Indonésia, em 2013 (ISAAA, 2017).

A produção agrícola é ameaçada pelas mudanças climáticas, isto é, alterações nos regimes de chuvas, elevação da temperatura, secas e inundações são fatores que podem prejudicar a produção de alimentos. A população mundial, em constante crescimento, necessita aumentar esta produção (FAO, 2017). Para isso, práticas agrícolas aperfeiçoadas são necessárias, como é o caso do uso de eventos transgênicos para a proteção das plantas contra condições extremas, de forma a atenuar os efeitos das alterações climáticas.

## 2.5 Tolerância a herbicidas

As cultivares tolerantes a herbicidas (CTHs) são fundamentais no manejo integrado de plantas daninhas (GREEN, 2014). Existem 14 culturas tolerantes a herbicidas no mundo: alfafa, algodão, arroz, batata, beterraba, canola-argentina, canola-polonesa, cravo, chicória, grama-esmeralda, linho, milho, soja e trigo. No Brasil, somente as culturas da soja, do milho e do algodão possuem eventos com tolerância a herbicidas (CTNBIO, 2017; ISAAA, 2017).

Na década de 1990, a Monsanto Company lançou no Brasil a tecnologia Roundup Ready™, que promove a tolerância de soja, milho e algodão ao herbicida glifosato. Estes eventos possuem a expressão da proteína transgênica CP4 EPSPS, que advém de *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4 (ISAAA, 2017).

No século XXI, a Bayer CropScience conseguiu aprovação da tecnologia Libert Link™, que expressa tolerância de algodão, soja e milho ao ingrediente ativo glufosinato de amônio pela atuação da proteína PAT, com gene advindo das bactérias *Streptomyces viridochromogenes* e *Streptomyces hygroscopicus* (ISAAA, 2017).

No ano de 2015, a CTNBio aprovou eventos de tolerância ao herbicida 2, 4-D. A empresa Dow AgroSciences Ltda. desenvolveu para as culturas da soja e do milho a tolerância ao herbicida, cujo gene foi retirado dos organismos *Delftia acidovorans* e *Sphingobium herbicido-*

*vorans*, respectivamente. No milho, além de promover a tolerância ao 2, 4-D, o evento também degrada a molécula ariloxifenoxipropionato (ISAAA, 2017).

O evento BPS-CV-127-9 para soja, denominado Cultivance, aprovado no Brasil em 2009 pela CTNBio e desenvolvido pela empresa BASF S/A, apresenta o gene *csr1-2* da planta *Arabidopsis thaliana*. O gene codifica a enzima aceto-hidroxiacidosintase, promovendo tolerância aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas. O Brasil foi o primeiro país a liberar este evento no mundo, sendo utilizada a biobalística como método de transformação para a obtenção do evento (CTNBIO, 2017; ISAAA, 2017).

O aumento no número de CTHs e o desenvolvimento de eventos transgênicos tolerantes a novos grupos de herbicidas possibilitam maior rotação de herbicidas, preservando a longevidade da tecnologia devido ao retardamento da evolução da resistência de plantas daninhas a moléculas utilizadas indiscriminadamente, como é o caso do glifosato (GREEN, 2014).

## 2.6 Resistência a doenças e a insetos

No mundo, sete culturas estão registradas com eventos transgênicos para resistência a doenças: abobrinha, ameixa, batata, feijão, mamão, pimentão e tomate (ISAAA, 2017).

O mamão transgênico resistente ao vírus da mancha anelar do mamão (PRSV), cultivares Rainbow e SunUp, foi desenvolvido por universidades americanas e liberado para consumo no ano de 1998, nos EUA. O gene *prsv cp*, responsável pela resistência ao PRSV, controla a mancha anelar por meio da produção de capa proteica que envolve o vírus, tornando-o inativo (ISAAA, 2017).

O vírus do mosaico do pepino (CMV) está presente em várias culturas. Para tanto, introduziu-se, na abobrinha, pimentão e tomate, o gene de resistência *cmv cp*, que possui o mesmo mecanismo que o descrito na resistência ao PRSV. A abobrinha também possui transgenes de resistência que produzem capa proteica para o vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (ZYMV) e o vírus do mosaico da melancia (WMV), *zymv cp* e *wmv cp*, respectivamente. A ameixa trans-

gênica possui resistência ao “plum pox virus” (PPV), sendo o cultivo e o consumo somente aprovados nos EUA (ISAAA, 2017).

A batata é a cultura que possui mais transgênicos registrados para resistência a doenças. São oito genes introduzidos que englobam resistência à requeima-da-batata, à pinta-preta da batata, ao vírus Y da batata e ao vírus do enrolamento da folha da batata. Os mecanismos de ação para o controle dessas doenças incluem a capa proteica para os vírus, fitas duplas de RNA que diminuem a produção de transcritos relacionados com a manifestação das doenças e o silenciamento gênico (ISAAA, 2017).

Em 2011, a CTNBiO aprovou o primeiro evento transgênico produzido por empresa pública no Brasil, a EMBRAPA. O feijão transgênico resistente ao mosaico-dourado (RMD), vírus transmitido por *Bemisia tabaci*, anula a infecção do vírus ao silenciar seu gene de replicação por RNAi. Além disso, a proteína transgênica é degradada e não identificada nos grãos após o cozimento dos mesmos (DUARTE, 2015).

Os organismos transgênicos resistentes ao ataque de insetos-praga possuem em sua estrutura genética os genes *cry* e *vip*, ambos extraídos da bactéria *Bacillus thuringiensis* e inseridos na planta por meio de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*, ou mesmo por melhoramento genético convencional, através de retrocruzamento com plantas que possuem os transgenes. A expressão desses genes tem amplo espectro de ação, pois eles apresentam atividades para diversas ordens de insetos (Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera e Coleoptera). O mecanismo de ação destas proteínas envolve a solubilização e a degradação dos cristais proteicos no intestino médio do inseto por meio de enzimas proteolíticas, liberando proteínas tóxicas menores, chamadas deltaxinas. Após a solubilização, muitas protoxinas devem ser processadas por proteases presentes no intestino médio do inseto para se tornarem toxinas ativas, as quais se ligarão a receptores das microvilosidades intestinais (TOJO; AIZAWA, 1983). Após a ligação, as toxinas inserem-se na membrana formando poros, desestabilizando o gradiente osmótico e levando à morte do inseto (SCHNEPF et al., 1998; DE MAAGD et al., 2001; BRAVO et al., 2007).

Em relação às culturas, a proteína Vip3A está inserida em organismos transgênicos de milho e algodão para controle de insetos da

ordem lepidoptera, a qual foi patenteada pela Syngenta Ltda. Considerando as toxinas das famílias Cry1 e Cry2, estas proporcionam resistência a diversos lepidópteros quando inseridas geneticamente em culturas como o algodão (Cry1Ab, Cry1Ab2, Cry1Ac, Cry1C, Cry1F, Cry2Ab2 e Cry2Ae), soja (Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1F e Cry2Ab2), milho (Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1F e Cry2Ab2) e arroz (Cry1Ab e Cry1Ac) (ISAAA, 2017). As proteínas da família Cry3 conferem resistência a insetos da ordem coleóptera em cultivares transgênicas de milho (Cry3A, Cry3.1Ab, Cry34Ab1, Cry35Ab1 e Cry3Bb1) e batata (Cry3A). No Brasil, as culturas que possuem cultivares resistentes ao ataque de insetos e estão liberadas para comercialização são algodão (Cry1F, Cry1Ab, Cry1Ac, Vip3A, Cry2Ab2 e Cry2Ae), milho (Vip3A, Cry1F, Cry1Ab, Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3A, Cry34Ab1, Cry35Ab1 e Cry3Bb1) e soja (Cry1Ac e Cry1F) (CTNBIO, 2017).

Os eventos transgênicos de resistência a doenças e a insetos constituem nova alternativa que contribui para a manutenção do manejo integrado de doenças e de pragas, juntamente com outros pilares que os sustentam: controle mecânico, controle químico, controle biológico, controle legislativo e variedades resistentes.

### **3 Considerações finais**

As tecnologias transgênicas foram apresentadas em tópicos separados para facilitar o entendimento do leitor, pois além de serem utilizadas individualmente, estas também estão disponíveis no mercado combinando diferentes eventos transgênicos, por exemplo, tolerância a herbicidas com resistência a insetos e resistência a doenças. Para a combinação de eventos transgênicos, deve-se requerer liberação à CTNBio, em território brasileiro, mesmo que os eventos individuais já apresentem a liberação comercial, pois a combinação caracteriza a formação de novo evento.

Nos tópicos abordados, percebe-se que as tecnologias transgênicas buscam aplicar conceitos para facilitar o cultivo das plantas pelo produtor rural, além de contribuir para o desenvolvimento sustentável, encontrar maneiras mais práticas para fornecer produtos finais de qua-

lidade e preocupar com o impacto de OGMs sobre a saúde humana e animal. As consequências da aplicação desses conceitos envolvem a redução no uso de inseticidas, a facilidade no manejo de plantas daninhas, o aumento da produtividade das culturas, a melhor eficiência nos processos que antecedem o produto final, o aproveitamento da máxima capacidade de cada cultura e a adaptação das plantas às constantes mudanças climáticas.

#### 4 Referências Bibliográficas

BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* cry and cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, p. 423–435. 2007.

CÉLERES. Adoção de Biotecnologia. Informativo Biotecnologia, 2016. Disponível em: < <http://www.celeres.com.br/2o-levantamento-de-a-docao-da-biotecnologia-agricola-no-brasil-safra-201617/>>. Acesso em: 15 mar. 2017.

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBIO). Liberações comerciais. Plantas. Disponível em: <[http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial/-/document\\_library\\_display/#/liberacao-comercial/consultar-processo](http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial/-/document_library_display/#/liberacao-comercial/consultar-processo)>. Acesso em: 15 mar. 2017.

DE MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends Genetic** v.17, p.193–199. 2001.

DUARTE, J. Um sistema e um feijão transgênico para enfrentar o mosaico-dourado. Biotecnologia e biossegurança: EMBRAPA, 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/8534579/um-sistema-e-um--feijao-transgenico-para-enfrentar-o-mosaico-dourado>>. Acesso em: 15 mar. 2017.

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. Mudanças climáticas e sustentabilidade ambiental na América Latina e no Caribe: FAO, 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/americas/perspectivas/cambio-climatico/pt/>>. Acesso em: 27 fev. 2017.

GREEN, J. M. Current state of herbicides in herbicide-resistant crops. **Pest Manag Sci**, v. 70, p. 1.351-1.357, 2014. DOI: 10.1002/ps.3727

International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA). **GM Approval Database**. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>>. Acesso em: 15 mar. 2017.

PREUSS, S.B.; MEISTER, R.; XU, Q.; URWIN, C.P.; TRIPODI, F.A.; SCREEN, S.E. Expression of the *Arabidopsis thaliana* BBX32 gene in soybean increases grain yield. **Plos One**, v. 7, n. 2, p. 1-12, 2012.

RICE, E.A.; KHANDELWAL, A.; CREELMAN, R.A.; GRIFFITH, C.; AHRENS, J.E.; PHILIP TAYLOR, J et al. Expression of a truncated ATHB17 protein in maize increases ear weight at silking. **Plos One**, v. 9, n. 4, p. 1-21, 2014.

SCHNEPF, H.E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review**. v.62, n.3, p.775-806, 1998.

TOJO, A.; AIZAWA, K. Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by gut juice protease of the silkworm *Bombix mori*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 45, p. 576-580. 1983.

WU, Y.; FOX, T.W.; TRIMNELL, M.R.; WANG, L.; XU, R.; MARK CIGAN, A. Development of a novel recessive genetic male sterility system for hybrid seed production in maize and other cross-pollinating crops. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, p. 1.046-1.054, 2016.



# **Polymerase Chain Reaction (PCR): Protocolo Básico, Troubleshooting e Estratégias para a otimização da técnica e na customização de primers para diagnóstico molecular**

*Camila Chioda de Almeida, Lucas José Luduverio Pizauro,  
Mariana Monezi Borzi, Thaylane Paula Financi,  
Fernando Antonio de Ávila*

## **1 Introdução**

No âmbito da biologia molecular, muitas tecnologias surgiram e foram aprimoradas; entretanto, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ainda é muito utilizada para a replicação enzimática de DNA, excluindo a necessidade do uso da clonagem gênica em microrganismos para esta finalidade (RAHMAN et al., 2013). A PCR permite que pequenas quantidades de DNA sejam amplificadas diversas vezes de forma exponencial, é base para algumas das novas tecnologias de sequenciamento genômico e expressão gênica, além de ser muito utilizada no ambiente acadêmico e em laboratórios para diagnóstico de doenças (GARIBYAN; AVASHIA, 2013). Para obter sucesso com esta técnica, existem muitos detalhes que precisam de atenção para a correta execução e interpretação dos resultados, como por exemplo, a escolha de um bom par de oligonucleotídeos iniciadores (primers), adaptação dos reagentes da reação, características do gene-alvo escolhido, dentre outros. Assim, neste capítulo, serão abordados a técnica de PCR, os principais problemas que ocorrem e como solucioná-los, erros cometidos na interpretação dos resultados e como interpretá-los corretamente e problemas no uso e na customização de primers.

## 2 Polimerase Chain Reaction - PCR

Para utilizar a técnica da PCR, é necessária a presença de um DNA molde (template), um DNA molde que possua a sequência-alvo a ser amplificada (controle positivo), nucleotídeos (dNTPs), primers ou oligonucleotídeos iniciadores e DNA polimerase (MCPHERSON; MOLLER, 2006). A PCR utiliza-se de elementos básicos do processo de replicação dos organismos, no qual ocorre a síntese de DNA genômico. Ao contrário do que ocorre nos seres vivos, a PCR necessita de apenas alguns componentes presentes no maquinário de replicação para copiar e multiplicar pequenos fragmentos de DNA (MCPHERSON; MOLLER, 2006). Para simular o desenrolar da fita de DNA, que no organismo ocorre através de um complexo sistema de enzimas e proteínas, é utilizada uma etapa de aquecimento (desnaturação da fita dupla de DNA molde), a amplificação ocorre pelo uso de sequências de primers específicos, que irão ligar-se a uma sequência complementar no DNA molde, para que um determinado gene de interesse, ou uma determinada sequência definida, possa ser replicado, sucessivamente, através da adição de nucleotídeos disponíveis comercialmente (dNTPs) e pela DNA polimerase termorresistente (TAQ polimerase) (MCPHERSON; MOLLER, 2006).

Dessa forma, através de subseqüentes aquecimentos e resfriamentos, esse processo pode ser repetido diversas vezes, para gerar um crescente número de sequências de forma exponencial, que serão posteriormente analisadas por eletroforese em gel de agarose, e o produto amplificado visualizado por meio de transiluminação em luz ultravioleta, após terem sido coradas, como, por exemplo, por brometo de etídeo ou SYBR Safe (INVITROGEN®) e sua dimensão deduzida com base na comparação com um marcador (BROWN, 1999).

Desde o desenvolvimento da técnica da PCR, em 1983, por Kary Mullis, avanços tecnológicos surgiram para o aumento da precisão dos resultados obtidos em amplificação de DNA. Dessa forma, estas técnicas passaram a ter um papel-chave no diagnóstico molecular. Com o crescente uso da PCR para diagnóstico laboratorial e frente à necessidade de diminuir os custos da técnica, bem como aumentar a quan-

tidade de amostras a serem analisadas, foi desenvolvida uma variação da PCR, a PCR multiplex, que utiliza mais de um par de primer para mais de uma sequência-alvo (ELNIFRO et al., 2000). A PCR multiplex tem o potencial para diminuir, consideravelmente, o tempo e o esforço laboratorial, sem comprometer os resultados (ELNIFRO et al., 2000). No entanto, alguns cuidados devem ser considerados para total sucesso na execução, como, por exemplo, o conhecimento do tamanho do amplicon (produto amplificado em pares de base – pb), pois gene-alvo com o mesmo tamanho de pb ou com tamanhos muito próximos pode dificultar na visualização do gene amplificado corretamente. Com o uso da PCR, é possível isolar determinado gene de um determinado organismo, tornando esta técnica o pilar de projetos de sequenciamento genômico, determinação de sequências de nucleotídeos de genes e de seus produtos (MCPHERSON; MOLLER, 2006).

Assim, para a otimização da técnica de PCR, e caso ocorra algum erro, o troubleshooting, é necessário, inicialmente, conhecer os mecanismos pelos quais esta técnica é realizada.

### **3 Inibidores de PCR**

O uso da PCR pode ser restrito devido à presença de inibidores. Este fato é evidenciado principalmente quando esta técnica é utilizada diretamente em amostras biológicas, como, por exemplo, amostras clínicas (órgãos, sangue, fezes, etc.), ambientais (água, solo, etc.) ou alimentícias (carne, leite, frutas, etc.) (SCHRADER et al., 2012). A inibição ocorre devido à interação entre os inibidores com a estrutura ou função das proteínas e da DNA polimerase termorresistente (RÅDSTRÖM et al., 2008). A DNA polimerase pode ser degradada por proteínases presentes nas amostras, desnaturada por fenol ou detergente advindos tanto de tratamentos durante a obtenção das amostras, quanto da contaminação das mesmas (RÅDSTRÖM et al., 2008). Assim, é importante que as amostras sejam preparadas e tenham o DNA extraído de forma correta, evitando-se a contaminação pelos inibidores, ou buscando reduzi-los ou removê-los (RÅDSTRÖM et al., 2008). Alguns dos principais inibidores da PCR e seus mecanismos de inibição estão apresentados na Tabela 1. Dessa forma, atenção especial deve ser dada

à concentração final de DNA em torno de 40 ng/μl e de inibidores nas amostras a serem avaliadas, principalmente quando são utilizados métodos de extração em que se sabe que estes componentes estão presentes neste processo.

**Tabela 1.** Principais inibidores da PCR e seus mecanismos de inibição.

Inibidores	Mecanismo de ação	Referência
Íons de Cálcio	Compete com o Mg <sup>++</sup> como cofator da DNA polimerase	(BICKLEY et al., 1996)
EDTA	Quelante de íons de Mg <sup>++</sup>	(ROSSEN et al., 1992)
Exopolissacarídeos	Liga-se à DNA polimerase	(MONTEIRO et al., 1997)
Heparina	Liga-se aos ácidos nucleicos	(SATSANGI et al., 1994)
IgG	Liga-se aos ácidos nucleicos	(ABU AL-SOUD; RÅDSTRÖM, 2000)
Lactoferrina	Libera íons de Fe <sup>++</sup>	(AL-SOUD; RÅDSTRÖM, 2001)
Fenol	Desnatura a DNA polimerase	(KATCHER; SCHWARTZ, 1994)
Proteases	Degrada a DNA polimerase	(POWELL et al., 1994)

Adaptado de (RÅDSTRÖM et al., 2008)

## 4 Design de Primers

O design de um par de primers apropriado é essencial para o sucesso da PCR. O uso de primers ruins ou mal customizados irá resultar em pouco ou nenhum produto (APTE; DANIEL, 2009), fato que se deve principalmente à ampliações não específicas ou pela produção de dímeros. Desta forma, quando customizar um primer para uma região-alvo que se deseja amplificar, um primer deverá anelar-se com esta sequência positiva, convencionalmente designada com orientação 5' - 3', sendo esta sequência conhecida como *sense* ou sem *template*

(LORENZ, 2012). O outro par do primer deverá complementar a sequência negativa, com orientação 3' - 5', conhecida como *antisense* ou *template* (LORENZ, 2012). Além disso, o tamanho ideal de um primer varia de 18 a 30 bases, sendo que primers menores poderão ocasionar ampliações não específicas, e primers maiores, apesar de serem mais específicos, têm mais chances de apresentar estruturas secundárias, como, por exemplo, *Hairpin loops* (APTE; DANIEL, 2009). Uma atenção especial deve ser dada para a temperatura de *melting* ( $T_m$ ) dos primers. Esta temperatura é influenciada pelo tamanho, composição da sequência e a concentração dos primers na reação (APTE; DANIEL, 2009). Dessa forma, quando se pretende utilizar mais de um par de primers em uma reação, é importante que estes apresentem temperaturas de *melting* similares, não mais do que 2°C a 3°C; caso contrário, a amplificação será menos eficiente ou poderá não ocorrer (APTE; DANIEL, 2009). Além da  $T_m$ , outra temperatura importante a ser considerada é a temperatura de anelamento ( $T_a$ ), que está diretamente relacionada com o tamanho e a composição do primer e não deve estar mais que 5°C abaixo da  $T_m$  do primer. Uma das consequências da  $T_a$  muito baixa em relação à  $T_m$ , é que um ou o par de primers irá anelar em sequências que não são o gene-alvo pretendido, gerando um produto de PCR não específico e, conseqüentemente, reduz o rendimento do produto desejado. Inversamente, se a  $T_a$  for muito alta, a eficiência da reação reduzirá, e a probabilidade de o primer anelar-se na região-alvo é significativamente baixa (PREDIGER, 2013). Outra é a temperatura de dissociação do amplicon que também deve ser levada em consideração, pois deve-se certificar de que o produto será completamente dissociado a 92°C (APTE; DANIEL, 2009).

Ao customizar primers, deve-se prestar atenção em situações que possam levar a possíveis conformações secundárias. Assim, a presença de auto-homologia na sequência de nucleotídeos do primer poderá vir a formar o *Hairpin loops*, ou caso existam homologias entre os pares de primers, poderá ocorrer a formação de dímeros (APTE; DANIEL, 2009). Isto ocorre principalmente devido aos primers anelarem-se a si mesmos, ou entre eles, acarretando ampliações inespecíficas. Uma das formas para diminuir a formação de estruturas secundárias é manter a concentração de 50% de C+G e evitar aqueles com grande re-

petição de uma mesma base (APTE; DANIEL, 2009). Certificar-se de incluir bases C ou G no terminal 3' aumenta a eficiência do primer devido às ligações de hidrogênio mais forte que estas bases apresentam, assegurando uma ligação correta no terminal 3' do primer (APTE; DANIEL, 2009). Finalmente, para avaliar a especificidade e evitar reações inespecíficas, os primers deverão passar por uma procura, utilizando a ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), no banco de dados públicos, buscando homologias cruzadas, com sequências repetidas ou a outros lócus presentes em outras regiões do genoma.

## 5 Otimização

A utilização da PCR para a geração de grandes quantidades de produto pode ser uma tarefa árdua. Mesmo sob condições ótimas, falhas de amplificação podem levar à geração de múltiplos, indesejados e não caracterizados produtos de PCR (ROUX, 2009). Alguns aspectos relacionados à otimização da reação da PCR envolvem os reagentes, a temperatura de amplificadores e a prevenção da contaminação (MC-PHERSON; MOLLER, 2006). Alguns itens importantes para a otimização são as concentrações de íons de Mg, pH do tampão, condições dos ciclos de amplificação, em especial a temperatura de anelamento (ROUX, 2009). Uma maneira de evitar problemas na PCR em relação ao anelamento é fazer previamente um gradiente de temperatura do primer recém-customizado para, posteriormente, utilizá-lo na reação de rotina. Deve-se lembrar de que algumas variáveis na reação de PCR são interdependentes, podendo ocasionar, assim, um efeito em cascata, caso alguma etapa de preparo seja mal executada. Um exemplo, segundo Roux (2009), é o fato de que as dNTPs quelam um número proporcional de íons de Mg e, caso seja adicionada uma grande concentração de dNTPs, a concentração de Mg livre será menor, podendo influenciar a reação de polimerização (ROUX, 2009), já que a DNA polimerase necessita de íons de Mg para funcionar.

Uma das técnicas de otimização é a *Touchdown* PCR, na qual é possível a retirada de *amplicons* inespecíficos e de dímeros de primer (ROUX, 2009). Isto se dá através de diminuições incrementais na tem-

peratura de anelamento do(s) primer(s), que inicialmente é selecionada para ser superior à  $T_a$  e que irá declinar gradualmente até cair abaixo desta temperatura (ROUX, 2009). A variação na temperatura de anelamento facilita a hibridização do primer com o DNA-molde de forma mais específica, e mesmo que a  $T_m$  venha a ficar abaixo da temperatura ótima para o primer, a sequência-alvo já terá sido amplificada em quantidade suficiente para sobrepujar qualquer produto não específico nos ciclos futuros (ROUX, 2009).

## **6 Evitando a contaminação da PCR**

Inicialmente, para evitar a contaminação, faz-se necessária a detecção de amplicons de contaminação. Os métodos modernos são focados em duas categorias para minimizar ou eliminar a contaminação devido à transferência de amplicons (MIFFLIN; PH, 1997). Uma das formas de avaliar se a contaminação com amplicons exógenos ainda não se tornou um problema grave, que irá ser necessária uma descontaminação completa do laboratório, é a utilização de um controle contendo apenas reagentes, em conjunto com outras amostras (MCPHERSON; MOLLER, 2006). Além disso, utilizar esse tipo de reação-controle permite avaliar se os reagentes preparados são isentos de contaminação antes de contaminar reações futuras (MCPHERSON; MOLLER, 2006). Os métodos para minimizar ou eliminar a contaminação são agrupados em duas categorias: pré e pós-amplificação (MIFFLIN; PH, 1997). Os métodos de controle de contaminação pré-reação envolvem o controle de aerossóis, quando se lida com substâncias líquidas usadas na preparação dos reagentes da reação. Os métodos pós baseiam-se na já demonstrada sensibilidade do DNA à luz ultravioleta (MCPHERSON; MOLLER, 2006). Para isso, o uso de dispensadores de ponteiros e de ponteiros resistentes a aerossóis é indicado. De forma geral, os mecanismos de controle de contaminação estão descritos a seguir: 1- A construção do laboratório deve levar em consideração o uso de salas separadas para o preparo dos reagentes da reação de PCR, e outra sala, para a reação e análise dos amplicons; 2- Controle ambiental através de filtros de circulação de ar; 3- Uso de equipamentos inerentes ao laboratório sem a presença de equipamentos oriundos de

outros laboratórios; 4- Circulação das amostras: o caminho das amostras para a condução da reação deverá ser sempre da sala pré-preparo para a pós-preparo e nunca no caminho inverso (MIFFLIN; PH, 1997). Além da utilização de materiais como: microtubos e ponteiras para pipetadores livres de RNase e DNase, água ultrapura no preparo da mix e manuseio com luvas.

## **7 Troubleshooting**

Caso a PCR não gere os amplicons desejados, será necessário que parâmetros da reação sejam modificados para que esta funcione. *Troubleshooting* em PCR é um trabalho frustrante e necessita de análises criteriosas e um bom entendimento dos componentes da reação para reduzir o tempo e o número de tentativas necessárias para se obter os resultados desejados (ROUX, 2009). Na maioria das vezes, alterando a concentração de íons Mg ou manipulando a temperatura de anelamento poder-se-á resolver a maioria dos problemas. Entretanto, antes de se mudar os parâmetros da reação, deve-se certificar de que os resultados errados não se devem a erros humanos, como, por exemplo, se todos os reagentes foram adicionados na proporção correta ou se estes não foram contaminados (LORENZ, 2012). Após esta verificação, o uso de controles irá fornecer pistas para se saber em qual etapa a reação de PCR está apresentando problemas. Entre estes controles, pode-se considerar, além do controle negativo já mencionado, o uso de um controle positivo (molde de DNA que já é sabido como amplificador) para se saber que a reação está funcionando de forma correta, além de um controle negativo, que já é sabido que o DNA-molde não será amplificador para o gene-alvo, irá revelar contaminação ou se existe a formação de dímeros de primers ou ainda a existência de eventos interferindo com o primer. Pode-se também optar pelo preparo de novos reagentes desde o começo. A tabela a seguir (Tabela 2) irá sumarizar alguns dos principais problemas, possíveis causas e algumas possíveis soluções.

**Tabela 2. Troubleshooting**

<b>Problema</b>	<b>Possível causa</b>	<b>Solução</b>
Sem produto de PCR	Falta/defeito em algum reagente/ componente da reação	Certificar-se de que todos os reagentes estão na reação. Se possível, usar uma mix comercialmente pronta
Sem produto de PCR	Número de ciclos insuficientes	Aumentar o número de ciclos, podem-se retirar alíquotas da reação a cada 5 ciclos para se determinar o número correto
Sem produto de PCR	Primers ruins	Reconsiderar o design do primer e checar a sequência de DNA-alvo, refazer os primers para ter certeza de que o final 3' se liga perfeitamente ao DNA-molde
Sem produto de PCR	Baixa qualidade de DNA-molde ou em quantidade insuficiente	DNA estocados por longos períodos, ou diluídos em soluções não ideais serão degradados. Checar a qualidade e integridade antes de utilizá-los
Sem produto de PCR	Termociclador com defeito	Averiguar se o termociclador realmente chega à temperatura através de kits comerciais
Sem produto de PCR	Falta de Desnaturação ou DNA-moldes difíceis de desnaturar	Incubação inicial a 95 ou 94°C por 5 min deveria ser suficiente para a desnaturação; caso o DNA possua alta concentração de CG, a adição de componentes desnaturantes será necessária
Sem produto de PCR	Tempo de extensão muito curto	Como via de regra, tempo de extensão equivale a 1 min para cada 1.000 pb
Sem produto de PCR	Problemas na enzima	Uso de controle positivo caso não ocorra amplificação, trocar a polimerase por uma mais nova

Sem produto de PCR	Problemas no tampão	Testar outro tampão, de preferência refeito
Sem produto de PCR	Concentração de Desoxidenucleotídeos	Caso o controle positivo não amplifique, pode ser necessário o uso de dNTPs novos ou reavaliar a concentração destas.
Múltiplos produtos gerados	Baixa temperatura de anelamento	Usar o procedimento com Hot Start irá aumentar a temperatura, realizar um gradiente de temperatura. Pode-se usar a TD PCR
Múltiplos produtos gerados	Muitos ciclos	Reduzir o número de ciclos usados, podem-se também retirar alíquotas (0,1 vol) a cada 5 ciclos, durante os 40 ciclos, para averiguar o número de ciclos ideal.
Múltiplos produtos gerados	Primers ruins	Reconsiderar o design do primer e checar a sequência de DNA-alvo, refazer os primers para ter certeza de que o final 3' se liga perfeitamente ao DNA-molde
Produtos Manchados/ ou em forma de esfregaço ou borrados	Tempo de extensão muito longo	Reduzir o tempo de extensão em 30 s para passos de 1 min
Produtos Manchados/ ou em forma de esfregaço ou borrados	Muitos ciclos	Reduzir em 5 o número de ciclos ou realizar o procedimento descrito anteriormente.
Produtos Manchados/ ou em forma de esfregaço ou borrados	Temperatura de desnaturação muito baixa	Averiguar se o termociclador atinge a temperatura correta, caso necessário aumentar a temperatura de desnaturação em 1°C

Produtos Manchados/ ou em forma de esfregaço ou borrados	Muita polimerase	Reduzir a quantidade utilizada
Produtos Manchados/ ou em forma de esfregaço ou borrados	Muito DNA- -molde	Reduzir a quantidade de DNA utilizado, de preferência realizando um gradiente de diluição
Banda de amplificação muito fraca	Número de ciclos insuficientes	Aumentar o número de ciclos retirando alíquotas, como descrito anteriormente
Banda de amplificação muito fraca	Qualidade ou quantidade de DNA-molde	Pouco DNA-molde ou presença de contaminação. Diluir nova alíquota de DNA e fazer uma diluição seriada
Banda de amplificação muito fraca	Tempo de extensão muito curto	Usar a regra de 1min para cada 1.000 pb, caso necessário aumentar a temperatura em 1°C
Banda de amplificação muito fraca	Necessário o uso de aditivos	Usar amplificadores de PCR disponíveis comercialmente

Adaptado de (MCPHERSON; MOLLER, 2006)

## 8 Referências Bibliográficas

ABU AL-SOUD, W.; RÅDSTRÖM, P. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 12, p. 4.463–4.470, 2000.

AL-SOUD, W. A.; RÅDSTRÖM, P. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 2, p. 485–493, 2001.

APTE, A.; DANIEL, S. PCR primer design. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 4, n. 3, p. 1–10, 2009.

BICKLEY, J. et al. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. **Letters in Applied Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 153–158, fev. 1996.

BROWN, T. A. **Genética: um enfoque molecular**. [s.l.: s.n.].

ELNIFRO, E. M. et al. Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 559–570, 2000.

GARIBYAN, L.; AVASHIA, N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 3, p. 1–8, 2013.

KATCHER, H. L.; SCHWARTZ, I. A distinctive property of Tth DNA polymerase: enzymatic amplification in the presence of phenol. **BioTechniques**, v. 16, n. 1, p. 84–92, jan. 1994.

LORENZ, T. C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. **Journal of Visualized Experiments**, n. 63, p. e3998, 2012.

MCPHERSON, M. J.; MOLLER, S. G. **PCR: The basics**. [s.l.: s.n.].

MIFFLIN, T. E.; PH, D. **Control of Contamination Associated with PCR and Other Amplification Reactions Introduction to Contamination Control**. p. 1–20, 1997.

MONTEIRO, L. et al. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 995–998, 1997.

POWELL, H. A. et al. Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 59–61, jan. 1994.

PREDIGER, E. Designing PCR primers and probes. Pipet Tips Ideas to Streamline Your Research, 2013. Disponível em: <https://www.idtdna.com/pages/decoded/decoded-articles/pipet-tips/decoded/2013/10/21/designing-pcr-primers-and-probes>. Acesso em: 19 mar. 2017.

RÅDSTRÖM, P. et al. Strategies for overcoming PCR inhibition. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 3, n. 3, 2008.

RAHMAN, M. T. et al. Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. **Anwer Khan Modern Medical College Journal**, v. 4, n. 1, p. 30–36, 2013.

ROSSEN, L. et al. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 37–45, set. 1992.

ROUX, K. H. Optimization and troubleshooting in PCR. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 4, n. 4, p. 1–7, 2009.

SATSANGI, J. et al. Effect of heparin on polymerase chain reaction. **Lancet (London, England)**, v. 343, n. 8.911, p. 1.509–1.510, 11 jun. 1994.

SCHRADER, C. et al. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1.014–1.026, 2012.



# Controle Biológico de Pragas: Histórico, Avanços e Perspectivas

*Maria Laura Viola Augusto, Marina Carnaz Duarte Serra, Paula  
Castanho Borges, Janete Aparecida Desidério*

## 1 Introdução

O crescimento da população mundial é constante. Segundo previsão feita pela FAO, até 2050, o mundo atingirá 9,7 bilhões de habitantes, o que torna necessário o aumento da produção de alimento para que as necessidades nutricionais da população sejam mantidas (FAO, 2015).

O grande desafio da agricultura é encontrar alternativas para aumentar a produção agrícola de maneira sustentável, preservando o meio ambiente, sem o uso excessivo de defensivos químicos agrícolas para o controle de pragas e, desta forma, evitar os impactos causados à saúde humana e ambiental, além de impedir o surgimento de pragas resistentes. Diante disto, o controle biológico de pragas é a prática mais utilizada, por ter um custo relativamente baixo quando comparado ao controle químico e por causar menos danos à saúde dos trabalhadores e consumidores (como intoxicações agudas e crônicas, câncer, esterilidade, etc.) e ao meio ambiente (acúmulo na biota, contaminação de água e solo, desequilíbrios ecológicos, entre outros).

O controle biológico é um fenômeno natural que tem como objetivo fundamental regular a densidade de uma população de organismos vivos a partir do uso de seus inimigos naturais, podendo ser tanto insetos benéficos como os parasitoides e predadores, como também os microrganismos: fungos, bactérias e vírus (EMBRAPA, 2006).

Com os avanços das técnicas de biologia molecular, foi possível a utilização de outros meios para o controle de pragas, como, por

exemplo, a geração de plantas transgênicas resistentes a pragas, que são portadoras de genes que expressam proteínas tóxicas aos insetos-praga, como, por exemplo, as proteínas Cry e Vip da bactéria *Bacillus thuringiensis* e, mais recentemente, técnicas como a edição de genomas de insetos, por meio das tecnologias RNAi (RNA de interferência) e CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats ou Repetições palindrômicas Curtas Regularmente Agrupadas e Interespaçadas) vêm permitindo avanços consideráveis no controle biológico de insetos-praga.

Neste capítulo, exploram-se o conceito e tipos de controle biológico, evidenciando os principais inimigos naturais e as novas tecnologias que estão sendo estudadas.

## 2 Controle Biológico: Conceito

No ano de 1919, o entomologista Harry Scott Smith foi o primeiro a mencionar o termo “Controle Biológico” para citar o uso de inimigos naturais no controle de pragas em cultivos. Posteriormente, esse termo passou a ser utilizado para todas as formas de controles alternativos aos produtos químicos que envolvessem organismos vivos. Em 1968, De Bach definiu controle biológico como “a ação de parasitoides, predadores e patógenos na manutenção da densidade de outro organismo a um nível mais baixo do que aquele que normalmente ocorreria em sua ausência”.

Além de ocorrer como um fenômeno natural, o controle biológico também tem sido utilizado como uma estratégia e uma ferramenta importante para o controle de pragas agrícolas, através da utilização de patógenos, adquirindo cada vez maior importância em programas de manejo integrado de pragas (MIP), exatamente no que se refere à finalidade de se desenvolver uma agricultura sustentável (PARRA et al., 2002).

## 3 Tipos de Controle Biológico

### Controle Biológico Natural

Envolve a tendência natural das populações de organismos de não crescerem até ao infinito, nem decrescerem até à extinção, como decorrência de processos reguladores (como os inimigos naturais) em ambientes não perturbados (ecossistemas naturais). Este tipo de controle envolve as ações dos fatores bióticos e abióticos e de todo o meio ambiente na manutenção do equilíbrio natural. Observa-se que muitas pragas são mantidas em níveis que não causam danos, por meio da ação dos inimigos naturais que ocorrem naturalmente no campo, formado pelos parasitoides e predadores (chamados de entomófagos) e os patógenos (entomopatógenos). O inimigo natural eficaz, do ponto de vista econômico, é aquele capaz de regular a densidade populacional de uma praga e mantê-la em níveis abaixo do considerado dano econômico estabelecido para uma determinada cultivar.

## 4 Entomófagos

### Predadores

Para seu completo desenvolvimento, precisam de mais do que uma presa durante todo seu ciclo de vida, sendo organismos de vida livre que buscam ativamente e matam suas presas. Normalmente, são maiores do que estas, sendo as ordens de insetos mais importantes: Coleoptera (joaninhas, besouros), Diptera (*Aedes aegypti*, moscas-das-flores, borrachudos), Hemiptera (percevejo, barbeiro - vetor da doença de chagas), Neuroptera (crisopídeos), Hymenoptera (vespas), Dermaptera (tesourinhas).

*Orius* spp. é um pequeno percevejo predador, principalmente de pequenos insetos, como a tripes. Tanto suas ninfas como os adultos se alimentam de todos os estágios da presa, e ambos são encontrados no mesmo hábitat (LEFEBVRE et al., 2013).

## Parasitóides

Necessitam de apenas um organismo hospedeiro para sobreviver, geralmente insetos que colocam seus ovos sobre ou dentro de insetos-praga. As larvas do parasitoide alimentam-se do corpo do inseto, causando-lhe a morte.

As pequenas vespinhas *Aphidius colemani*, *Lysiphlebus testaceipes*, *Praon* sp., são parasitoides de pulgões. Atacam introduzindo, através de seu ovipositor, um ovo no interior do corpo do pulgão. Deste ovo, sai uma larva, a qual se alimenta dos tecidos internos do pulgão, levando-o à morte. O pulgão parasitado apresenta um aspecto de “múmia”, normalmente de coloração palha (WANG et al., 2016).

## Entomopatógenos

A especificidade e a seletividade desses agentes de controle, bem como a facilidade de multiplicação, dispersão e produção em meios artificiais, além da ausência de poluição ambiental e toxicidade ao homem e outros organismos não alvo, são as principais vantagens do uso de microrganismos entomopatogênicos para o controle de pragas. Este grupo é formado por fungos, bactérias, vírus e nematoides.

## Fungos

Na colonização de um hospedeiro, estruturas reprodutivas, conhecidas como esporos ou conídios, originadas de reprodução sexuada ou assexuada, são responsáveis pela dispersão do patógeno, que geralmente ocorre por contato com o inseto e de forma lenta. Os fungos possuem grande variabilidade genética e largo espectro de hospedeiros. Os principais fungos de interesse no controle biológico são: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, *Nomuraea rileyi*, *Verticillium lecanii*, *Hirsutella thompsonii*, e os fungos da ordem Entomophthorales (*Zoophthora*, *Entomophthora*, *Entomophaga*, *Neozygites*). Desde a década de 70, o Brasil comercializa os fungos *Metarhizium anisopliae*, utilizados no controle de cigarrinhas da cana-

-de-açúcar e de pastagens, e *Baculovirus anticarsia*, para controle de *Anticarsia gemmatalis* Hübner na soja (PARRA, 2012).

## **Bactérias**

Dentre as bactérias que produzem ou não esporos que podem causar doenças em insetos, as pertencentes à espécie *Bacillus thuringiensis* são as mais importantes, contaminando os insetos via oral, multiplicando-se no interior dos mesmos e produzindo protoxinas na forma de cristais. Os cristais, por ação das proteases, liberam toxinas que afetam os insetos com paralisia intestinal e suspensão da alimentação, causando-lhes a morte.

A bactéria *B. thuringiensis*, há alguns anos, é utilizada para o desenvolvimento de formulações para biopesticidas, e com o advento da tecnologia do DNA recombinante, genes específicos são introduzidos em plantas, gerando plantas geneticamente modificadas para a produção das proteínas tóxicas de Bt. A primeira geração de plantas transgênicas resistentes a insetos foi desenvolvida exatamente com o uso de genes codificadores de proteínas inseticidas do entomopatógeno Bt. Exemplos de eventos transgênicos *B. thuringiensis* em plantas: soja transgênica PRO2 (Monsanto), milho ASD (Du Pont) e algodão TwinLink (Bayer).

## **Vírus**

Os vírus penetram nos insetos via oral, causando doenças em insetos bastante específicos, sendo, entre os principais grupos de entomopatógenos, dos mais seguros em relação a possíveis efeitos sobre o homem ou sobre outros animais não alvo. Porém, são considerados patógenos de ação lenta, sendo esta uma grande desvantagem comercial. O controle da lagarta-da-soja, com *Baculovirus anticarsia* (VPN), é o maior programa de controle biológico estabelecido no mundo, em área, com o uso de um entomopatógeno (ANDRADE, 2004).

## **5 Controle Biológico Aplicado**

Abrange a interferência do homem e funciona no sentido de aumentar as interações antagônicas (interação de indivíduos de espécies diferentes que causa redução na aptidão de um dos indivíduos) que ocorrem entre os seres vivos na natureza. Esse tipo de controle pode ser classificado como clássico (importação ou colonização de parasitoides ou predadores de um local para outro, tendo em vista o controle de pragas exóticas), conservação (envolve medidas que preservem os inimigos naturais em um sistema, ou seja, manipular o ambiente de forma favorável) e aumentativo (inimigos naturais são periodicamente introduzidos e liberados, após a criação massal em laboratórios especializados; é comercialmente aplicado em grandes áreas em vários sistemas de cultivo).

## **6 Novas tecnologias utilizadas no Controle Biológico**

A prática do controle biológico, em suas diversas formas, contribui para melhorar a qualidade do produto agrícola no sentido de não deixar resíduos nos alimentos e de ser inofensiva ao meio ambiente e à saúde da população. Porém, é natural o desenvolvimento de resistência por parte das pragas a qualquer medida de controle eficiente e extensamente usada contra elas. Devido a isso, a busca por outros métodos de controle é constante, e técnicas revolucionárias vêm sendo estudadas por permitirem a manipulação de genes com maior precisão, rapidez e menor custo, abrindo novas perspectivas para o controle biológico e, conseqüentemente, para o melhoramento de plantas, como é o caso do RNA de interferência.

## **7 RNA de interferência (RNAi)**

O pareamento de bases que originam a dupla fita de ácidos ribonucleicos (dsRNA, “double strand ribonucleic acid”) só foi reconhecido em 1960, após o esclarecimento da dupla fita de DNA, embora

sua identificação tenha ocorrido anos anteriores, na década de 1950. Segundo Spencer et al. (1962), a molécula de RNA, quando apresentar extensa região complementar, pode unir-se em dupla hélice, assim como observado no DNA.

Inicialmente, os estudos relacionados ao dsRNA em sistema biológico estavam voltados a infecções virais e à replicação de seu material genético, por meio de um dsRNA intermediário na célula hospedeira (CAMARGO, 2014). Somente na década de 1990, pesquisas começaram a investigar as demais funções do dsRNA, compreendendo o que mais tarde seria denominado de RNA de interferência (RNAi, “RNA interference”) ou silenciamento gênico por RNA (FIRE et al., 1998).

Também conhecido como silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS), o mecanismo do RNAi baseia-se na introdução de um dsRNA homólogo a genes endógenos (MELO; CONTE JÚNIOR, 2004), a qual pode ser ocasionada por diferentes métodos. Uma vez que a infecção por dsRNA é vista como prejudicial ao seu mecanismo, a célula possui estratégias de degradação, por meio de clivagem específica da molécula através da enzima RNase do tipo II, denominada *Dicer*, resultando em fragmentos de 20-30 pares de base denominados de siRNA (small interfering RNA) (BARDELLA, 2015).

O complexo ribonucleico RISC, ao associar-se com siRNA, faz com que uma das fitas seja degradada, mantendo a fita simples remanescente como molde para o reconhecimento de regiões complementares de RNA mensageiro (RNAm). Ao reconhecer regiões homólogas, o complexo RISC inibe e/ou degrada a molécula de RNAm, silenciando a expressão endógena de qualquer gene (GROSSHAN; SLACK, 2002; SEMIZAROV et al., 2003).

O silenciamento gênico tem-se mostrado bastante promissor para o controle biológico de insetos-praga, pois é capaz de inativar a expressão de genes fundamentais para a sobrevivência de organismos entomológicos. Como a técnica de RNAi proporciona ação altamente específica, o impacto ambiental é inferior ao de técnicas anteriores.

Os primeiros trabalhos publicados utilizando RNAi no campo entomológico foram em 2007, de Baun et al. (2007), com *Diabrotica virgifera*, e MAO et al. (2007), com *Helicoverpa armigera*. A partir daí, outros insetos de ordens como Diptera, Coleoptera, Hymenopte-

ra, Orthoptera, Blattodea, Lepidoptera e Isoptera são alvos de estudos com RNAi (KATOCH et al., 2013).

O grande desafio desta técnica é encontrar uma forma fácil e confiável de introduzir o dsRNA na célula do organismo-alvo. Basicamente, o procedimento é realizado por microinjeção do dsRNA em larvas de inseto ou ingestão da molécula (ao alimentar-se da dieta contaminada ou de plantas transgênicas), ou por meio de imersão do organismo em solução contendo dsRNA (BARDELLA, 2015). Como a absorção do dsRNA através da ingestão é suficiente para silenciar a expressão de genes-alvos, a aplicação desta tecnologia por meio de pulverizações seria uma alternativa para o controle de pragas da agricultura, se os custos para a produção de RNA estável ainda não fossem tão elevados. Portanto, a alternativa viável para o uso desta tecnologia, atualmente, são plantas transgênicas capazes de expressar o dsRNA e controlar a praga com sucesso. Recentemente, plantas transgênicas de algodão foram desenvolvidas para controlar a praga *Helicoverpa armigera* por meio da ferramenta de RNAi (NI et al., 2017).

## 8 CRISPR/Cas na Edição Gênica

Embora tenha sido descoberto por Ishino et al. (1987), em *Escherichia coli*, o sistema CRISPR só foi utilizado por Jasen et al. (2002), quando a estrutura foi observada em bactérias de *Salmonella typhimurium* e *Streptococcus pyogenes* (OLIVEIRA, 2016).

O sistema imune adaptativo, para proteção contra o ataque de fagos e vírus em bactérias e archeas, atualmente é utilizado para realizações de edição gênica denominado CRISPR/Cas (BARRANGOU et al., 2007).

O *locus* CRISPR é constituído por uma curta região de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas por espaçadores (JANSEN et al., 2002). Estes espaçadores são derivados de subsequências de DNA exógeno, como, por exemplo, bacteriófagos (HORVATH; BARRANGOU, 2010). Também é observado que, anterior à região de repetições palindrômicas, há uma região denominada *leader*, com a função promotora e de sítio de ligação para a proteína. Dessa forma, relatos de resistência bacteriana a bacteriófagos também são ob-

servados atuando contra plastídio (BARRANGOU; HORVATH, 2012).

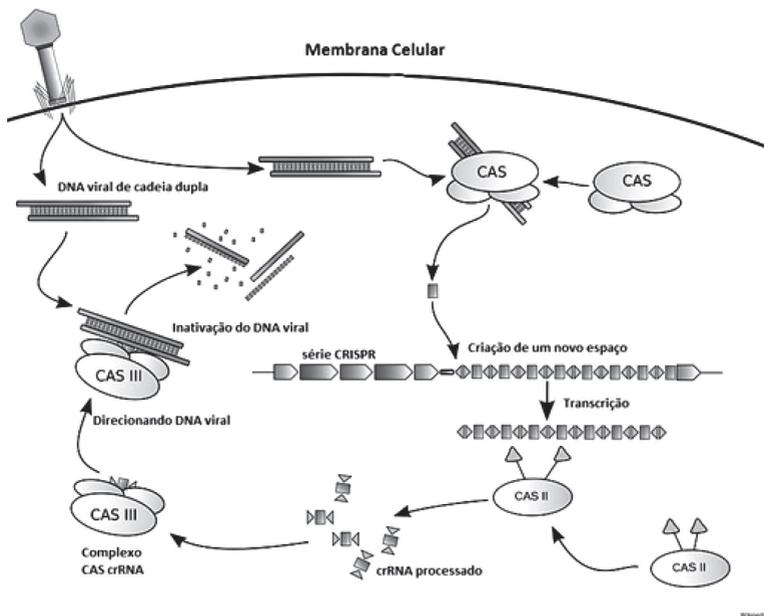
A associação de CRISPR a uma proteína denominada Cas torna a célula imune à invasão de qualquer material genético exógeno, pois a sequência de CRISPR é transcrita em longas sequências de RNA, que serão fragmentadas em pequenos RNAs guias (crRNA) pela enzima Cas. Esse crRNA associado à proteína Cas9 irá guiar e reconhecer sequências homólogas ao DNA invasor, de forma que esta proteína clive a molécula na região pareada (Figura 1).

O grupo de Philippe Horvath, em 2007, foi pioneiro em publicar sobre o sistema CRISPR, ao integrar sequências de fagos em *S. thermophilus*, com o objetivo de criar barreira ao ataque dos mesmos (OLIVEIRA, 2016).

O sistema CRISPR não só tem a função de construção de imunidade de bactérias, mas também previne a transferência horizontal genética de resistência, conservando a identidade gênica de alguns procariontes (MARRAFFINI; SONTHEIMER, 2010).

A adaptação do sistema em eucariotos ocorreu pela primeira vez por Cong et al. (2013), em células humanas e de camundongos, imunizando-as de proteínas relacionadas a *S. thermophiles* e *S. pyogenes*.

Na agricultura, a ferramenta anima pesquisadores, pois alcança um nível inédito de controle sobre doenças e pragas agrícolas, capaz de editar o genoma de plantas, fungos e animais. Assim como trabalho realizado por Koutroumpa et al. (2016), que nocauteou o gene olfativo de Lepidoptera, utilizando *Spodoptera littoralis*. A empresa DuPont, junto à Caribou Biosciences, desenvolveu um milho com resistência a seca em tempo reduzido em relação ao melhoramento clássico (YANAGUI, 2016). Por reduzir o tempo necessário para melhorar culturas de interesse agrônomo, avançadas pesquisas relacionadas à CRISPR na agricultura devem surgir, podendo levar a biotecnologia ao advento de mais uma grande conquista no que diz respeito ao melhoramento genético de plantas.



**Figura 1:** Diagrama do mecanismo CRISPR. Fonte: (NOGUEIRA, 2015); adaptada pelo autor.

## 9 Referências Bibliográficas

ANDRADE, F. G.; NEDREIRO, M. C. C.; FALLEIROS, A. M. F. Aspectos dos mecanismos de defesa da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) relacionados ao controle biológico por Baculovirus anticarsia (AGM-NPV). **Arquivo do Instituto Biológico**, v.71, p.391-398, 2004.

BARDELLA, D.Z. Silenciamento gênico via RNAi visando ao controle da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*). Dissertação (mestrado)- Ciência (Biologia na Agricultura e no Ambiente). CENA. 2015.

BARRANGOU, R.; FREMAUX, C.; DEVEAU, H.; RICHARDS, M.; BOYAVAL, P.; MOINEAU, S.; HORVATH, P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science**, vol. 315, n. 5.819, p. 1.709-1.712, 2007.

BARRANGOU, R.; HORVATH, P. CRISPR: New horizons in phage resistance

and atrain identification. **Annual Review of Food Science and Technology**. v.3, p. 143-162, 2012.

BAUN, J.A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G.R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O.; JOHNSON, S.; PLAETINCK, G.; MUNYIKWA, T.; PLEAU, M.; VAUGHN, T.; ROBERTS, J. Control of coleopteran insect pest through RNA interference. **Nature Biotechnology**, New York, v.25, n. 11, p. 1.322-1.326, 2007.

CAMARGO, R.A. RNAi para o controle de Tuta absoluta em tomateiro. **Tese** (Doutorado) - Ciências (Biologia Celular e Molecular Vegetal). CENA, 2014.

CONG, L.; RAN, F. A.; COX, D.; LIN, S.; BARRETTO, R.; BIB, N.; ZHANG, F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science**. v. 339, p. 819-823, 2013.

DE BACH, P. **Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas**. México: Compañía Editorial Continental, 1968

EMBRAPA - **Controle Biológico**, 2006. Disponível em: [https://www.embrapa.br/documents/1355163/1994475/fold06-8\\_controleBiologico.pdf/71cf-43ce-0f8e-46da-ac5a-4c76688170e5](https://www.embrapa.br/documents/1355163/1994475/fold06-8_controleBiologico.pdf/71cf-43ce-0f8e-46da-ac5a-4c76688170e5). Acesso em: 15 mar. 2017.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of food security in the World 2015**. Disponível em: <http://www.fao.org/hunger/en/>. Acesso em: 13 mar. 2017.

FIRE, A.; XU, S.Q.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E.; MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, London, v. 391, n. 6.669, p. 806-811, 1998.

GROSSHANS, H.; SLACK, F.J. Micro-RNAs: small is plentiful. **The Journal of Cell Biology**, 2002.

HORVATH, P.; BARRANGOU, R. CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. **Science**. v. 327, n. 167. 2010.

ISHINO, Y.; SHINAGAWA, H.; MAKINO, K.; AMEMURA, M.; NAKATA, A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **Journal of Bacteriology**, 1987.

JANSEN, R.; EMBDEN, J.D.; GAASTRA, W.; SCHOOLS, L.M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Molecular Microbiology**. 2002.

- KATOCH, R.; SETHI, A.; THAKUR, N.; MURDOCK, L.L. RNAi for insect control: current perspective and future challenges. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.171, p. 847–873. 2013.
- KOUTROUMPA, F.A.; MONSEMPES, C.; FRANÇOIS, M.C.; CIAN, A.; ROYER, C.; CONCORDET, J.P.; JACQUIN-JOLY, E. Heritable genome editing withi CRISPR/Cas9 induces anosmia in a crop pest moth. **Scientific Reports**. v. 6 (29620). doi:10.1038/srep29620. 2016.
- LEFEBVRE, M.G.; REGUILON, C.; KIRSCHBAUM, D.S. Evaluación del efecto de la liberación de *Orius insidiosus* (Hemiptera: anthocoridae), como agente de control biológico de trips en el cultivo de frutilla. **Revista de investigaciones agropecuarias**. Buenos Aires, v. 39, n. 3, p. 273-280, 2013.
- MAO, Y.B.; CAI, W.J.; WANG, J.W.; HONG, G.J.; TAO, X.Y.; WANG, L.J.; HUANG, Y.P.; CHEN, X.Y. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. **Nature Biotechnology**, New York, v. 25. N. 11, p. 1.307-1.313, 2007.
- MARRAFFINI, L. A.; SONTHEIMER, E.J. Self versus nonself discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. **Nature**. V. 463, p. 568–571. 2010.
- MELO, C.C.; CONTE JÚNIOR, D. Revealing the world of RNA interference. **Nature**, Loondon, v. 431, n. 7.006, p. 338-342, 2004.
- NI, M.; MA, W.; WANG, X.; GAO, M.; DAI, Y.; WEI, X.; ZHANG, L.; PENG, Y.; CHEN, S.; DING, L.; TIAN, Y.; LI, J.; WANG, H.; WANG, X.; XU, G.; GUO, W.; YANG, Y.; WU, Y.; HEUBERGER, S.; TABASHNIK, B.E.; ZHANG, T.; ZHU, Z. Next-generation transgenic cotton: pyramiding RNAi and Bt counters insectresistance. **Plant Biotechnol. J.**, doi: 10.1111/pbi.12709. 2017.
- NOGUEIRA, L.A. Estudo molecular da resistência a bacteriófagos líticos em *Salmonella entérica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis. **Tese** (Doutorado) – Ciências Biológicas (Área de concentração Genética). UNESP, 2015.
- OLIVEIRA, T.C. Metodologias para a geração de mutantes funcionais em *Metarhizium anisopliae*: CRISPR/Cas9 e RNAi. **Dissertação** (Mestrado) – Biologia Celular e Molecular. UFRGS, 2016.
- PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORREA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. **Controle biológico no Brasil**: parasitoides e predadores. São Paulo: Editora Manole, 609p, 2002.
- SEMIZAROV, D.; FROST, L.; SARTHY, A.; KROEGER, P.; HALBERT, D.N.; FESIK, S.W. Specificity of short interfering RNA determined through gene

expression signatures. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 27, p. 6.347-6.352. 2003.

SPENCER, M.; FULLER, W.; WILKINS, M.; BROWN, G. Determination of the helical configuration of ribonucleic acid molecules by X-ray diffraction study of crystalline aminoacid-transfer ribonucleic acid. **Nature**, v.194, p. 1.014-1.020, 1962.

WANG, S.Y.; CHI, H.; LIU, T.X. Demography and parasitic effectiveness of *Aphelinus asychis* reared from *Sitobion avenae* as a biological control agent of *Myzus persicae* reared on chili pepper and cabbage. **Biological Control**, v. 92, p.111–119, 2016.

YANAGUI, K. **Novas tecnologias, novos desafios**. São Paulo: Ciência e Cultura, v. 68, n. 3, 2016.



# Melhoramento de plantas no contexto de estresses bióticos e abióticos

*Sophia Mangussi Franchi Dutra, Camila Baptista do Amaral, Rodolfo Buzinaro, Flávia Alves Marques da Silva, Marcela Bonafin Marconato e Gustavo Vitti Môro*

## 1 Introdução

Estima-se que mais da metade das lavouras no mundo são cultivadas sob condições edafoclimáticas tropicais e estão sujeitas à baixa fertilidade natural do solo e baixa disponibilidade de água, o que torna o aumento de produtividade um desafio a ser superado. Além disso, o modelo atual da agricultura, que inclui baixa diversidade, numerosas aplicações de defensivos e consequente surgimento de pragas resistentes, faz crescer a busca por genótipos capazes de expressar seu potencial produtivo mesmo sob condições adversas. Neste sentido, o melhoramento genético é uma das estratégias mais promissoras, por ser uma ferramenta capaz de associar ótimas características agrônômicas com resistência aos estresses bióticos e abióticos. Todavia, para que haja sucesso no melhoramento, as técnicas adequadas devem ser adotadas, e o conhecimento sobre os mecanismos que afetam a planta sob determinado estresse, é fundamental, assim como a melhor forma de imposição do estresse, e os caracteres-chave a serem considerados.

## 2 Eficiência no uso de nitrogênio

As principais atividades metabólicas nas plantas têm como precursor o nitrogênio. Ele é constituinte de ácidos nucleicos, enzimas, proteínas e claro, da clorofila, tornando-o assim o nutriente mais exigido pelas plantas. Prova disso é que a produtividade das espécies cultivadas teve um forte incremento, desde o século passado, em resposta ao au-

mento da adubação nitrogenada (HIREL et al., 2007).

Um dos principais desafios da agricultura moderna para os próximos anos é suprir as crescentes necessidades da população mundial por alimentos, garantir a segurança alimentar onde ainda haja fome e utilizar de forma mais eficiente recursos não renováveis, sendo isso realizado por meio de uma agricultura produtiva e sustentável. Para que isso seja possível, é necessário o desenvolvimento de cultivares eficientes no uso de nitrogênio (EUN) (FRITSCHÉ-NETO; BOREM, 2011).

A EUN é obtida pela divisão entre os valores mensurados da característica pela quantidade de nitrogênio disponível no solo (MOLL et al., 1982). Ainda, segundo esses autores a EUN pode ser dividida em dois componentes: 1. a eficiência de absorção de nitrogênio, a qual é mensurada pela divisão entre a quantidade total de nitrogênio na planta e a quantidade de nitrogênio no solo, e 2. a eficiência na utilização de nitrogênio que é mensurado pela divisão dos valores mensurados da característica pela quantidade de nitrogênio total na planta. Assim, a EUN pode ser obtida pelo produto de seus componentes.

Para se obter êxito, o manejo do estresse é um dos pontos principais em programas de melhoramento genético para as condições do estresse abiótico de nitrogênio. Se a baixa disponibilidade de nitrogênio para a planta for acentuada, ela poderá ofuscar a variabilidade genética, tornando a seleção imparcial (FIDELIS et al., 2007).

Vários estudos reportados na literatura retratam a seleção de genótipos mais eficientes ao uso de nitrogênio, em que a maioria dos trabalhos são executados em condições de campo e, alguma vezes, em casa de vegetação, com o objetivo de simular as condições de baixa disponibilidade de nitrogênio em situações de cultivo (BANZIGER et al., 2000).

A validação de métodos de avaliação precoce ou de seleção indireta em plantas também é de grande interesse para os programas de melhoramento para condições de estresses abióticos, pois eles aceleram o processo de seleção, descartando de imediato os genótipos menos promissores (MACHADO et al., 2004). Chun et al. (2005), por exemplo, trabalharam em condições contrastantes de N e verificaram que é possível selecionar, precocemente, genótipos com alta eficiência na absorção por meio de caracteres de raiz. Para isso, o conhecimento da relação entre caracteres é de grande valia, principalmente se os ca-

racteres de interesse apresentam baixa herdabilidade e/ou, também, problemas de mensuração e de identificação (FACONER, 1981). Neste sentido, caracteres como massa da parte aérea e comprimento de raízes podem ser mensurados em qualquer estágio de desenvolvimento de forma rápida e a baixo custo. Contudo, a influência desses caracteres na eficiência nutricional ainda é muito pouco conhecida.

A avaliação de genótipos contrastantes quanto à eficiência na absorção e a eficiência na utilização de N, em alta e baixa disponibilidade, a importância relativa dos componentes da eficiência nutricional, em condições contrastantes de N, a relação do sistema radicular e da massa da parte seca com a eficiência no uso de N e seus componentes, e o controle genético dos caracteres associados à eficiência no uso de N são temas muito relevantes a serem estudados ainda.

Desse modo, é fundamental que cada programa de melhoramento de plantas estude a herança da EUN no germoplasma que possui e que pretende dar prosseguimento para trabalhar no programa de melhoramento (FRITSCHÉ-NETO; BOREM, 2011).

### **3 Eficiência de uso da água**

A escassez de água é a ameaça mais crítica para a produção de alimentos no mundo (FAROOQ et al., 2009), pois desencadeia diversas respostas fisiológicas nas plantas, que levam à diminuição da fotossíntese e conseqüente queda de produtividade. Na cultura do milho, por exemplo, após 8 dias de restrição hídrica, a entrada de dióxido de carbono nas folhas é nula (KAKANI et al., 2011). Como conseqüência da menor quantidade de água e de dióxido de carbono disponíveis, há diminuição da biomassa da parte aérea, do índice de área foliar e da eficiência de interceptação da radiação (TEIXEIRA et al., 2014), e todos esses fatores culminam em queda de produtividade.

Um dos mecanismos mais importantes no que diz respeito à adaptação ao estresse por deficiência hídrica é a eficiência de uso de água (EUA). Diferente da tolerância, que está relacionada com a capacidade da planta em resistir às condições adversas, a eficiência de uso de nitrogênio, definida por Moll et al. (1982), também pode ser aplicada à EUA.

Desta forma, os genótipos mais eficientes são aqueles que produzem maior quantidade de grãos utilizando a menor quantidade de água.

O desenvolvimento de genótipos nos programas de melhoramento depende da existência de variabilidade, que pode ser maior ou menor em função da espécie. Na cultura do milho, por exemplo, quando o assunto é EUA, existem diversos relatos na literatura sobre a existência de variabilidade genética, tanto para caracteres secundários quanto para produtividade (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2011).

Apesar de o déficit hídrico reduzir a variabilidade em produtividade, ocorre aumento em caracteres secundários, como o intervalo entre florescimento masculino e feminino (BÄZINGER, 2006), característica essa muito importante para a discriminação de genótipos eficientes no uso da água (BOLAÑOS; EDMEDS, 1996). Outros caracteres importantes avaliados no sentido de estudar a EUA dos genótipos são condutância estomática, taxa fotossintética (GILBERT et al., 2011), acúmulo de prolina (MASOUDI-SADAGHIANI et al., 2011) e caracteres do sistema radicular (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2011). Todavia, para que essas diferenças sejam observadas e possa haver seleção, é fundamental que o estresse seja imposto de maneira que possibilite avaliar seus efeitos e permita que a planta complete seu ciclo.

A imposição do estresse pode ser feita utilizando restrição de fornecimento de água ou por meio da aplicação de soluções como o polietilenoglicol (PEG), cloreto de sódio ou cloreto de cálcio. Braga et al. (2007), ao avaliarem o efeito desses três agentes osmóticos sobre sementes de pinho-cuiabano, observaram que o estresse induzido pela PEG e cloreto de cálcio foi mais prejudicial para as sementes do que o estresse induzido pelo cloreto de sódio. Desta forma, é importante determinar o melhor tipo de imposição para cada cultura e em função do estágio vegetativo da planta. Outro ponto importante é a duração e a uniformidade do estresse, que deve coincidir com os estádios críticos de desenvolvimento da planta e durar o suficiente para que seus efeitos sejam percebidos (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2011).

## 4 Resistência de plantas a doenças

Considerando uma planta (hospedeiro) que apresente resistência e um patógeno, quando é estabelecida uma relação entre ambos, o hospedeiro responde com uma reação de defesa que diminui a patogenicidade do agente causal. A resistência pode ser classificada de três formas distintas, sob a perspectiva genética, quanto à natureza e à epidemiologia.

a) Genética: a resistência pode ser monogênica ou oligogênica (um ou poucos genes) ou poligênica (muitos genes). A governada por poucos genes pode ser estudada em detalhes, com possível identificação dos genes e do grau de dominância, e as populações não segregam muito, o que permite uma clara divisão de classes, e é pouco influenciada pelo ambiente. A poligênica, entretanto, apresenta muitos segregantes, não permitindo a divisão em classes distintas. Por não ser possível a identificação do efeito individual de cada gene, considera-se o efeito do conjunto, que é muito influenciado pelo ambiente.

b) Natureza: são considerados dois mecanismos: o primeiro grupo, que atua na fase de penetração do patógeno, e o segundo, que atua no desenvolvimento do patógeno quando no interior do hospedeiro.

c) Epidemiológico: são dois tipos: a resistência vertical e a horizontal. A resistência vertical ou qualitativa é eficaz contra algumas raças de patógenos, porém confere um elevado grau de resistência e é facilmente incorporado via retrocruzamentos. A limitação é em relação à duração do hospedeiro, principalmente quanto aos patógenos com elevado potencial evolutivo, como as bactérias. Já a resistência horizontal ou quantitativa não proporciona elevados graus de resistência, no entanto proporciona proteção durável e uniformemente eficiente contra diversas raças do patógeno.

Em 1942, H. H. Flor, propôs a hipótese de gene a gene. Após intensas pesquisas realizando cruzamentos de hospedeiros (resistentes e suscetíveis), associados a diferentes raças de patógenos (virulentas e avirulentas), concluiu que há uma complementariedade entre os genes de resistência e os genes de virulência. Dessa forma, para cada gene de resistência no hospedeiro, pelo menos uma raça do patógeno possui o

alelo complementar capaz de quebrar essa resistência.

Um dos métodos mais eficientes para o controle de doenças é a incorporação da resistência a esses patógenos, mantendo as características comerciais exigidas pelo mercado. Esses são os dois pontos mais importantes que os programas de melhoramento para doenças trabalham em suas pesquisas. Logicamente, a busca do melhor método de melhoramento dependerá do sistema reprodutivo da planta, do tipo de resistência procurada, se existem ou não fontes de resistência disponíveis e se a doença-alvo causa dano suficiente para todo o investimento que um programa de melhoramento requer.

## **5 Resistência de plantas aos insetos-praga**

Resistência de plantas a insetos pode ser entendida como constituições genótípicas menos danificadas em relação a outras, estando ambas as plantas sob mesmas condições. Três premissas básicas regem o conceito de resistência de plantas:

- a) Relatividade: o grau de resistência de uma planta é relativo, e para medi-lo é preciso realizar uma comparação entre os genótipos. Um genótipo considerado imune é aquele cuja resposta da planta é não sofrer qualquer dano; se o dano for pequeno em relação ao dano médio sofrido na população, há alta resistência; se for um pouco menor, tem-se moderada resistência; e danos semelhantes ao dano médio da população indicam suscetibilidade, sendo danos superiores ao dano médio populacional equivalente ao grau de alta suscetibilidade.
- b) Hereditariedade: a resistência de um genótipo é passada para as progênes, e estas devem manter o mesmo comportamento dos parentais, quando testadas em iguais condições às quais estes foram submetidos.
- c) Especificidade: o genótipo pode ser resistente a um inseto-praga e não a outro, assim este é menos danificado pelo inseto-praga, mas não menos atacado.

A resistência a artrópodes é categorizada em não preferência (ou antixenose), antibiose e tolerância. A não preferência está relacionada

a genótipos menos utilizados pelo inseto para alimentação, oviposição e abrigo, e o termo antixenose remete a fatores morfológicos ou químicos da planta, que alteram o comportamento do inseto e resultam na seleção de hospedeiros alternativos. A antibiose aborda um efeito negativo, causado pela planta na biologia do inseto, podendo ser este efeito suave ou letal. A tolerância é definida como a habilidade da planta em suportar ou recuperar-se do dano causado pelo inseto, sendo a única categoria que envolve apenas características da planta e não da relação planta-inseto.

Os programas de melhoramento, visando à resistência de plantas a insetos, consideram herança do caráter envolvido e do sistema reprodutivo da espécie, para escolher os métodos mais adequados à condução do programa. Na literatura, os métodos de incorporação de genes mais utilizados são seleção massal, método genealógico, SSD (Single Seed Descendent), retrocruzamentos e seleção recorrente, sendo todos viáveis para as espécies autógamas e as seleções massal e recorrente mais usuais para as alógamas. Em complementação aos programas de melhoramento convencional, o uso da biotecnologia proporcionou avanços significativos para a resistência de plantas a insetos. A engenharia genética permite isolar genes e introduzi-los nas cultivares, sem transferência de grande parte do genoma, como ocorre no melhoramento. Os genes de resistência que expressam as proteínas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), são um exemplo da adoção desta tecnologia.

## **6 Métodos de Melhoramento de Plantas voltados para Estresses Abióticos e Bióticos**

Os métodos são escolhidos de acordo com o sistema reprodutivo da espécie, com o tipo de cultivar que se deseja obter, com a herdabilidade e com o controle genético dos caracteres mais importantes.

Para cada cultura, o objetivo pode ser o desenvolvimento de linhagens puras, de híbridos, de cultivares de polinização aberta ou de clones. Essa distinção de tipo de cultivar a ser obtido, associada a controle genético do caráter que está sendo melhorado, determinará a

melhor estratégia a ser utilizada para a obtenção e a seleção do material melhorado. Além disso, se houver efeito materno significativo, haverá diferença na escolha de qual será o genitor feminino em determinado cruzamento.

Em geral, quando o controle genético for de efeito aditivo, podem-se utilizar métodos intrapopulacionais de seleção recorrente. Já quando existe efeito de heterose, os métodos interpopulacionais são mais adequados e rápidos para obtenção de cultivares superiores.

1.1 Métodos de Melhoramento de Plantas para Estresses Abióticos  
Seguem alguns exemplos específicos:

1.1.1 Melhoramento para eficiência no uso do fósforo

Destacam-se os métodos para condução das populações segregantes e para obtenção de cultivares superiores: Genealógico, *Bulk* segregante, SSD (*Single Seed Descendent*) e suas variações, Seleção Recorrente, utilização de haploidia e duplicação cromossômica.

Para as culturas em que a utilização comercial de híbridos é viável, a exploração da heterose, via hibridação, é a melhor estratégia.

1.1.2 Melhoramento para tolerância à salinidade

Progresso no desenvolvimento de cultivares tolerantes por meio do melhoramento convencional (ASHRAF et al., 2008).

1.1.3 Melhoramento para tolerância ao alumínio

Hibridação em alogamas e autógamas. Seleção Recorrente para o melhoramento de populações.

Em autógamas, se a característica tem predomínio de efeitos genéticos não aditivos, são adequados métodos como o de descendência de uma única semente (*Single Seed Descent*) e o Genealógico. Se a seleção for feita em fases iniciais para características que apresentem efeitos aditivos predominantes, o método da população dentro de famílias é adequado.

1.1.4 Melhoramento para espécies perenes

A hibridação é a estratégia para melhoramento em eucalipto mais promissora.

Obtidas combinações híbridas favoráveis, os indivíduos superiores podem ser multiplicados via propagação vegetativa.

1.2 Métodos de Melhoramento de Plantas para Estresses Bióticos  
Seguem alguns exemplos específicos:

### 1.2.1 Melhoramento para Resistência a Oomicetos

Melhor estratégia de melhoramento para resistência durável é combinar novos genes *R* com os níveis altos de resistência de campo, que podem ser realisticamente esperados na prática (SOLOMON-BLACKBURN et al., 2007).

Piramidação em clones e cultivares adaptados de resistência genética diversa, oriunda de *Solunum* silvestre em clones e cultivares adaptados. Piramidar genes de diferentes fontes pode construir resistência de maior nível e mais durável à requeima (TAN et al., 2010).

### 1.2.2 Melhoramento para Resistência a Doenças Virais

Os métodos de melhoramento utilizados para a resistência a vírus baseiam-se na seleção pelo comportamento individual (ex.: Seleção Massal, Massal Estratificada, Retrocruzamento), de modo direto (resistente ou suscetível) e, quando possível, realizado em estádios precoces, visando a acelerar os ganhos com a seleção.

### 1.2.3 Melhoramento para Resistência aos Insetos-Praga e Insetos-Praga de Grãos Armazenados

Autógamas: Seleção Massal (seleção individual de plantas resistentes em cada geração), Método Genealógico, Método Populacional (incorporação de genes de resistência), Descendência de Semente Única, Retrocruzamento (forma rápida de incorporar a resistência vertical a artrópodes em cultivares) e Seleção Recorrente (aumenta a frequência de alelos de resistência de artrópodes em diferentes culturas).

Alógamas: Seleção Massal e Seleção Recorrente.

## 7 Referências Bibliográficas

ASHRAF, M.; ATHAR, H.R.; HARRIS, P.J.C.; KWON, T.R. 2008. Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. **Advances in Agronomy** 97, p. 45-110.

BÄNZIGER, M.; EDMÉADES, G.O.; BECK, D.; BELLON, M. 2000. **Breeding for drought and nitrogen stress tolerance in maize**: from the theory to practice. Mexico-DF. CIMMYT. 68 p.

BOBROWSKI, V.L.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTI-

NI, M. H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.843-850, 2003.

BOLAÑOS, J.; EDMEADES, G. O. The importance of the anthesis-silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize. **Field Crops Research**, v. 48, n. 1, p. 65-80, 1996.

BRAGA, L. F. et al. Germinação de sementes de pinho-cuiabano sob deficiência hídrica com diferentes agentes osmóticos. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, p. 157-163, 2008.

BUENO, L. C. S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. **Melhoramento genético de plantas: princípios e procedimentos**. Lavras: UFLA, 2006, 319p.

CHUN, L.; MI, G.; LI, J.; CHEN, F.; ZHANG, F. 2005. Genetic analyses of maize root characteristics in response to low nitrogen stress. **Plant and Soil** 276, p. 368-382.

FALCONER, D.S. 1981. **Introduction to quantitative genetics**. 2. ed. Longmans Green, London/New York. 279p.

FAROOQ, M. et al. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. In: **Sustainable agriculture**. Springer Netherlands, 2009. p. 153-188.

FIDELIS, R.R.; MIRANDA, G.V.; SANTOS, I.C.; GALVÃO, J.C.C.; PELUZIO, J.M.; LIMA, S.O. 2007. Fontes de germoplasma de milho para estresse de baixo nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 3; p. 147-153.

FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. Melhoramento de plantas para condições de estresse abiótico – Visconde do Rio Branco: **Suprema**, 2011. 250p.: 22cm.

FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. Melhoramento de plantas para condições de estresses bióticos. Visconde do Rio Branco: **Suprema**, 2012. 240p.

GILBERT, M. E. et al. Independent variation in photosynthetic capacity and stomatal conductance leads to differences in intrinsic water use efficiency in 11 soybean genotypes before and during mild drought. **Journal of Experimental Botany**, p. 461, 2011.

HIREL, B.; LE GOUIS, J.; GALLAIS, A. 2007. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. **Journal of Experimental Botany** 58, p. 2.369-2.387.

KAKANI, V.G. et al. Leaf photosynthesis and carbohydrates of CO<sub>2</sub>-enriched maize and grain sorghum exposed to a short period of soil water deficit

during vegetative development. **Journal of Plant Physiology**, v.168, p.2.169-2.176, 2011.

KIMATI, H. L.A.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3.ed. Editora Ceres. 774 p. 1997.

LARA, F. M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. São Paulo: Icone, 1991. 336p.

MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A.T.; FURLANI, A.M.C. 2004. Variação intrapopulacional em milho para características relacionadas com a eficiência de absorção e utilização de fósforo. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo** 3, p. 77-91.

MASOUDI-SADAGHIANI, F. et al. Response of proline, soluble sugars, photosynthetic pigments and antioxidant enzymes in potato (*Solanum tuberosum* L.) to different irrigation regimes in greenhouse condition. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 1, p. 55, 2011.

MOLL, R. H.; KAMPRATH, E. J.; JACKSON, W. A. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. **Agro-nomy Journal**, v. 74, n. 03, p. 562-564, 1982.

SINGH, DHAN PAL. **Breeding for Resistance to Diseases and Insects**. Springer Berlin Heidelberg, 1986. 222p.

SOLOMON-BLACKBURN, R.M.; STEWART, H.E.; BRADSHAW, J.E. 2007. Distinguishing major-gene from field resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) of potato (*Solanum tuberosum*) and selecting for high levels of field resistance. **Theoretical and Applied Genetics** 115, p. 141-149.

TAN, M.Y.A.; HUTTEN, R.C.B.; VISSER, R.G.F.; VAN ECK, H.J. 2010. The effect of pyramiding *Phytophthora infestans* resistance genes  $R_{Pi-mcd1}$  and  $R_{Pi-ber}$  in potato. **Theoretical and Applied Genetics** 121, p. 117-125.

TEIXEIRA, E. et al. The impact of water and nitrogen limitation on maize biomass and resource-use efficiencies for radiation, water and nitrogen. **Field Crops Research**, v.168, p.109–118, 2014.



# Extração, manipulação e aplicações do RNA total de plantas e bactérias

*Juliana da Silva Vantini, Amanda Carolina Paulino de Oliveira,  
Ana Carolina Buzinari da Silva, Catarina Madergan, Michelle  
Mendonça Pena, Maria Inês Tiraboschi Ferro*

## 1 Introdução

A descoberta da molécula de DNA, de sua estrutura e função no armazenamento da informação genética foi de suma importância para desvendar como esta informação era transmitida até os ribossomos (no citoplasma) para a síntese proteica. Em 1961, essa molécula e os processos relacionados a ela foram descritos, sendo nomeada de RNA mensageiro a molécula portadora da informação genética (BRENNER; JACOB; MESELSON, 1961).

Sendo assim, a molécula de RNA é formada por uma longa cadeia não ramificada contendo quatro diferentes tipos de nucleotídeos unidos entre si por uma ligação fosfodiéster. A quantidade das bases púricas (Adenina e Guanina) e pirimídicas (Citosina e Uracila) não é complementar como ocorre no DNA, já que a molécula é de fita única. A molécula de RNA é muito instável, e isto ocorre devido à presença do grupamento hidroxil no carbono 2 da pentose. Devido a esta instabilidade, é facilmente clivada em mononucleotídeos quando em contato com soluções alcalinas, em condições de temperaturas acima de 65°C, como também pela ação das ribonucleases ou RNases (NELSON; COX, 2014).

Há quatro principais moléculas de RNA: RNA mensageiro (mRNA), RNA ribossômico (rRNA), RNA transportador (tRNA) e microRNA (miRNA). Cada uma dessas moléculas desempenha uma função específica: o mRNA é responsável por transmitir a informação genética do DNA presente no núcleo até o citoplasma, em forma de códon, direcionando a síntese proteica: os rRNAs são transportados para o citoplasma após se acumularem no nucléolo e associam-se com proteínas ribossômicas; os tRNAs, componentes essenciais na tradução, são

moléculas adaptadoras da síntese proteica, ligam-se covalentemente a aminoácidos em uma extremidade, pareando com um mRNA de forma a unir os aminoácidos, formando um polipeptídeo crescente na sequência correta; os miRNAs, por sua vez, são RNAs não codificantes com cerca de 22 nucleotídeos, complementares a determinadas regiões de mRNAs que estão envolvidos na regulação gênica pela clivagem do mRNA ou suprimindo sua tradução (NELSON; COX, 2014).

Em grande parte dos organismos, os RNAs presentes nas células são sintetizados ou transcritos a partir de uma fita molde de DNA e o produto será um RNA de fita simples. Diferentemente do processo de replicação, a transcrição não é feita ao longo de toda molécula de DNA, mas, sim, em genes individuais ou grupos de genes específicos. Na transcrição, a enzima RNA polimerase liga-se ao sítio promotor da molécula de DNA, local onde se inicia a síntese, e caminha pela região a ser transcrita até o ponto de terminação (NELSON; COX, 2014).

Em procariotos, a molécula de RNA, transcrita a partir de um gene, constitui-se no RNA propriamente dito, sendo posteriormente utilizada na síntese de proteínas e, em seguida, degradada. Entretanto, em eucariotos, o processo é muito mais complexo, já que o RNA sofre uma série de modificações antes de ser utilizado como mediador na síntese de proteínas (NELSON; COX, 2014).

A molécula de RNA tem-se tornado alvo de estudos cada vez mais frequentes e promissores no meio científico. Suas aplicações são diversas, como, por exemplo, na área agrícola e biológica, pode ser aplicada na identificação de genes candidatos para suscetibilidade e resistência às doenças, predição da função de genes e regiões regulatórias (MOCHIDA; SHINOZAKI, 2010), entre outras. Na área médica, é utilizada em tratamentos para o câncer, identificação de doenças, manipulação de fármacos, etc. Recentemente, o uso de RNA de interferência - RNAi (moléculas de RNA que atuam complementarmente a mRNAs, podendo levar ao silenciamento gênico), tem sido uma das mais novas e grandes promessas da biologia molecular, provocando verdadeira revolução na forma como é estudado o funcionamento dos genes nas células e, conseqüentemente, levando a novas perspectivas de intervenção direta na ação gênica *in vivo* (MENCK, 2010).

## 2 Manipulação do RNA

O RNA deve ser purificado de maneira eficaz, para manutenção de sua integridade e qualidade. Um dos principais fatores que influem na qualidade do RNA é a presença de grande quantidade de ribonucleases (RNases) altamente estáveis e ativas em diversos organismos, como bactérias, fungos, protozoários, plantas superiores e vertebrados (ZIMMER et al., 2009). Diferente do DNA, as RNases permanecem ativas mesmo após fervuras prolongadas ou autoclavagem, e não necessitam de íons metálicos como cofatores, como as DNases (SCHAEFER, 2006). Dessa forma, para evitar a degradação do RNA pelas RNases, são necessários alguns cuidados durante a manipulação das amostras.

O laboratório deve ser de uso exclusivo para a manipulação do RNA e deve estar sempre limpo e climatizado (16-20°C). A preparação inicial das vidrarias e dos utensílios utilizados durante a extração torna-se fundamental, para ficarem livres de RNases. As bancadas, pipetadores, entre outros materiais utilizados, também devem ser de uso exclusivo e limpos com solução de NaOH ou RNaseZap (Ambion) antes do início da extração. As ponteiras devem ser livres de RNases e, de preferência, com filtro. As vidrarias devem ser lavadas com detergente especial (Alconox a 1%), enxaguadas várias vezes em água destilada e queimadas em estufa a 180 °C, por 8 horas, enquanto os plásticos devem ser tratados com NaOH 0,5M por, no mínimo, 10 minutos ou com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a 10%) por, no mínimo, 30 minutos, enxaguando no final com água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). Recomenda-se o uso de luvas, de máscaras, bem como evitar falar durante o processo de extração (POÇAS-FONSECA, 2003; SCHAEFER, 2006).

## 3 Coleta de material e extração de RNA

Para a extração do RNA total, são necessários alguns cuidados na coleta e no processamento do material. Inicialmente, todos os materiais e utensílios a serem utilizados devem estar previamente tratados contra RNases, considerando todos os cuidados citados acima.

Após a coleta, a amostra deve ser imediatamente congelada em nitrogênio líquido antes de ser congelada a -80 °C, e mantida nessa temperatura até o momento de sua utilização. Além disso, a amostra pode ser estocada em solução estabilizadora de RNA, o RNAlater (ThermoFisher) e o RNA holder (BioAgency Biotecnologia). Outra possibilidade é o processamento destas amostras logo após a coleta (máximo uma hora após a coleta), desde que mantidas refrigeradas (MELO et al., 2010).

No mercado, existem diversos métodos para a extração do RNA, como o do Trizol® (Invitrogen) e Brazol® (LGC Biotecnologia). Além disso, a extração pode ser realizada por meio de kits comerciais: PureLink® RNA Mini Kit (Ambion); SV Wizard Isolation RNA System (Promega®); Invisorb® Spin Plant RNA Mini Kit (Invitek®); entre outros kits disponíveis comercialmente.

Os métodos de extração de RNA são baseados na lise celular (liberação dos ácidos nucleicos totais) e na proteção dos RNAs (inibidores de RNAses). Assim, a primeira etapa, na maioria dos métodos de extração de RNA após a pulverização dos tecidos em baixa temperatura, é a imediata exposição deste material a tampões de extração, que irão promover a lise celular. Esses tampões apresentam substâncias como o cloreto de lítio, que auxilia na precipitação do RNA, e o isotiocianato de guanidina, que permite a manutenção do RNA intacto nas etapas seguintes, por meio da degradação das ribonucleases endógenas (BITENCOURT et al., 2011).

Terminada a lise, a separação dos componentes celulares será realizada por centrifugação. Nesta fase, agentes como trizol, fenol, clorofórmio e álcool isoamílico causam a precipitação dos resíduos de proteínas pré-quebradas no primeiro passo, além de outros resíduos celulares, deixando o RNA livre no sobrenadante. Nesta fase, é importante tomar cuidado com o pH da solução de purificação, que deve estar entre 4,0 - 5,0. O sobrenadante contendo o RNA é então separado dos contaminantes.

Após, o RNA deve ser precipitado com isopropanol ou etanol. O RNA não é solúvel em álcool, portanto ele precipita na presença de alta concentração de álcool. Quando submetido à centrifugação, o ácido nucleico forma um pequeno sedimento no tubo (*pellet*), permitindo separá-lo do álcool utilizado. O *pellet* é então lavado com etanol (a 70-

80%) para remoção de sais e restos de reagentes. O RNA purificado é então ressuspensionado em água tratada com DEPC (*Diethyl Pyrocarbonate*), água ultrapura ou algum outro tampão eluente.

Em extrações com kits, após a separação em fases com fenol, o sobrenadante é colocado em uma coluna, composta por sílica, e com carga positiva. Como os ácidos nucleicos possuem carga negativa, eles ligam-se à superfície da coluna, enquanto proteínas, reagentes, lipídeos e outros contaminantes passam através de seus poros. A coluna, então, passa por um tratamento com DNase e lavagens com etanol (a 70-80%), eliminando o DNA, enquanto o RNA se mantém preso à coluna. Enfim, adiciona-se uma solução aquosa que desfaz a afinidade da sílica pelo RNA, eluindo-o.

## **4 Verificação da Concentração e Integridade de RNA**

### **4.1 Espectrofotometria e Fluorometria**

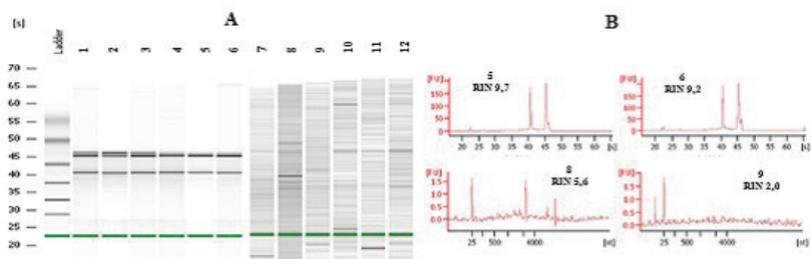
O RNA total extraído deve ser analisado em um espectrofotômetro e/ou fluorômetro para verificar sua concentração e pureza. A determinação da concentração e da contaminação do RNA pode ser realizada através da leitura da absorbância em equipamento do tipo espectrofotômetro, verificando-se os valores nos comprimentos de onda de 260 nm, 280 nm e 230 nm. De modo que, no comprimento de 260 nm, lê-se ácidos nucleicos; em 280 nm lê-se proteínas, e em 230 nm o equipamento lê contaminações por sais, polissacarídeos e compostos orgânicos (por exemplo, fenol e tiocianato de guanidina). Os valores de referência para as razões 260/280 são de 1,8 a 2,0, e para 260/230 são  $\geq 2$  (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATS, 1989).

Existem outros equipamentos mais eficientes para quantificar a amostra de RNA, o equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies) e o kit específico para quantificar RNAs (Qubit RNA Assay Kit). Este kit possui corantes fluorescentes que se ligam especificamente na molécula de RNA, e o equipamento, por sua vez, é capaz de detectar a emissão de fluorescência. Este equipamento, além de altamente preciso, permite identificar eventuais contaminações com DNA genômico e pro-

teínas quando utilizado com os respectivos kits de quantificações (Qubit dsDNA Assay Kit ou Qubit Protein Assay Kit). Contudo, a quantificação por fluorometria possui a vantagem, em relação ao espectrofotômetro, de poder quantificar os ácidos nucleicos (DNA e RNA) separadamente. Por outro lado, o método por fluoróforos não consegue estimar contaminações por compostos orgânicos na amostra, o que é possível através da espectrofotometria, sendo ambos importantes.

## 4.2 *Bioanalyzer*

Muitas técnicas moleculares necessitam da utilização de RNAs com alta qualidade. Nesses casos, a integridade do RNA (total ou mensageiro) pode ser analisada por meio da técnica de eletroforese capilar microfluídica, em plataformas de perfis de expressão gênica. Ferramentas como o equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies) são capazes de analisar RNAs, DNAs e proteínas, e estão cada vez mais apuradas, uma vez que a avaliação se torna mais precisa e utiliza-se de menor quantidade do material a ser analisado (FLEIGE et al., 2006). A integridade do RNA pode ser visualizada através de um eletroferograma gerado pelo equipamento, a avaliação tem como princípio a razão entre as subunidades ribossomais 28S e 18S para amostras provenientes de eucariotos e 23S e 16S para as provenientes de procariotos, gerando, assim, 2 picos bem definidos que devem apresentar relação de 2:1 em caso de RNAs com alta integridade. Quando as subunidades de RNA estão degradadas, os respectivos picos diminuem, e outros tendem a aparecer, correspondendo aos fragmentos de RNA gerados. Em função desta razão 2:1 (28S:18S ou 23S:16S) e dos picos referentes à degradação da amostra em comparação a um marcador molecular, o equipamento determina o número de integridade do RNA, também chamado de RIN (*RNA integrity number*), que varia de 1 a 10, sendo 10 o maior valor de integridade. Ilustração de amostras de RNA apresenta integridade e degradação (Figuras 1A e 1B).



**Figura 1.** A) Corrida de eletroforese capilar microfluídica no equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer*. Ladder corresponde ao marcador molecular. Colunas de 1 a 6 representam as amostras de RNA íntegras, e as colunas de 7 a 12 correspondem a amostras de RNA degradadas. B) Eletroferogramas gerados pelo *Agilent 2100 Bioanalyzer* e os respectivos valores de RIN obtidos. Amostras 5 e 6 representam amostras íntegras, e as amostras 8 e 9, degradadas.

## 5 Aplicações da Molécula de RNA

### 5.1 Northern blot

A técnica de *Northern blot* é simples, de baixo custo e muito eficiente para estudar e quantificar a expressão gênica de um determinado organismo em uma situação qualquer. Esta técnica recebeu este nome devido à similaridade de seu procedimento com o *Southern blot*, descrito por Edwin Southern. A diferença-chave entre elas é o tipo de ácido nucleico estudado, já que no *Southern blot* utiliza-se o DNA, e no *Northern blot*, o RNA total.

O *Northern blot* baseia-se na separação das moléculas de RNA por peso molecular através de uma electroforese com adição de formaldeído no gel de agarose (desnaturante para a molécula de RNA). O RNA do gel é transferido para uma membrana de náilon (Hybond H+), por capilaridade, para que o mesmo fique fixo permanentemente, e a detecção da molécula de RNA mensageiro de interesse é realizada pela hibridação por complementariedade total ou parcial de uma sonda específica (DNA ou RNA). A sonda geralmente é marcada com átomos

radioativos; neste caso, utiliza-se de uma autorradiografia em filme de raios-x, e a mesma deve ser mantida em freezer a -80 °C, por aproximadamente uma semana. Caso não ocorra a hibridação por não existir a sequência de RNA mensageiro de interesse na amostra em estudo, apenas o marcador molecular emitirá o sinal. Para maiores detalhes consultar Vantini et al. (2008) e Sambrook et al. (1989).

## 5.2 PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)

A RT-qPCR é muito utilizada para a análise quantitativa da expressão gênica, além de oferecer dados rápidos e reprodutíveis (STOLF, 2007). Esta técnica possibilita o acompanhamento da amplificação dos genes durante todo o progresso, em vez de serem observados apenas no final da reação, como ocorre na PCR convencional. O produto de PCR é detectado pela emissão de fluorescência (APPLIED BIOSYSTEMS, 2012).

Para que a mesma seja realizada, as moléculas de RNAs totais, extraídas do organismo (e/ou do tecido e/ou da célula) de interesse, devem ser transcritas em DNA complementar através da síntese da primeira fita de cDNA (molécula mais estável). Outras técnicas moleculares que avaliam a expressão gênica também utilizam o cDNA como *template*, como, por exemplo, as técnicas de cDNA-AFLP, macroarranjo, microarranjo, biblioteca subtrativa, SAGE, RNASeq, etc.

### 5.2.1 Síntese da Primeira Fita de cDNA

A síntese da primeira fita do DNA complementar (cDNA) é realizada após a obtenção do RNA total de boa qualidade (concentração e integridade). Para isto, torna-se necessário o uso da enzima *transcriptase reversa* (DNA polimerase dependente de RNA). Este processo de polimerização de moléculas de DNA, a partir de moléculas de RNA, foi verificado primeiramente em vírus (*in vivo*). O isolamento desta enzima possibilitou a síntese *in vitro* de DNA (complementar), usando-se o RNA como molde.

No comércio, existem vários kits que promovem a síntese da primeira fita de cDNA. Esses kits possuem todos os componentes necessários para que a síntese ocorra corretamente, tais como: a enzima *transcrip-*

*tase reversa*, dNTPs, tampão, inibidor de ribonuclease, primers (oligo d(T) e *random hexamers*) e o corante fluorescente que se liga ao DNA. Em geral, a *transcriptase reversa* opera em temperaturas que variam de 42°C a 60°C, e é capaz de sintetizar cDNA a partir de RNA total ou RNA mensageiro [neste caso, captura-se os RNAm que possuem cauda poli A, através de oligos d(T)]. Após a extração do cDNA de fita simples, o mesmo deve ser estocado a -20°C até o momento de uso na reação da qRT-PCR.

### 5.2.2 qRT-PCR

Na biologia molecular, a PCR Quantitativo em Tempo Real originou-se a partir da tradicional técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou Reação em Cadeia da Polimerase). Na qRT-PCR, os produtos amplificados (*amplicons*) da sequência de interesse são monitorados em tempo real. A quantificação dos produtos é determinada durante cada ciclo (*cycle threshold* = CT), na fase exponencial da reação, através da fluorescência emitida, sendo que este sinal de fluorescência está diretamente relacionado com a quantidade de *amplicons* gerados (WONG; MEDRANO, 2005). A emissão da fluorescência dá-se através do fluoróforo intercalante da dupla fita de DNA ou de uma sonda que possui em uma extremidade um fluoróforo e na outra extremidade outra molécula que aceita a energia do fluoróforo. Esta metodologia utiliza um equipamento com sistema de monitoramento da emissão da fluorescência.

A quantificação desta técnica pode ser de duas maneiras: quantificação absoluta e quantificação relativa. No ensaio de quantificação absoluta, é possível obter-se o número de cópias do transcrito de interesse através da comparação de uma curva-padrão que é construída a partir de quantidades conhecidas (número de cópias) e diluídas em série. Este ensaio permite saber o número de cópias do RNA de interesse em uma determinada amostra biológica. Já que na quantificação relativa, a expressão de um gene de interesse em uma determinada amostra (chamada de experimental) é verificada comparando-se com a expressão do mesmo gene, em outra amostra (chamada de controle ou calibradora). Dessa forma, torna-se possível verificar o aumento

ou a diminuição da expressão de genes da situação experimental em relação ao controle. E por fim, faz-se necessário comparar esses valores obtidos com os resultados de expressão de genes de referência nas mesmas amostras. Os genes de referência, também conhecidos como endógenos ou genes constitutivos, são aqueles genes que não devem variar ou variar muito pouco sua expressão, independentemente da situação em que se encontra (se controle ou experimental). Esta comparação entre a expressão de genes de referência com os genes de interesse é um procedimento importante, pois controla as possíveis variáveis experimentais (LIFE TECHNOLOGIES, 2012).

O sucesso no experimento de qRT-PCR deve-se ao planejamento e ao delineado inicial. Feito isso, a realização das várias etapas que são necessárias para o experimento (purificação dos ácidos nucleicos, transcrição reversa, desenho de *primers*, titulação dos *primers*, controle da reação, normalização, curva-padrão e eficiência da amplificação, sensibilidade da técnica e reprodutibilidade) promovem a otimização e a precisão da técnica, bem como a normalização dos dados. Para maiores detalhes dessas etapas, utilize o “Real Time Handbook” (Life Technologies).

### 5.3 Sequenciamento de Nova Geração

As tecnologias de sequenciamento de nova geração, implantadas desde 2005, estão permitindo o sequenciamento de DNA e/ou cDNA (RNA) em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida. São plataformas que geram um poder de informação muitas vezes maior que o sequenciamento de Sanger, com diminuição nos custos e no tempo de trabalho laboratorial, devido ao uso da clonagem *in vitro* e de sistemas de suporte sólido para as unidades de sequenciamento. Ademais, estas técnicas não estão limitadas à detecção de transcritos que correspondam a sequências genômicas existentes. Dentre estas vantagens, o RNA-Seq requer menos amostra de RNA por não necessitar de passos de clonagem (WANG et al., 2008).

O processo de sequenciamento ocorre em diversas etapas: primeiramente, há a divisão da superfície de clonagem (*flow cells*) em oito linhas, que podem ser utilizadas para o sequenciamento. Adaptadores

são fixados à superfície da *flow cells* pela extremidade 5', enquanto a extremidade 3' fica livre para servir na iniciação da reação de sequenciamento dos fragmentos, imobilizados no suporte por hibridização. Os fragmentos de cDNA da amostra também permanecem ligados aos adaptadores, em ambas as extremidades, estando então fixados ao suporte de sequenciamento por hibridização. Durante o primeiro ciclo de amplificação, são fornecidos nucleotídeos não marcados para a síntese da segunda fita do fragmento imobilizado no suporte. A alta densidade dos adaptadores no suporte facilita a hibridização do adaptador livre dos fragmentos, que estão imobilizados à sua sequência complementar fixa, próxima ao clone inicial durante o ciclo de anelamento. Após o ciclo de anelamento, o fragmento forma uma estrutura em “ponte” na superfície de sequenciamento, e a extensão ocorre, formando a fita complementar, também em “ponte”.

Na etapa de desnaturação, as fitas são separadas e linearizadas. Os ciclos são repetidos 35 vezes, e cerca de mil cópias de cada fragmento são geradas nessa PCR de fase sólida, e como permanecem próximas umas das outras, formam um “cluster” de sequenciamento (CARVALHO; SILVA, 2010). As etapas de desnaturação são necessárias para a separação dos duplex formados e, nos próximos ciclos de amplificação, nucleotídeos terminadores marcados são fornecidos para as reações de sequenciamento que ocorrem dentro de cada “cluster” (BELESINI, 2015). A alta densidade dos clusters de sequenciamento possibilita que o sinal de fluorescência gerado com a incorporação de cada um dos nucleotídeos terminadores tenha uma intensidade suficiente para garantir sua detecção exata. Até 50 milhões de clusters podem ser produzidos por linha, correspondendo a uma representação satisfatória da biblioteca. Após a incorporação de cada nucleotídeo no fragmento em síntese, ocorre a leitura pela emissão do sinal de fluorescência. Seguida de uma etapa de lavagem para remoção de reagentes em excesso e remoção do terminal 3' bloqueado e do fluoróforo do nucleotídeo incorporado no ciclo anterior para que a reação de sequenciamento prossiga. A leitura das bases é feita pela análise sequencial das imagens capturadas em cada ciclo de sequenciamento (BELESINI, 2015; SHENDURE; JI, 2008).

## 6 Referências Bibliográficas

APPLIED BIOSYSTEMS. Manuals & Protocols. Disponível em: <<http://www.lifetechnologies.com/global/en/website-overview/ab-welcome.html>>. Acesso em: 28 fev. 2012.

BELESINI, A.A. Análise do transcriptoma de folhas de cana-de-açúcar submetidas a prolongada limitação hídrica usando RNA-Seq. 2015. 124p. Dissertação (**Mestrado** em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal-SP.

BITENCOURT, G.A.; CHIARI, L.; VALLE, C.B.; LAURA, V.A.; MORO, J.R. Avaliação de diferentes métodos para extração de RNA total de folhas e raízes de braquiária. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** – EMBRAPA Gado de Corte, 2011, 22p.

BRENNER, S.; JACOB, F.; MESELSON, M. An Unstable Intermediate Carrying Information from Genes to Ribosomes for Protein Synthesis. **Nature**, 190, p. 576-581, 1961.

CARVALHO, M.C.C.G.; SILVA, D.C.G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v.40, p.735-744, 2010.

FLEIGE, S.; WALF, V.; HUCH, S.; PRGOMET, C.; SEHM, J.; PFAFFL, M. W. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. **Biotechnology letters**, v.28, n.19, p.1.601-1.613, 2006.

LIFE TECHNOLOGIES. **Real Time Handbook**, Foster, 2012. Disponível em: [https://lifetech.postclickmarketing.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR\\_Handbook\\_Updat\\_e\\_FLR.pdf](https://lifetech.postclickmarketing.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR_Handbook_Updat_e_FLR.pdf). Acessado em: 13 fev. 2016.

MELO, M.R.; MARTINS, A.R.; BARBOSA, I.V.; ROMANO, P.; SHCOLNIK, W. Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 5, p. 375-381, 2010.

MENCK, C. F. M. A nova grande promessa da inovação em fármacos: RNA interferência saindo do laboratório para a clínica. **Estud. av.**, São Paulo , v. 24, n. 70, p. 99-108, 2010 . Available from <<http://www.scielo.br/scielo.php?scrip>

t=sci\_arttext&pid=S0103-40142010000300007&lng=en&nrm=iso>. Access on 12 Feb. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142010000300007>.

MOCHIDA, K.; SHINOZAKI, K. Genomics and Bioinformatics Resources for Crop Improvement. **Plant Cellular Physiology**, v.51, p.497-523, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre-RS: Editora Artmed, 6. ed., 2014.

POÇAS-FONSECA, M. J. In: AZEVEDO, M. de O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. de M. (Orgs.). **Técnicas Básicas em Biologia Molecular**. Brasília-DF: Universidade de Brasília, 2003. p. 212.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Press. 1989.

SCHAEFER, R. **Técnicas em biologia molecular**. Documentos / Embrapa Suínos e Aves, ISSN 0101-6245; 116, 24 p., Concórdia-SC, dez. 2006.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nat biotechnology**, v.26, n.10, p.1135- 1145, 2008.

STOLF, R. Identificação e análise da expressão de genes relacionados com tolerância à seca em soja através de microarranjos de DNA e PCR em tempo real. 2007. 125f. **Tese** – (Doutorado em Agronomia na área de Genética e Melhoria de Plantas) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal.

VANTINI, J. S.; FERRO, M. I. T.; FERRO, J. A.; OLIVEIRA, C. F. Expressão gênica diferencial da b-1,3-Glucanase (PR-2) nas interações compatível e incompatível entre *Xanthomonas axonopodis* e *Citrus sinensis*. **Científica**, Jaboticabal, v.36, n.2, p.139 - 147, 2008.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**. Advance Online Publication, 2008.

WONG, M.L.; MEDRANO, J. Real Time PCR for mRNA quantification. **Bio-techniques**, v. 39, p, 75-85, 2005.

ZIMMER, K.R.; BORRÉ, G.L.; TRENTIN, D.S.; WOICICKOSKI JÚNIOR, C.; FRASSON, A.P.; GRAEFF, A.A.; GOMES, P.; MACEDO, A.J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p. 123-137, 2009.



# Análises filogenéticas: conceitos e ferramentas

*Néstor Darío Franco Marulanda, Saura Rodrigues Silva, Guilherme Camara Seber, Vitor Fernandes Oliveira de Miranda*

## 1 Introdução

Após o surgimento da teoria da evolução de Darwin, a reconstrução da história da vida foi orientada à elaboração de filogenias em forma de árvores representando os padrões de especiação (SUÁREZ-DÍAZ; ANAYA-MUÑOZ, 2008; LOPEZ; BAPTESTE, 2009). E em razão das contribuições de Hennig na integração, de forma sistemática, dos conceitos e princípios analíticos, foi desenvolvida a filogenia empírica como seu subsequente aperfeiçoamento (HENNIG, 1965). Dessa forma, a filogenia pode trazer luz à história evolutiva e às relações entre indivíduos ou grupos de organismos, sejam espécies ou populações, por meio de métodos de inferência que permitem a interpretação baseada na observação de caracteres hereditários. Além da construção das árvores, a filogenia compreende o estudo dos métodos para a elaboração dos cladogramas (i.e., árvores filogenéticas) e os testes estatísticos pertinentes (SIDOW; BOWMAN, 1991).

Em meados da década de 1960, foi exposto que, além dos caracteres morfológicos, diferentes moléculas (ex. DNA, RNA e proteínas) podem apresentar informação suficiente em suas sequências para esclarecer relações filogenéticas (ZUCKERKAN; PAULING, 1965). Essas moléculas são reconhecidas como a evidência primária da evolução (DÍAZ, 2007), uma vez que cada resíduo da molécula, seja um aminoácido, seja um nucleotídeo, pode apresentar um estado de caráter diferente (SUÁREZ-DÍAZ; ANAYA-MUÑOZ, 2008) e assim trazer informação suficiente para a reconstrução de histórias evolutivas.

Atualmente, a filogenia molecular é uma atividade laboriosa e amplamente difundida pela elevada quantidade de dados de sequências de organismos e genes disponíveis (SIDOW; BOWMAN, 1991). Avanços no sequenciamento das moléculas e projetos de genomas têm acelerado

o processo de produção massiva de sequências nucleotídicas e de aminoácidos e, conseqüentemente, suas análises (SUÁREZ-DÍAZ; ANAYA-MUÑOZ, 2008). Igualmente, novos e mais sofisticados métodos têm surgido para as reconstruções filogenéticas (LOPEZ; BAPTESTE, 2009), além dos avanços tecnológicos que viabilizam as análises com computadores com maior capacidade de armazenamento e de processamento.

Outro fator importante para o sucesso da biologia molecular foi o surgimento da bioinformática. Esse campo de estudos, que associa a informática, a matemática e a biologia, possibilita, entre outras coisas, a integração e a análise de dados biológicos, a geração de bases de dados, a aplicação de estatísticas e algoritmos que permitem a obtenção de informações, previsões e resultados com significado biológico (BAJIC et al., 2003), que podem permitir vislumbrar os diferentes processos biológicos (KANEHISA; BORK, 2003). Outro avanço marcante, para a biologia molecular, para a genética e para outras ciências biológicas, foi o surgimento da *Internet*, transformando as bases de dados e o acesso a essas informações, e facilitando, entre outras coisas, o desenvolvimento de *softwares* especializados (KANEHISA; BORK, 2003).

As análises filogenéticas compreendem, basicamente, desde as fases de alinhamento das sequências homólogas, a construção das árvores por inferências filogenéticas, seguindo diferentes metodologias e critérios, podendo permitir a inclusão de modelos evolutivos *a priori*, tal como a interpretação e a representação gráfica das árvores inferidas e a edição das mesmas. Tudo isso com a assistência de uma ampla variedade de aplicativos, de métodos e de ferramentas bioinformáticas interativas disponíveis. Desta forma, neste capítulo, serão abordadas as reconstruções filogenéticas, ressaltando os tipos de alinhamento de sequências para gerar as matrizes, alguns métodos para a construção e para a edição das árvores, ilustrando os principais aspectos, conceitos e ferramentas bioinformáticas frequentemente usadas.

## **2 Procedimentos após o sequenciamento**

### **2.1 Curadoria das informações obtidas**

É de suma importância a curadoria das informações obtidas, que

pode ser feita manualmente, por meio de programas específicos que permitem observar o eletroferograma, ou cromatograma, produzido a partir do sequenciamento da região-alvo ou pelo valor Phred de uma sequência. Para a curadoria visual, pode ser utilizado o programa BioEdit (HALL, 1999) (Tabela 1), que permite observar o sinal que corresponde à base nitrogenada interpretada pelo sequenciador. É desejável que esse sinal tenha o comportamento de uma onda com amplitude, altura e frequência regulares. Contudo, é comum que o início e o final das sequências apresentem ondas irregulares, que devem ser retiradas de sua sequência antes das próximas análises. Também, quando sequenciadas regiões de difícil amplificação, ou por complicações na reação de PCR, podem ser encontradas regiões de baixa qualidade reconhecidas por picos irregulares, além da sobreposição de picos de diferentes bases nucleotídicas. Quando isso ocorre, é ainda permitido que a informação seja utilizada, corrigindo as bases ambíguas com o emprego de “máscaras” que representam uma base ou outra. Por exemplo, se o sequenciador apresentar, em determinado sítio, a dúvida entre as bases adenina ou guanina naquela posição, o pesquisador poderá empregar a máscara “R” (para mais informações, veja a tabela de máscaras encontrada no sítio <http://www.bioinformatics.org/sms/iupac.html>). Isso otimiza o processamento durante a construção das árvores evolutivas, pois, como nesse exemplo, as possibilidades de caracteres são reduzidas de quatro (A, C, G ou T) para apenas duas (A ou G).

Devido à necessidade de se trabalhar com milhares de sequências, a curadoria manual tornou-se inviável, portanto foi criado um critério de qualidade chamado Phred. No caso da análise de sequências provenientes de sequenciamento pelo método Sanger (SANGER et al., 1977), é um valor dado com base principalmente nos mesmos critérios citados acima. Um valor de qualidade Phred adequado é sempre acima de 30, que corresponde à probabilidade de 1 em 1.000 de a base estar incorreta (EWING; GREEN, 1998). (Tabela 1).

## 2.2 Identificação e buscas de sequências por similaridade

Um dos meios mais simples de se compararem sequências é com o emprego do programa *online* BLAST (*Basic Local Alignment Search*

*Tool*; ALTSCHUL et al., 1990). (Tabela 1) O BLAST pode ser utilizado localmente no próprio computador pessoal, ou *online* pela plataforma do NCBI/GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Das coisas mais importantes para se observar em um alinhamento com o blast entre duas sequências, é seu *e-value* (*expectation value*), o *query coverage* (cobertura de sequência em relação à sequência comparada) e a *identity* (identidade de uma sequência). O *e-value* é o número esperado de correspondências ao acaso com score similar obtidas a partir de um banco de dados de mesmo tamanho. Quanto menor o *e-value*, mais indica que está longe de ser uma correspondência ao acaso. O *query coverage* é importante, dado que o alinhamento por Blast é um alinhamento do tipo “Local”, ou seja, um alinhamento que é feito por comparação de pequenas regiões de sua sequência em relação à sequência do banco de dados. A identidade também deve ser levada em consideração, dado que é desejável que a grande parte das bases comparadas seja igual ou similar.

### 2.3 Alinhamento de sequências

Uma das primeiras e mais importantes etapas na reconstrução da história filogenética de um grupo dá-se a partir da premissa de homologia entre os caracteres comparados. De acordo com esse princípio, fundamental para a comparação evolutiva de caracteres, estes devem ter apresentado ancestral comum para serem comparáveis. E para isso, quando tratamos de sequências de natureza molecular, é necessário fazer um alinhamento de sequências, dado que cada nucleotídeo ou aminoácido precisa estar em posição correspondente com seu homólogo.

Comumente, são feitos dois tipos de alinhamento: os alinhamentos globais (*global alignments*) e os alinhamentos locais (*local alignments*). Os globais buscam o melhor alinhamento em toda a extensão de sequências comparadas; já o local faz o alinhamento por pequenas regiões de alta similaridade. Para se calcular qual o melhor alinhamento entre as várias possibilidades que um conjunto de dados pode dar, foi estabelecido um valor chamado de *score*, que é calculado por peso dado para os valores de comparação entre bases iguais (*matches*), bases desiguais (*mismatches*) e espaçamentos (*gaps*). Um exemplo de peso

bem simples dado para essa medida pode ser +1 para *match*, -1 para *mismatch* e -2 para *gap*, dado que, em sequências similares, é mais provável ter uma deleção/inserção (representada pelo *gap* no alinhamento) do que *match* ou *mismatch*. À medida que a ciência e os métodos foram desenvolvendo-se, foi atribuindo ao *score* mais e mais variáveis, considerando casos e características particulares entre sequências.

Exemplos de alinhamento global é o alinhamento feito com o programa ClustalW (THOMPSON, 1994) (Tabela 1), que usa o algoritmo de Needleman-Wunsch (NEEDLEMAN; WUNSCH, 1970). O algoritmo-base usado para alinhamentos locais é o Smith-Waterman (SMITH; WATERMAN, 1981), que é um Needleman-Wunsch modificado, o qual usa o mesmo critério de *score*, mas considera os alinhamentos de regiões dentro de sequências, ou seja, compara todos os segmentos de sequências de todos os tamanhos possíveis entre duas sequências para identificar o melhor alinhamento num determinado local da sequência. Um exemplo de uso importante do alinhamento local é o de proteínas, que pode apresentar comportamento modular, ou seja, pode ter domínios conservados em regiões diferentes em sequências, portanto o alinhamento global não consegue interpretar esse tipo de comportamento, já que irá tentar alinhar a sequência como um todo, do seu início ao seu fim.

## 2.4 Construção de árvores filogenéticas

Para que as relações de ancestralidade entre determinado grupo de organismos sejam elucidadas, as reconstruções filogenéticas podem basear-se em dados morfológicos (SCOTLAND et al., 2003), moleculares (WHELAN et al., 2001) ou outras fontes, desde que os caracteres sejam herdáveis e homólogos. A raiz de uma árvore filogenética representa o ancestral comum das espécies empregadas. Os nós internos da árvore filogenética representam linhagens ancestrais hipotéticas que existiram no passado, e os terminais da árvore representam os táxons amostrados para a realização da reconstrução filogenética (HENNIG, 1965). Para que ocorra o enraizamento de uma árvore filogenética e as transformações que ocorreram ao longo da evolução de determinado grupo de espécies sejam visualizadas de forma polarizada com

a identificação de caracteres *plesiomórficos* (primitivos) e *apomórficos* (derivados), emprega-se um grupo externo ao grupo de táxons que compõe o objeto de estudo.

Matrizes de dados moleculares, expressas em alinhamentos de seqüências, podem ser utilizadas em análises que empregam uma abordagem de distância, conhecida também como de dissimilaridade. Assim, a análise pode organizar os táxons envolvidos, baseando-se na dissimilaridade (i.e., quantidade ou proporção de diferenças) entre os dados destes e compor uma árvore, agrupando os mais similares. Existem dois principais métodos que se baseiam em distância: *Neighbour-Joining* (SAITOU; NEI, 1987) e *UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)* (SOKAL; SNEATH, 1963). Como o agrupamento entre os táxons nessas análises se baseia no número ou na proporção de diferenças entre estes, diz-se que esta é uma abordagem *fenética*, pois não resgata necessariamente as relações de ancestralidade entre os organismos envolvidos. A ocorrência de homoplasias no DNA é frequente, assim como ocorre com dados morfológicos. Tem-se, portanto, que a abordagem fenética não pode ser considerada uma abordagem filogenética (PAGE; HOLMES, 1998), ou cladística, e essas diferentes escolas (Fenética e Cladística) travaram um intenso debate, principalmente entre as décadas de 1970 e 1980, em relação à abordagem mais adequada de se recuperar a história evolutiva das espécies (MAYR, 2014).

Filogenias baseadas em dados moleculares podem utilizar a parcimônia como critério de análise. Nesse caso, a partir de um alinhamento de seqüências, obtém-se a topologia mais parcimoniosa, ou seja, a que necessita de menos transformações, ou mutações, para explicar o posicionamento das espécies na árvore filogenética (HALL, 2004). No entanto, a árvore filogenética que demanda menos transformações para ser explicada nem sempre reflete a real história evolutiva de um grupo. Como exemplo, dois táxons não relacionados e que sofreram um grande número de transformações ao longo do processo evolutivo, compondo linhagens que possuem altas taxas mutacionais, podem acabar agrupando-se como num mesmo clado em filogenias que usam apenas a parcimônia como critério, um fenômeno conhecido como *atração de ramos longos* (FELSENSTEIN, 2004). Sendo assim, uma

abordagem probabilística, com o emprego de modelos evolutivos, foi defendida por Felsenstein (1981) e outros autores, principalmente a partir da década de 80. Esses modelos evolutivos, ou modelos de substituição nucleotídica, podem levar em conta a possível ocorrência de trechos que acumulam mais mutações nas sequências, a ocorrência de frequências de nucleotídeos constantes ou variáveis, a ocorrência de taxas mutacionais heterogêneas entre as espécies envolvidas na análise, dentre outros fatores.

Os modelos evolutivos também podem dar pesos diferentes a tipos de substituição distintos, como transversões ( $C \leftrightarrow A$ ,  $C \leftrightarrow G$ ,  $T \leftrightarrow A$ ,  $T \leftrightarrow G$ ) ou transições ( $A \leftrightarrow G$ ,  $C \leftrightarrow T$ ), visto que a ocorrência de uma transição é mais frequente (assim mais provável) que a de uma transversão. Existem vários modelos evolutivos disponíveis (FELSENSTEIN, 1981; JUKES; CANTOR, 1969; KIMURA, 1980), e cada conjunto de dados moleculares possui um modelo mais adequado, a depender de suas particularidades. Um programa utilizado para detectar o melhor modelo evolutivo para o seu conjunto de dados é o ModelTest (DARRIBA et al., 2012) (Tabela 1). As análises probabilísticas acabam sendo menos sensíveis a problemas causados pela atração de ramos longos (HUELSENBECK, 1997). Essas análises resultam na topologia mais provável, a partir de um alinhamento de sequências e do modelo evolutivo mais adequado, e possuem atualmente duas abordagens: máxima verossimilhança (FELSENSTEIN, 1981) e inferência bayesiana (HUELSENBECK et al., 2001). Um programa que pode ser utilizado para as análises filogenéticas de máxima verossimilhança é o RAxML (STAMATAKIS et al., 2008) (Tabela 1). Para as inferências bayesianas, é recomendado o MrBayes (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001) (Tabela 1). Outro programa muito útil, utilizado para a realização de análises filogenéticas que empregam a máxima parcimônia, a máxima verossimilhança e também a distância, é o PAUP\* (SWOFFORD, 2003) (Tabela 1).

## 2.5 Edição das árvores

Existem alguns programas que permitem a visualização em uma interface gráfica de árvores filogenéticas, obtidas por diferentes mé-

todos, permitindo a realização de edições, como o TreeGraph (STÖVER; MÜLLER, 2010) e o FigTree (RAMBAUT, 2017) (Tabela 1), que possibilitam gerar árvores para publicações e exportar os arquivos em diferentes formatos (NEXUS, PDF, JPG, TIF, dentre outros). Dentre as edições mais comuns, estão a inserção dos valores de *bootstrap* e outros indicadores de suporte de clados, assim como a edição dos nomes dos táxons, cores dos clados, mudanças no enraizamento, entre outras.

**Tabela 1.** Programas usados nas diferentes etapas das reconstruções filogenéticas

ETAPA	PROGRAMA	ENDEREÇO WEB	REFERÊNCIA
CURADURIA DA QUALIDADE DAS SEQUÊNCIAS	Bioedit	<a href="http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html">http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html</a>	HALL, 1999
	Phred	<a href="http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html">http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html</a>	EWING; GREEN, 1998
SIMILARIDADE	BLAST	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>	ALTSCHUL et al., 1990
ALINHAMENTO E EDIÇÃO MATRIZES	Bioedit-Clustal	<a href="http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html">http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html</a>	THOMPSON, 1994
MODELO EVOLUTIVO	j-Modeltest	<a href="http://jmodeltest.org/">http://jmodeltest.org/</a>	DARRIBA et al., 2012
CONSTRUÇÃO DAS ÁRVORES	Mr-Bayes	<a href="http://mrbayes.net">http://mrbayes.net</a>	HUELSENBECK; RONQUIST, 2001
	RaXmL	<a href="http://scoih-its.org/exelixis/software.html">http://scoih-its.org/exelixis/software.html</a>	STAMATAKIS et al., 2008
	PAUP	<a href="http://www.paup.scs.fsu.edu">http://www.paup.scs.fsu.edu</a>	SWOFFORD, 2003
EDIÇÃO GRÁFICA DAS ÁRVORES	Figtree	<a href="http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree">http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree</a>	RAMBAUT, 2017
	TreeGraph	<a href="http://treegraph.bioinfweb.info/">http://treegraph.bioinfweb.info/</a>	STÖVER; MÜLLER, 2010

### 3 Referências Bibliográficas

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v.215, n. 3, p. 403-410, 1990.

BAJIC, V. B.; BRUSIC, V.; LI, J.; NG, S.K.; WONG, L. From informatics to bioinformatics. In **Proceedings of the First Asia-Pacific bioinformatics conference on Bioinformatics 2003-Volume 19** (p. 3-12). Australian Computer Society, Inc, 2003.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nat Meth** v.9, p. 772–772. doi: 10.1038/nmeth.2109, 2012.

DÍAZ, E. S. The rhetoric of informational molecules: Authority and promises in the early study of molecular evolution. **Science in Context**, vol. 20, n. 04, p. 649-677, 2007.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res.** 8, p. 186–194, 1998.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, v. 17, n. 6, p. 368-376, 1981.

FELSENSTEIN, J. **Inferring Phylogenies**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 664p., 2004.

HALL, T. A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT, **Nucleic Acids Symposium Series**, Vol. 41, p. 95-98, 1999.

HALL, B. G. **Phylogenetic trees made easy: a how-to manual**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2004.

HENNIG, W. Phylogenetic systematics. **Annual review of entomology**, v. 10, n. 1, p. 97-116, 1965.

HUELSENBECK, J. P. Is the Felsenstein zone a fly trap?. **Systematic Biology**, v. 46, n. 1, p. 69-74, 1997.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, p. 754–755, 2001.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F.; NIELSEN, R.; BOLLBACK, J. P. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Science**, v. 294, n. 5.550, p. 2.310-2.314, 2001.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules. **Mammalian Protein Metabolism**, v. 3, p. 21-132, 1969.

KANEHISA, M.; BORK, P. Bioinformatics in the post-sequence era. **Nature genetics**, 33, p. 305-310, 2003.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

LOPEZ, P.; BAPTESTE, E. Molecular phylogeny: reconstructing the forest. **Comptes rendus biologies**, vol. 332, n. 2, p. 171-182, 2009.

MAYR, E. Biological classification: toward a synthesis of opposing methodologies. **Essential Readings in Evolutionary Biology**, p. 354, 2014.

NEEDLEMAN, S.B.; WUNSCH, C.D. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. **Journal of Molecular Biology**, 48, p. 443-453. doi:10.1016/0022-2836(70)90057-4, 1970.

PAGE, R. D.; HOLMES, E. Molecular evolution. **Blackwell Publishers**. 1998.

RAMBAUT, A. **FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees**. Disponível em <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>>. Acesso em: 15 mar. 2017.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SCOTLAND, R. W.; OLMSTEAD, R. G.; BENNETT, J. R. Phylogeny reconstruction: the role of morphology. **Systematic Biology**, v. 52, n. 4, p. 539-548, 2003.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5.463-5.467, 1977.

SIDOW, A.; BOWMAN, B.H. Molecular phylogeny. **Current opinion in genetics & development**, vol. 1, n. 4, p. 451-456, 1991.

SMITH, T.F.; WATERMAN, M.S. Identification of common molecular subsequences. **Journal of Molecular Biology** 147, p. 195-197. doi:10.1016/0022-

2836(81)90087-5, 1981.

SOKAL, R. R.; SNEATH, P. H. Principles of numerical taxonomy. **Principles of numerical taxonomy**, San Francisco: W.H. Freeman, 359p., 1963.

STAMATAKIS, A.; HOOVER, P.; ROUGEMONT, J. A Rapid Bootstrap Algorithm for the RAxML Web-Servers. **Systematic Biology**, v. 75, n. 5, p. 758-771, 2008.

STÖVER, B. C.; MÜLLER, K. F. TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 7, 2010.

SUÁREZ-DÍAZ, E.; ANAYA-MUÑOZ, V. H. History, objectivity, and the construction of molecular phylogenies. **Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences**, 39(4), p. 451-468, 2008.

SWOFFORD, D. **PAUP\***. **Phylogenetic analysis using parsimony** (\*and other methods). Version 10. Sinauer, Sunderland, 2003.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J.; CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res** 22, p. 4.673–4.680, 1994.

WHELAN, S.; LIÒ, P.; GOLDMAN, N. Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. **TRENDS in Genetics**, v. 17, n. 5, p. 262-272, 2001.

ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Molecules as documents of evolutionary history. **Journal of theoretical biology**, vol. 8, n. 2, p. 357-366, 1965.



# Transformação genética de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) via *Agrobacterium tumefaciens*: conceitos teóricos e práticos

*Renan Gonçalves da Silva; Renato Fernandes Galdiano Júnior;  
Renato Farinacio; Janete Aparecida Desidério; Eliana Gertrudes  
de Macedo Lemos; Sônia Marli Zingaretti*

## 1 Introdução

A transformação genética de plantas tem por base a introdução de genes nas células vegetais de maneira a manter a função e a estrutura dos componentes celulares. Esta estratégia consiste basicamente na inoculação de plantas de interesse com linhagens desarmadas de *Agrobacterium* contendo o DNA exógeno (gene de interesse) ou por meio de outros métodos, como, por exemplo, a biobalística (BRASILEIRO; ARAGÃO, 2010). Para tanto, é necessário, primeiramente, identificar e isolar o (s) gene (s) de interesse. Várias metodologias podem ser utilizadas para esse fim. As ferramentas de engenharia genética e de transformação genética de plantas são alternativas importantes para a manutenção e/ou o aumento da produtividade das culturas agrícolas diante das condições desfavoráveis às quais são submetidas, o que tem levado ao avanço do melhoramento genético de plantas.

## 2 Identificação de genes candidatos

A identificação de um gene de interesse a ser utilizado na transformação de plantas pode ser realizada por diferentes metodologias. O gene a ser inserido deve conter a sequência completa que codifica a

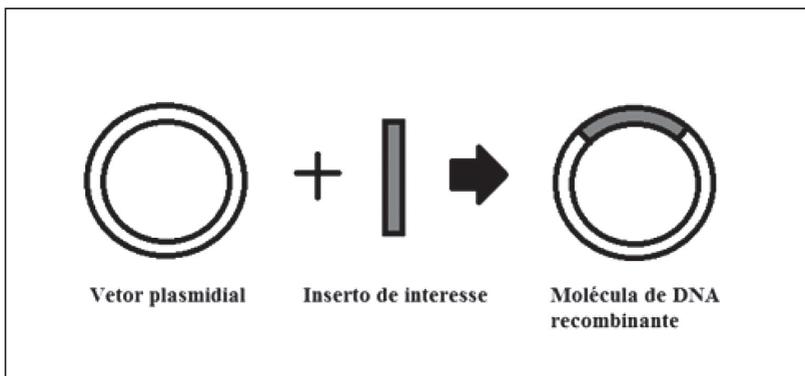
proteína desejada, o que é conseguido pelo isolamento do cDNA deste gene. O cDNA pode ser obtido pela reação de síntese de cDNA pela transcriptase reversa a partir do mRNA. Uma vez obtido o cDNA por técnicas de engenharia genética, ele deve ser transferido para o vetor de expressão, para então ser utilizado no processo de transformação. É importante lembrar que qualquer alteração na sequência pode provocar um resultado indesejado, por isso é importante certificar-se da real sequência de nucleotídeos pelo sequenciamento do cDNA clonado. Estudos de transcriptoma contribuem para a seleção de genes candidatos, e bibliotecas de cDNA são uma boa fonte destes genes. Estudos *in silico* podem ser ferramentas adicionais para a compreensão da funcionalidade de uma determinada sequência de cDNA, para o isolamento e posterior análise biológica. Para isso, utiliza-se de uma gama de ferramentas/software de bioinformática, visando a compreender a localização celular, processo biológico, função molecular, entre outras análises possíveis do gene.

Tendo identificado uma sequência gênica, a clonagem molecular (técnica do DNA recombinante) permite a obtenção de colônias bacterianas transformadas, visto que a técnica consiste em introduzir o fragmento de DNA de interesse dentro de células bacterianas (NASCI-MENTO et al., 1999). Desse modo, realiza-se a ligação deste fragmento (chamado inserto – contendo o gene de interesse), com outra molécula de DNA (o vetor) para formar a molécula de DNA recombinante, conforme esquema que se segue (BROWN, 2003).

O DNA recombinante é utilizado na etapa de transformação de células bacterianas, através das técnicas de eletroporação ou choque térmico, utilizadas para introduzir o vetor contendo o gene.

Outros procedimentos da biologia molecular são etapas experimentais importantes no processo de clonagem molecular, dentre eles: a técnica de PCR, que visa à amplificação de fragmentos de DNA; digestão com enzimas de restrição, que reconhecem sítios de restrição para isolar o inserto; extração de DNA plasmidial (*miniprep*); eletroforese em gel de agarose, para averiguar a integridade da molécula, entre outras técnicas.

Ao final da clonagem molecular, o DNA recombinante é utilizado na transformação de linhagens de *Agrobacterium sp* pelo método de eletroporação (BRASILEIRO; DUSI, 1999).



**Figura 1** -Ligação do vetor com o inserto de interesse. Adaptado de Lima (2008).

### 3 Métodos de transformação genética de plantas

Os métodos de transformação genética de plantas consistem nos procedimentos direto, em que ocorre a transferência direta de DNA exógeno no tecido-alvo, e indireto, no qual se utiliza um vetor para intermediar a transferência de DNA.

#### 3.1 Transformação indireta via *Agrobacterium*

As bactérias do gênero *Agrobacterium* são fitopatógenos com a capacidade natural de transferir DNA para algumas espécies de dicotiledôneas, induzindo a formação de um tumor conhecido como galha-da-coroa ou síndrome da raiz em cabeleira. Para haver a infecção, é preciso algum tipo de ferimento, por meio do qual a agrobactéria vai reconhecer a planta e iniciar a transferência do DNA. Fitopatologistas descobriram que, mesmo depois da desinfecção das plantas, os sintomas permaneciam, sugerindo a presença de um fator determinante nas plantas infectadas. Mais tarde, esse fator foi identificado como um fragmento de DNA oriundo da agrobactéria, denominado T-DNA ou DNA de transferência. Esse fragmento era integrado ao genoma vegetal e expressava-se de maneira estável. Assim, foi descoberto e, por

meio da manipulação genética, desenvolvido o primeiro método de transformação.

O T-DNA faz parte do DNA plasmidial da agrobactéria (denominado plasmídeo Ti = indutor de tumor) e, por meio da engenharia genética, foi possível sua manipulação para a integração de genes de interesse. Essa manipulação consiste, basicamente, na deleção dos genes que causam o tumor, ou seja, da região do T-DNA e a manutenção dos genes relacionados à transferência e à replicação do plasmídeo, isto é, à região *vir* e às extremidades do T-DNA. Com isso, produzem-se linhagens de desarmadas, ou seja, ainda virulentas, mas não mais patogênicas. Assim, genes de interesse podem ser introduzidos dentro da planta por meio da substituição à região do T-DNA original (BRASILEIRO; ARAGÃO, 2014).

Havendo interesse em ajustar a interação entre *Agrobacterium* e um hospedeiro no qual não existem descrições prévias de transferência do T-DNA, deve-se levar em consideração os fatores: a) cepa bacteriana; b) genótipo do hospedeiro e fisiologia do explante; c) condições do cocultivo; d) marcadores de seleção utilizados. Parâmetros-chave para a transferência por *Agrobacterium* incluem o genótipo da bactéria e da planta; tratamento com indutores dos genes *vir* (acetoceringona, extrato de células feridas, células alimentadoras, açúcares), pH, temperatura, concentração das células, condições de luminosidade, duração do tempo de cultivo, tipo do explante, qualidade da pré-cultura, tratamento com fitormônios (BIRCH, 1997).

No entanto, as vantagens relacionadas à habilidade natural da *Agrobacterium* em transferir sequências definidas de DNA podem ser exploradas com o intuito de desenvolver novas cultivares de plantas transgênicas. Além disso, depois da transformação e da obtenção de plantas adultas, os novos genes integrados ao genoma hospedeiro são transmitidos às progêneses seguindo uma herança mendeliana.

### **3.2 Transformação direta e os demais métodos de transformação genética de plantas**

Os demais métodos para a transformação genética de plantas são

procedimentos de transformação direta e consistem em biobalística, um dos mais utilizados, e também o polietilenoglicol (PEG), eletroporação, lipossomas, microinjeção e macroinjeção. Há ainda outras metodologias em que somente uma expressão não estável (ou transiente) dos genes introduzidos foi observada, sendo elas a laser, embebição de sementes, utilização de tubo polínico, transformação de pólen, micro-fibras, ultrassonicação e eletroforese (BRASILEIRO; DUSI, 1999).

### 3.3 Tabaco como planta-modelo para transformação

Estudos envolvendo genética molecular e transformação são preferivelmente conduzidos em sistema de planta-modelo, pois estas apresentam características favoráveis à sua utilização, como a boa adaptação à cultura de tecidos, alta suscetibilidade à infecção por *Agrobacterium* e fácil manipulação molecular (BRASILEIRO; DUSI, 1999). A ampla utilização da *Agrobacterium* no processo pode ser atribuída a fatores que a destaca em relação aos demais métodos, como a alta eficiência de transformação, o baixo custo operacional e a elevada reprodutibilidade dos protocolos de transformação e seleção (BRASILEIRO; CABRAL; SILVA, 2015).

Dentre as plantas que se enquadram nas características anteriormente citadas, encontram-se a *Nicotiana tabacum* (tabaco), *Brassica napus* (canola), *Daucus carota* (cenoura), *Populus* spp. (álamo) e *Arabidopsis thaliana*, sendo estas as principais espécies utilizadas como plantas-modelo em experimentos de transformação genética (BRASILEIRO; DUSI, 1999).

No caso do tabaco, este proporciona um dos sistemas mais facilmente empregados na transformação genética de plantas, já que apresenta alta frequência de transformação, regeneração e ciclo de vida relativamente curto. Embora tenham-se desenvolvido protocolos para inúmeras plantas de interesse comercial, a utilização de plantas-modelo continua a ser amplamente empregada em estudos de expressão de genes em plantas, em especial quando se utilizam genes isolados de plantas de ciclo de vida longo, como árvores, e genes isolados de espécies que ainda não foram desenvolvidos protocolos de regeneração eficientes (TRIGIANO; GRAY, 1999).

A seguir, serão apresentadas as principais etapas do protocolo proposto por Brasileiro, Cabral e Silva (2015) para a transformação genética do tabaco:

### **Desinfestação e micropropagação de plantas de tabaco**

Consiste na desinfestação superficial das sementes de tabaco que pode ser realizada com solução de hipoclorito. Posteriormente, as sementes desinfestadas são inoculadas em meio MS sólido (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Após as plantas atingirem aproximadamente 7 cm, faz-se o corte do caule em segmentos nodais, para sua multiplicação, e inocula-os em novos frascos contendo meio MS sólido. Com estes sucessivos subcultivos, obtém-se elevado número de plantas para as posteriores etapas.

### **Cultivo da *Agrobacterium***

Cultiva-se a linhagem de *Agrobacterium* que será utilizada na transformação, podendo seu cultivo ser realizado em meio LB (BERTANI, 1951), até atingir entre 0,7 e 1,0 na absorbância de 600 nm, que representa a fase exponencial de crescimento.

### **Infecção dos fragmentos foliares**

Coletam-se as folhas das plantas de tabaco micropropagadas *in vitro* e corta-se em pequenos quadrados, mantendo-os em solução MS líquido até que todos os fragmentos estejam cortados.

Para a infecção, transferem-se os fragmentos foliares para placa de petri contendo a suspensão bacteriana anteriormente cultivada, mantendo-os imersos por 20 minutos no escuro; posteriormente, são transferidos para placa de petri contendo MS sólido acrescido de BAP (1 mg/L) (6-benzilaminopurina, para indução de brotos), e incubados por 48 horas.

Após este período, os explantes são transferidos para placa de petri contendo MS sólido acrescido de BAP (1 mg/L), cefotaxima (500 mg/L) (para eliminar o *Agrobacterium*) e agente de seleção apropriado (selecionar células transformadas).

### **Obtenção de brotos transgênicos**

Após duas semanas de incubação, cortam-se os fragmentos foliares para separar os calos formados, transferindo-nos para novo meio MS só-

lido, contendo BAP (1 mg/L), cefotaxima (250 mg/L) e agente de seleção apropriado.

Ao surgirem os brotos nos calos resistentes, estes são excisados para novo meio MS sólido acrescido de cefotaxima (250 mg/L) e agente de seleção apropriado.

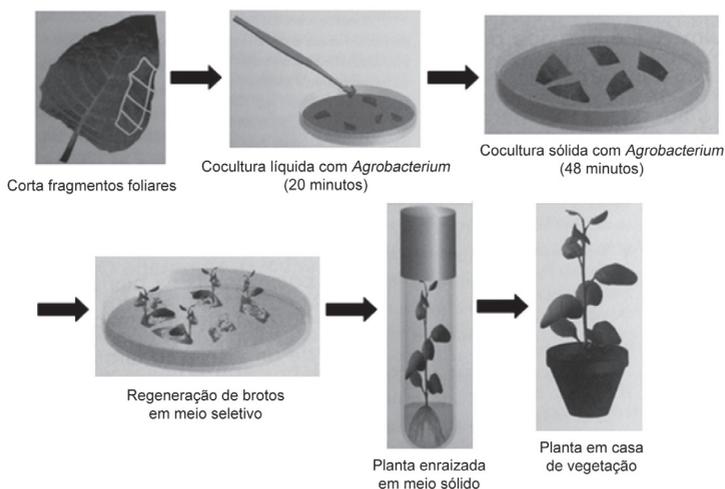
Recomenda-se que após a regeneração das plantas potencialmente transgênicas, por segurança, faça-se o subcultivo de segmentos nodais, como descrito anteriormente, para obter-se várias cópias de um mesmo evento.

### Transferência para casa de vegetação

Retiram-se as plântulas enraizadas dos frascos e transfere-as para copos plásticos contendo substrato apropriado ao desenvolvimento destas, mantendo as plantas em câmara úmida durante a primeira semana.

### Confirmação da inserção do DNA no genoma das plantas

Após o estabelecimento das plantas, pode-se proceder à coleta de folhas para se determinar a integração do T-DNA no genoma destas, por meio de técnicas como: PCR, eletroforese, Southern blot, entre outras.



**Figura 2** - Principais etapas no processo de transformação genética de tabaco por *Agrobacterium*. Adaptado de Brasileiro, Cabral e Silva (2015).

O sistema de transformação via *Agrobacterium* é amplamente utilizado em plantas-modelo; no entanto, sua utilização não se restringe a estas. Em diversas culturas de interesse econômico, plantas transgênicas foram obtidas com este método, como na soja, para melhora da qualidade proteica e diminuição de fatores antinutricionais (QU et al., 2016), no arroz, para resistência a doenças (LEE et al., 2017), na cana-de-açúcar, otimização de protocolo de transformação (SANDHU et al., 2016), no eucalipto, para resistência a doenças (OUYANG; LI, 2016), entre outras.

#### 4 Referências Bibliográficas:

BERTANI G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 62, p. 293-300, 1951.

BIRCH, R.G. Plant transformation: problems and strategies for practical application. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 297-326, 1997.

BRASILEIRO, A.C.M.; ARAGÃO, F.J.L. O sistema *Agrobacterium*: do solo para o laboratório. In **Cultivo *in vitro* de plantas** (Ed. Cid, L. P. B.). Embrapa - Brasília-DF, 2010. p. 275-303.

BRASILEIRO, A.C.M.; ARAGÃO, F.J.L. O sistema *Agrobacterium*: do solo para a o laboratório. In: CID, L.P.B. (ed.) **Cultura *in vitro* de plantas**. Embrapa-CENARGEN, Brasília-DF, 2014. p. 297-325.

BRASILEIRO, A. C. M.; CABRAL, G. B.; SILVA, M. C. M. Transformação de plantas-modelo via *Agrobacterium spp*. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de Transformação genética de plantas**. 2. ed. Brasília-DF, Ed Embrapa-SPI, p. 105-136, 2015.

BRASILEIRO, A. C. M.; DUSI, D. M. A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPQ, 1999. v. 2, p.679-736.

BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA**. Porto Alegre: Artmed, 2003. 376 p.

LEE, I. H. et al. SP-LL-37, human antimicrobial peptide, enhances disease

resistance in transgenic rice. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1-15, 2017.

LIMA, L.M. **Conceitos básicos de técnicas em biologia molecular**. Embrapa Algodão, Campina Grande-PB, 2008. 27p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

NASCIMENTO, A. A. C.; ESPREAFICO, E. M.; LARSON, M. L. P.; MONESI, N.; ROSSI, N. M. M.; RODRIGUES, V. **Tecnologia do DNA recombinante**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 1999. 85p.

SANDHU, J. S. et al. Single step direct transgenic plant regeneration from adventive embryos of agro-infected sugarcane (*Saccharum spp.*) spindle leaf roll segments with assured genetic fidelity. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 125, n. 1, p. 149-162, 2016.

OUYANG, L. J.; LI, L. M. Effects of an inducible *aiiA* gene on disease resistance in *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis*. **Transgenic Research**, v. 25, n. 4, p. 441-452, 2016.

QU, J. et al. Agrobacterium-mediated transformation of the  $\beta$ -subunit gene in 7S globulin protein in soybean using RNAi technology. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, 2016.

TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. **Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises**. 2. ed. CRC Press, 1999. 472 p.



# Minireview sobre abordagens, métodos e conceitos para análise de um microbioma

*Wellington Pine Omori; Luis Teheran; Daniel Guariz Pinheiro; Vitor Fernandes Oliveira de Miranda; Jackson Antônio Marcondes de Souza*

## 1 Introdução

Um microbioma é definido como o conjunto de genomas dos microrganismos que vivem em um hábitat particular. Por sua vez, um hábitat é um local específico que é ocupado pela comunidade de microrganismos para crescimento e reprodução. Desta forma, o hábitat é um nicho específico, tal como um determinado órgão de uma planta (folha, caule, raiz, etc.), que é colonizado pelos microrganismos, os quais podem apresentar estrutura filogenética distinta entre si (BULGARELLI et al., 2013). A coleção de microrganismos em um nicho específico é chamada de microbiota. Embora seja uma questão emblemática no estudo da ecologia microbiana, todos os anos são publicados novos estudos sobre a estimativa da riqueza e da diversidade microbiana de múltiplos ambientes (ALBERTSEN et al., 2013; MENDES et al., 2013; SOUZA et al., 2016). O consenso entre as pesquisas é a de que desconhecemos grande parte da microbiota, chegando ao ponto de algumas das vezes sabermos da existência de alguma espécie microbiana devido à recuperação de fragmentos gênicos a partir do ambiente ou por uso de outras técnicas avançadas de bioinformática (PINTO et al., 2015).

Atualmente, pode-se usar uma série de estratégias para estimar a riqueza e a diversidade de espécies e de genes microbianos que habitam um determinado ambiente. Dentre todos os ambientes terrestres estudados no mundo, o solo é o mais explorado e compreendido, existindo grande acervo bibliográfico de pesquisas abordando os mais variados assuntos que vão desde estudos de comunidades microbia-

nas de solos agricultáveis (SOUZA et al., 2016), até efeitos abióticos sobre mudanças na estrutura das comunidades microbianas de solos em áreas de preservação (MENDES et al., 2015), dentre outros. Estimativas sugerem que o solo comporte cerca de 0.01-1% dos procaríotos (bactérias e arqueas) que são passíveis de cultivo pelo uso de abordagens tradicionais de cultura. Em quantidade de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO), 10 gramas (g) contêm cerca de 52.000 UTUs, equivalente a 20.000-180.000 genomas. Por sua vez, na rizosfera, estima-se que existam cerca de 100-55.000 OTUs, variando muito conforme tipo de solo, tipo de vegetação, ações antropogênicas, etc. (MENDES et al., 2013). A baixa proporção de organismos cultiváveis deve-se muito mais à falta de nossa capacidade em elaborar um meio de cultivo que atenda às necessidades nutricionais dos 99% dos procaríotos desconhecidos do que por qualquer outro problema biológico ou técnico (BIKEL et al., 2015).

Metagenômica, Metatranscriptômica e Metaproteômica são algumas das abordagens independentes de cultivo que formam as abordagens conhecidas como “metaômicas” e que podem ser usadas para acessar informações de composição taxonômica e funcional de um microbioma. Metagenômica é definida como uma coleção de genes e genomas que representam um microbioma, enquanto metatranscriptômica e a metaproteômica se referem ao conjunto de transcritos que são sintetizados por um microbioma e a reunião de todas as proteínas sintetizadas pelos organismos de uma comunidade microbiana, respectivamente (SEGATA et al., 2013; BIKEL et al., 2015; PROSSER, 2015). O uso de tais abordagens permite o acesso direto aos ácidos nucleicos e conjuntos de proteínas presentes no microbioma, tornando possível explorar características taxonômicas e inferências fisiológicas de organismos cultiváveis e, principalmente, daqueles que não foram cultivados. Embora poderosas, estas abordagens não produzem resultados absolutos se usadas isoladamente, sendo recomendado o uso combinado dessas abordagens, além do emprego das tradicionais técnicas de cultivo para isolamento microbiano (ou de comunidades). Isto viabiliza validar se as predições realizadas pelas diferentes abordagens “metaômicas” são verificadas quando confrontadas entre si, além de permitir verificar se os mecanismos de virulência ou benéficos ao

bom funcionamento de um ecossistema são mesmo codificados pelos isolados/consórcios microbianos quando em interação com outros organismos ou frente a alguma mudança ambiental (SEGATA et al., 2013; BIKEL et al., 2015; PROSSER, 2015; SOUZA et al., 2016). Embora a grande vantagem das abordagens “metaômicas” resida no fato de serem independentes de cultivo, o aumento na acurácia e no número de novas descobertas sobre a taxonomia e as funções de comunidades microbianas é diretamente proporcional a nossa capacidade em avaliar novas características genéticas e fisiológicas de microrganismos obtidos em cultura pura. Isto significa que tais características (ou traços moleculares) devem ser armazenadas em bancos de dados públicos (GenBank) ou particulares, em forma de genes/transcritos/posições taxonômicas, onde estas atualizações de constatações científicas possam permitir a verificação desses novos traços em estudos mais antigos ou recentes (MENDES et al., 2013; SEGATA et al., 2013; PROSSER, 2015; KISHI et al., 2016), melhorando nossa compreensão sobre o funcionamento do microbioma.

Apesar de ser um enorme desafio, existe a possibilidade de reconstituir genomas a partir do sequenciamento de um Metagenoma, mesmo que o alvo seja um grupo de organismos com baixa abundância relativa na amostra. Albertsen e colaboradores (2013), estudando a diversidade microbiana e funcional de biorreatores anaeróbicos, propuseram que se quiser acessar a diversidade microbiana de organismos com baixa abundância (menos que 1%), devem-se usar diferentes metodologias de extração de DNA total que permitam aumentar a abundância de determinados indivíduos da amostra. Basicamente, a partir da coleta do material, os autores usaram duas metodologias de extração de DNA: uma baseada em *kit* comercial e outra em protocolo construído *in house*. Desta forma, por exemplo, espera-se que um determinado grupo de organismos menos abundantes tenha maior frequência na metodologia de uso de *kit* do que naquela com uso de protocolo *in house*, e vice-versa. Justamente esta diferença na abundância de diferentes regiões gênicas recuperadas em forma de fragmentos de DNA é que contribuirá para melhoria na qualidade da cobertura durante as etapas de montagem de genomas ou *drafts* (genomas incompletos). Além disso, deve-se subentender que é fundamental usar uma plata-

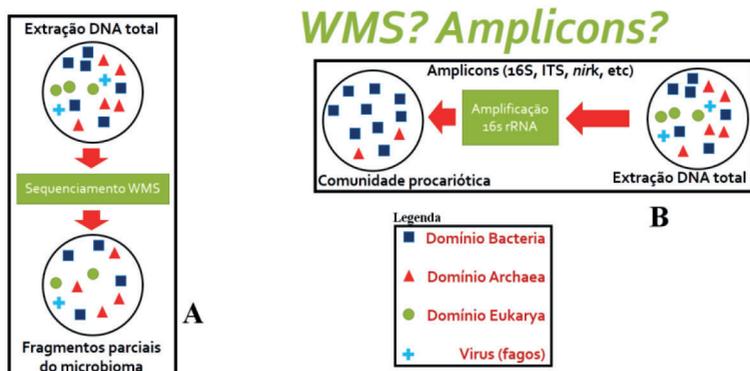
forma de sequenciamento que produza dados de excelente qualidade, como os da Illumina. Para a montagem de metagenomas, realizada *in silico* (no computador), pode ser usado o protocolo **Kalamazoo** (CRUSOE et al., 2015). Esse protocolo utiliza a abordagem de normalização digital, reduzindo a quantidade inicial dos dados e, conseqüentemente, o consumo de recursos computacionais (processamento e memória) para o processo de montagem dos *scaffolds*. Um *scaffold* é uma reunião de *contigs* que possui regiões que se sobrepõem (normalmente nas extremidades destas estruturas) e os *contigs* são obtidos pela reunião de *reads* que possuem regiões sobrepostas e que tendem a formar sequências maiores (contínuas). Por este motivo, este protocolo normaliza a abundância de *reads* para um número específico, como uma tentativa de reduzir a redundância e a ocorrência de pequenos erros (HOWE et al., 2014). Para acessar a documentação do protocolo e ter acesso a um tutorial de instalação e execução dos programas, acessa-se o [link](https://khmer-protocols.readthedocs.io/en/v0.8.3/metagenomics/) <https://khmer-protocols.readthedocs.io/en/v0.8.3/metagenomics/> e, para saber mais sobre a normalização digital, deve-se acessar <http://ivory.idyll.org/blog/why-you-shouldnt-use-diginorm.html>.

Após selecionar um microbioma específico, podem-se usar abordagens de sequenciamento em larga escala que visem a acessar parte ou toda a diversidade microbiana de um ambiente. Para usar-se tais técnicas, deve-se compreender que existem diferenças sutis entre elas e, portanto, nem todas as abordagens que explorem comunidades microbianas são “metaômicas”. É comum encontrar-se na literatura que abordagens baseadas em análises de *amplicons* são entendidas como análises Metagenômicas, sendo que, na verdade, isto é um equívoco técnico. Para compreender-se isto, basta lembrar-se da definição de Metagenoma, além de dominar-se o conceito de que se tem *amplicons* neste estudo, isto significa que uma parcela de toda a comunidade microbiana foi amostrada, significando que não se tem mais uma reunião de genes e genomas que representem um microbioma. O gene 16S ribossomal RNA (16S rRNA) é um exemplo de *amplicon* que pode ser obtido do ambiente após a extração de DNA total e amplificação parcial que flankeie alguma das nove regiões hipervariáveis deste gene. No estudo de eucariotos, como os fungos, podem-se usar os marcadores 18S rRNA e *Internal Transcribed Spacer* (ITS) (PROS-

SER, 2015; SOUZA et al., 2016). Além de identificar a taxonomia que estrutura uma comunidade microbiana, a amplificação parcial do gene 16S rRNA permite o acesso a possíveis vias bioquímicas ativas na comunidade microbiana. Resumidamente, tal inferência é realizada após a identificação taxonômica das sequências do gene e a comparação das vias bioquímicas identificadas no genoma do organismo à qual se atribui a sequência do gene 16S rRNA (ABHAUER et al., 2015). Por este motivo, tal abordagem não é tão acurada quanto os resultados obtidos por abordagens “metaômicas”, pois as atribuições de possíveis vias bioquímicas são feitas com base na atribuição taxonômica e não com base em um gene/transcrito/proteína.

O uso do sequenciamento de um gene marcador seleciona determinado grupo de organismos, perdendo toda a informação dos demais organismos que compõem o microbioma da análise (**Figura 1**). No caso do uso de sequenciamento de um marcador como o 16S rRNA, pode haver a ocorrência de sequências quiméricas, as quais contêm em sua extensão duas ou mais partes de sequências similares a outros organismos, o que resulta em classificações equivocadas e erros interpretativos. Apesar de o gene 16S rRNA possuir regiões de alta conservação, há regiões hipervariáveis, com sinais filogenéticos que permitem a identificação até mesmo de uma única espécie em particular. Por este motivo, devem-se remover sequências quimeras desta análise. Outras sequências também devem ser removidas, como aquelas pertencentes a outro domínio (se os dados forem de bactérias, remover sequências de arqueas, e vice-versa), mitocondriais ou cloroplastos de plantas, etc. (SOUZA et al., 2016). Além disso, pode haver sequências contaminantes oriundas do manejo inadequado de *kits* de extração de DNA, águas de diluição de soluções, dentre outros, as quais podem introduzir táxons microbianos nestas análises que não estão realmente presentes no ambiente analisado (SALTER et al., 2014). Por este motivo, podem-se usar várias ferramentas de bioinformática para a remoção destas estruturas, tais como as embutidas no QIIME (CAPORASO et al., 2010), DECONSEQ (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011) e DECIPHER (WRIGHT, 2016), dentre outros. Para dados de Metagenoma, o protocolo *Kalamazoo*, bem como o montador IDBA-UD (PENG et al., 2012) utilizam a remoção de sequências problemáticas à monta-

gem (principalmente devido à baixa cobertura) durante as etapas de normalização e montagem dos *scaffolds*, respectivamente. Para estudos voltados a organismos associados a plantas, pode ocorrer contaminação, principalmente do DNA de plantas (MENDES et al., 2013; SOUZA et al., 2016), uma situação esperada devido à grande quantidade de material genético do hospedeiro com relação ao microbioma (MENDES et al., 2013).



**Figura 1.** Perda de informações da comunidade microbiana introduzidas pelo uso de amplificação seletiva de um gene. A) Extração de DNA total e sequenciamento de todo DNA ambiental, e B) Extração de DNA total, amplificação do gene 16S rRNA e sequenciamento da diversidade de bactérias. No caso de B, o aparecimento de seqüências de arqueas deve-se a amplificações inespecíficas, as quais devem ser removidas antes das análises.

Segundo dados coletados no GOLD Database, em 13 de março de 2017 (<https://gold.jgi.doe.gov/>), atualmente existem 80 vezes mais estudos voltados ao domínio bactéria do que ao domínio arquea. Foram catalogados 83.175 projetos para estudo de bactéria, 20.883 projetos para estudo de eucariotos, 20.640 projetos para estudos de metagenômica, 6.575 projetos para estudo de vírus (este até 2016 apenas) e 1.393 projetos para estudo de arqueas, sendo que, se se somar os estudos de eucariotos, vírus e arqueas (28.851), não se chega a 30% dos estudos voltados a bactérias. Dentre as bactérias, os três principais projetos filogenéticos concentram-se em Proteobacteria (37%), Firmicutes

(23%) e Actinobacteria (11%). Quando se agrupam os estudos em categorias de distribuição por tipo de ecossistemas, têm-se que 23% dos dados são oriundos do sistema digestivo, 15% do ambiente marinho, 13% de água doce, 11% de solo, dentre outros. Estes dados revelam que a maior parte dos estudos ainda é realizada em microbiomas frequentemente explorados e que, possivelmente, a diversidade microbiana que é acessada quando se exploram ambientes ainda nada compreendidos (como profundezas de oceanos), na verdade está-se tendo um breve vislumbre da real diversidade microbiana que ali habita. Além disto, como a maioria dos estudos baseados em cultura pura se concentra em organismos atribuídos a filos frequentemente identificados em análises metagenômicas de diversos habitats (ALBERTSEN et al., 2013; MENDES et al., 2015; SOUZA et al., 2016), e isto pode significar que as informações das bases de dados podem conter um viés ainda não estimado sobre dados referentes a funções codificadas por um microbioma bem como informações referentes à taxonomia. Por este motivo, para evitar problemas técnicos e conceituais, deve-se sempre estar atento à atualização de bancos de dados de referência para identificações taxonômicas e funcionais de organismos (RIGDEN et al., 2016), pois o uso de bancos desatualizados pode levar à perda de informações de grupos microbianos importantes que permitem elaborar e compreender melhor novas hipóteses (MENDES et al., 2013).

## 2 Referências Bibliográficas

ALBERTSEN, M.; HUGENHOLTZ, P.; SKARSHEWSKI, A.; NIELSEN, K. L.; TYSON, G. W.; NIELSEN, P. H. Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. **Nat Biotechnol.**, v. 31, n. 6, p. 533-538, 2013.

ABHAUER, K. P.; WEMHEUER, B.; DANIEL, R.; MEINICKE, P. Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. **Bioinformatics**, v. 31, n. 17, p. 2.882-2.884, 2015.

BIKEL, S. et al. Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: towards a systems-level understanding of human microbiome. **Computational and Structural Biotechnology**

**Journal**, v. 13, p. 390–401, 2015.

BULGARELLI, D. et al. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 64, p. 807–838, 2013.

CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, p. 335–336, 2010.

CRUSOE, M. R. et al. The khmer software package: enabling efficient nucleotide sequence analysis. **F1000Research**, v. 4, p. 900, 2015.

HOWE, A. C.; JANSSON, J. K.; MALFATTI, S. A.; TRINGE, S. G.; TIEDJE, J. M.; BROWN, C. T. Tackling soil diversity with the assembly of large, complex metagenomes. **Proc Natl Acad Sci**, v. 111, n. 13, p. 4.904–4.909, 2014.

KISHI, L. T.; FERNANDES, C. C.; OMORI, W. P.; CAMPANHARO, J. C.; LEMOS, E. G. Reclassification of the taxonomic status of SEMIA3007 isolated in Mexico B-11A Mex as *Rhizobium leguminosarum* bv. viceae by bioinformatic tools. **BMC Microbiol.**, v. 16, n. 1, p. 260, 2016.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J. M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 37, n. 5, p. 634–663, 2013.

MENDES, L. W.; TSAI, S. M.; NAVARRETE, A. A.; HOLLANDER, M.; VAN VEEN, J. A.; KURAMAE, E. E. Soil-Borne Microbiome: Linking Diversity to Function. **Microb Ecol**, v. 70, p. 255–265, 2015.

PENG, Y.; LEUNG, H. C. M.; YIU, S. M.; CHIN, F. Y. L. IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. **Bioinformatics**, v. 28, n. 11, p. 1.420–1.428, 2012.

PINTO, A. J. et al. Metagenomic evidence for the presence of commammox *Nitrospira*-like bacteria in a drinking water system. **mSphere**, v. 1, n. 1, p. e00054–15, 2015.

PROSSER, J. I. Dispersing misconceptions and identifying opportunities for the use of “omics” in soil microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 7, p. 439–446, 2015.

RIGDEN, D. J.; FERNÁNDEZ-SUÁREZ, X. M.; GALPERIN, M. Y. The 2016 nucleic acids research database issue and molecular biology database collection. **Nucleic Acids Res**, v. 44, n. D1, p. D1–D6, 2016.

SALTER, S. J. et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. **BMC Biology**, v. 12, n. 87, 2014.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Fast identification and removal of sequence contamination from genomic and metagenomic datasets. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e17.288, 2011.

SEGATA, N.; BOERNIGEN, D.; TICKLE, T. L.; MORGAN, X. C.; GARRETT, W. S.; HUTTENHOWER, C. Computational meta'omics for microbial community studies. **Molecular Systems Biology**, v. 9, n. 1, 2013.

SOUZA, R. S. C. et al. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Scientific Reports**, v. 6, p. 28.774, 2016.

WRIGHT, E. S. Using DECIPHER v2.0 to Analyze Big Biological Sequence Data in R. **The R Journal**, v. 8, n. 1, p. 352-359, 2016.



# Princípios da Genética de Populações e Genética Quantitativa

*Alejandro Barrera Carvajal, Guilherme Batista do Nascimento,  
Luara Afonso de Freitas, Rafael Nakamura Watanabe, Rebeka  
Magalhães da Costa, Danísio Prado Munari.*

## 1 Introdução

O estudo da genética de populações pode ser definido como a compreensão das propriedades genéticas de uma população, isto é, avaliar um conjunto de indivíduos que possuem determinadas características genéticas comuns e que se acasalam. Indivíduos de uma mesma população apresentam grande similaridade genética, sendo as diferenças genéticas governadas por um ou poucos pares de genes (características qualitativas) ou determinadas por múltiplos genes (características quantitativas). Diferenças qualitativas podem ser identificadas com facilidade ao se descrever as propriedades genéticas da população, por muitas vezes causar diferenças expressivas na expressão do fenótipo. Como exemplo de características qualitativas, está a cor da pelagem e a presença ou ausência de chifres (LOPES et al., 2005). Já as características quantitativas apresentam variações contínuas do fenótipo, como, por exemplo, o ganho de peso diário e a produção de leite em vacas. A variação dessas características não tem origem apenas no fator genético, sofrendo também forte influência de fatores ambientais (FALCONER; MACKAY, 1996; LOPES et al., 2005).

A genética de populações tem como objetivo principal entender os fatores que determinam as mudanças genéticas devido à ação das forças evolutivas sobre os indivíduos de determinada população, assim como identificar os padrões apresentados pela variação genética dentro e entre populações (HEDRICK, 2005; HARTL; CLARK, 2007). A introdução de dados genômicos em estudos populacionais permitiu ampliar o conhecimento acerca das propriedades genéticas das populações, contribuindo, entre outras coisas, para o aumento da eficiência

produtiva de animais de produção e na conservação de espécies ameaçadas de extinção. Neste capítulo, serão abordados alguns princípios básicos sobre genética das populações e genética quantitativa, além de como genômica pode ser uma importante ferramenta na compreensão das estruturas populacionais.

## 2 Genética de populações

Os estudos em genética de populações iniciaram-se por volta de 1903, com a publicação de um artigo por William E. Castle. O autor propôs uma população ideal, constituída por indivíduos que se acasalam ao acaso, mantendo as frequências genotípicas estáveis. No entanto, foi em 1908 que os trabalhos “Proporções mendelianas em uma população mista”, do matemático Godfrey H. Hardy e “Prova da herança em humanos”, do médico Wilhelm Weinberg foram publicados. Nesses trabalhos, foram apresentados os conceitos que hoje se chama de Teorema de Hardy e Weinberg (CARDELLINO; ROVIRA, 1987). Os conceitos apresentados por Hardy e Weinberg exigiam população de tamanho infinito e com as frequências alélicas e genotípicas constantes. Esse exemplo hipotético foi chamado de população em equilíbrio de Hardy e Weinberg. Portanto, em uma grande população sob acasalamento ao acaso, na ausência de seleção, mutação e migração, as frequências alélicas e genotípicas devem permanecer constantes de geração em geração e apresentarem uma relação simples entre estas frequências (FALCONER; MACKAY, 1996).

O conhecimento da relação entre as frequências alélicas e genotípicas é de grande importância para estudos de genética de populações e genética quantitativa, por representar a teoria-base destes estudos. Esta relação ocorre da seguinte maneira: se um único locus apresentar apenas dois alelos (**A** e **a**), com as frequências **p** e **q**, respectivamente. O princípio do equilíbrio de Hardy e Weinberg afirma que a frequência genotípica do homocigoto (**AA**) será **p<sup>2</sup>**, do heterocigoto (**Aa**) será **2pq** e do outro homocigoto (**aa**) será de **q<sup>2</sup>**, e as frequências alélicas da geração seguinte serão sempre **p<sup>2</sup>**, **2pq** e **q<sup>2</sup>**, independentemente da constituição genotípica inicial. Para observar-se esse equilíbrio, basta

apenas uma geração de acasalamento ao acaso, desde que na ausência dos fatores que modificam a composição gênica da população (seleção, mutação, migração e deriva genética). Ao atingir o equilíbrio, a população terá suas frequências alélicas e genotípicas constantes, geração após geração (FALCONER; MACKAY, 1996).

Se uma população não apresentasse os fatores que modificam a composição gênica, as populações apresentariam uma inércia evolutiva, pois não estariam sujeitas a fatores evolutivos (mutações, seleção, migração e deriva genética) e fatores que geram o aumento de homozigose (acasalamentos consanguíneos e subdivisão da população). Portanto, nenhuma população real satisfaz completamente todas as condições para estar em equilíbrio de Hardy e Weinberg, o que torna possível o entendimento do processo evolutivo dos indivíduos em termos mendelianos por meio dos fatores que fazem com que a população saia da condição de equilíbrio (BEIGUELMAN, 2008).

### 3 Genética Quantitativa

A Genética Quantitativa estuda as características de herança poligênica, ou seja, aquelas que são expressas por grande quantidade de genes de pequeno efeito. No contexto da genética quantitativa, não é possível identificar diretamente quantos e quais genes são envolvidos em sua expressão. Diferentemente das características qualitativas, nas características quantitativas, as diferenças entre os indivíduos são observadas dentro de escalas contínuas, de modo que esta variação é atribuída não só ao genótipo, mas também às condições ambientais às quais estes foram submetidos, como, por exemplo, a quantidade e a qualidade do alimento oferecido. Portanto, fatores ambientais podem resultar em animais mais bem avaliados em relação a outros com mesma genética, porém com alimentação de qualidade e quantidade inferior. Nem toda variação fenotípica observada é devido a diferenças genéticas entre os indivíduos de uma mesma população, de modo que, quanto maior é a influência ambiental, menos preciso será o fenótipo do indivíduo como indicativo de seu potencial genético (PEREIRA, 2012).

O fenótipo de um indivíduo pode ser atribuído ao seu valor ge-

nético, resultado do conjunto de genes que este carrega, somado às diferenças ambientais nas quais se encontra e qualquer outra possível circunstância de origem não genética. Pode-se expressar essa relação como:

$$P = G + E$$

sendo P o valor fenótipo, G o valor genotípico, resultado dos efeitos genéticos que o indivíduo carrega e E é referente aos desvios ambientais (CARDELLINO; ROVIRA, 1987; FALCONER; MACKAY, 1996). Como resultado dessa equação, a variância fenotípica (VP) de um indivíduo pode ser decomposta em:

$$VP = VG + VE,$$

ou

$$VP = VA + VD + VI + VE$$

em que VG corresponde à variância genética; VA à variância genética promovida pelo efeito aditivo dos genes; VD à variância genética causada pelos desvios de dominância; VI à variância genética devido à epistasia, e VE à variância devido aos fatores ambientais (FALCONER; MACKAY, 1996). Determinar a importância relativa das diferentes causas que afetam a variação total observada nos indivíduos, desenvolve um papel crucial no entendimento das propriedades genéticas de uma população, em especial o papel genético na composição da variação fenotípica de uma característica em determinada população, conceito expresso pela herdabilidade.

A herdabilidade é a razão entre a proporção da variância total ou fenotípica explicada pela variação no genótipo como um todo, incluindo-se os efeitos epistáticos e de dominância, denominados de herdabilidade no sentido amplo ( $H^2$ ). Por sua vez, a proporção da variância total, que é devida à variação aditiva dos genes, é definida como herdabilidade no sentido restrito ( $h^2$ ):

$$H^2 = \frac{VG}{VP}$$

$$h^2 = \frac{VA}{VP}$$

Porém, a herdabilidade no sentido restrito ( $h^2$ ) é mais utilizada no melhoramento genético animal, pois características que apresentam alta herdabilidade restrita indicam que as variações fenotípicas são promovidas principalmente devido a diferenças nos alelos dos indivíduos. Por outro lado, características que possuem baixa herdabilidade, no sentido restrito, indicam que grande parte da variação fenotípica observada é causada por diferenças ambientais, o que dificulta a aplicação da seleção genética por programas de melhoramento animal (PEREIRA, 2012).

A  $h^2$  pode variar entre 0 e 1, implicando que quanto mais próximo de 1 for seu valor, maior será a contribuição da variância aditiva em explicar as diferenças observadas entre os indivíduos, e, portanto, maior é a confiança do desempenho produtivo do animal, como indicador de seu valor genético (VISSCHER et al., 2008). Este parâmetro é fundamental no delineamento de programas de seleção, uma vez que características com maiores estimativas de herdabilidade possibilitam maiores ganhos genéticos por meio da seleção.

No entanto, é importante observar que o coeficiente de herdabilidade varia não apenas em função da variância genética, mas também em relação a todos os componentes que contribuem para a variância fenotípica da população. Em populações com altas taxas de homozigose, as frequências alélicas tendem a fixar-se, e, por consequência, a variabilidade genética diminui. Nota-se que, pela fórmula acima, quanto maior é a importância dos fatores ambientais em explicar a variação observada no fenótipo, menor será o valor expresso pelo coeficiente de herdabilidade para determinada característica de interesse; dessa forma, se o ambiente em que os indivíduos estão inseridos for uniformizado, poderá haver aumento da herdabilidade. A  $h^2$  é um parâmetro específico para uma população, característica e condições sob as quais foi estimada (FALCONER; MACKAY, 1996).

## 4 Genômica

Os marcadores moleculares de polimorfismos de único nucleotídeo (SNP), atualmente inseridos nas avaliações genéticas em programas de melhoramento genético animal, vêm auxiliando no progresso genético de populações de animais domésticos. A seleção de animais baseada em informações de parentesco, obtidas por meio de análises clássicas, que utiliza informações de parentesco, associada a informações obtidas por meio de dados genômicos, permite maior acurácia na predição de parâmetros genéticos, resultando em programas de melhoramento genético mais eficientes. Os marcadores moleculares SNP têm sua origem em mutações pontuais na cadeia de bases nitrogenadas presentes nas moléculas de DNA. A mutação mais comum para o surgimento dos SNPs é a transição de uma base do tipo púrica por outra púrica (A-G) ou de uma pirimídica por outra (C-T), a qual ocorre com maior frequência em regiões intergênicas, ou seja, regiões regulatórias de expressão ou sem função ainda determinada (CAETANO, 2009). Os marcadores do tipo SNP possuem baixa taxa de mutação, facilidade e baixo custo no processo de genotipagem, quando comparados com outros marcadores moleculares, tornando-se os marcadores mais utilizados no melhoramento genético animal (RESENDE, 2008). O desenvolvimento de painéis com alta densidade de marcadores SNP permitiu identificar grande parte da variabilidade genética aditiva de determinada característica, com a estimação do valor de substituição alélica em cada locus envolvido com esta característica. Assim, o valor genético de um indivíduo pode ser estimado com base apenas no genótipo de todos os marcadores associados com a característica, sem as informações fenotípicas do animal sob avaliação (MEUWISSEN et al., 2001).

Os QTLs (*quantitative trait loci*) são regiões cromossômicas que estão relacionadas com a variação fenotípica das características quantitativas e apresentam-se como a associação estatística entre dados relacionados a uma região cromossômica e a variabilidade fenotípica existente entre populações segregantes (GUIMARÃES, 2008). Para que a ligação entre os QTLs e os marcadores molecula-

res seja detectada, é necessário que estes estejam em desequilíbrio de ligação (DL), que se expressa como uma medida de dependência entre alelos de dois ou mais loci. A ligação gênica entre os loci que controlam características quantitativas (QTL) e os marcadores moleculares, assim como a ligação entre os marcadores, são a base para a seleção e o melhoramento genético a partir de informações genômicas. Como exemplo, se em um grupo de indivíduos de dois alelos de loci distintos são observados juntos com frequência maior do que aquela esperada com base no produto de suas frequências, infere-se que tais alelos estão em desequilíbrio de ligação. Valores de DL próximos de zero indicam que estes alelos de diferentes genes estão em equilíbrio, e valores próximos de um indicam desequilíbrio entre alelos de diferentes genes. Se um marcador molecular e um QTL estão em equilíbrio na população, o conhecimento do genótipo do marcador em um indivíduo não apresenta qualquer valor para a seleção. A permanência de um DL em determinada população dependerá da taxa de recombinação entre dois loci, ou seja, para loci que estão mais próximos, qualquer DL que tenha sido criado, permanecerá na população por várias gerações; já em loci que estão fracamente ligados, o DL decrescerá rapidamente (RESENDE, 2008).

De acordo com Reich et al. (2001), os fatores que podem afetar o DL em uma população, são: estrutura da população, migração, seleção, mutações, deriva genética e recombinações. Populações que apresentam modificações em sua estrutura populacional devido à redução do tamanho efetivo, podem apresentar crescimento na extensão de alelos de diferentes loci com maior DL. Se determinada população apresentar uma rápida expansão populacional, eventos de recombinação recorrentes tendem a reduzir o nível de DL entre alelos mais distantes. Assim como modificações na estrutura populacional, o processo de seleção também pode favorecer alterações no DL em regiões específicas, devido a seleção proporcionar o aumento da frequência de alelos favoráveis, induzindo os alelos de loci mais próximos a estas regiões a apresentarem maior frequência, elevando sua correlação e, consequentemente, o DL (FRAZER et al., 2007).

## 5 Referências Bibliográficas

BEIGUELMAN, B. **Genética de populações humanas**. Ribeirão Preto: SGB, 235p. 2008.

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

CARDELLINO, R. A.; ROVIRA, J. **Mejoramiento genético animal**. Motevideo; Editora Agropecuaria Hemisferio Sur, 253p. 1987.

FALCONER, D. S.; MACKAY, F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4. ed. New York: Longman Group, 463p. 1996.

FRAZER, K. A. et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. **Nature**, New York, v. 449, p. 851-861, 2007.

GUIMARÃES, S. E. F. Análise de marcadores genômicos e detecção de QTLs e genes candidatos em melhoramento animal. In: PEREIRA, J. C. C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. 5. ed. Belo Horizonte: FEPM-VZ, p. 519-552, 2008.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Principles of Population Genetics**. 4. ed. Sunderland: Sinauer Associates. A recent summary of the principles of population genetics. 2007.

HEDRICK, P. Genetic polymorphism in heterogeneous environments: the age of genomics. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, 37, p. 67-93, 2006.

LOPES, P. S. et al. **Teoria do Melhoramento Animal**. Belo Horizonte, FEPM-VZ-Editora, 2005, 118p.

MEUWISSEN, T. H. E.; HAYES, B. J.; GODDARD, M. E. Prediction of Total Genetic Value Using Genome-Wide Dense Marker Maps. **Genetics**. Bethesda, v. 157, p. 1.818-1.829, 2001.

PEREIRA, J. C.C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**, 6 ed., Belo Horizonte. Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2012, 758p.

REICH, D. E. et al. Linkage disequilibrium in the human genome. **Nature**, New York, v. 411, p. 199-204, 2001.

RESENDE, M. D. V. **Genômica Quantitativa e Seleção no Melhoramento de Plantas Perenes e Animais**. 1. ed. 330p. Colombo: Embrapa Florestas, 2008.

VISSCHER, P. M.; HILL, W. G.; WRAY, N. R. Heritability in the genomics era – concepts and misconceptions. **Nature Reviews Genetics**, v.9, p.255-266, 2008.