

Coordenadores

Janete Aparecida Desidério

Amanda Cristina Baldassi

Carlos Henrique Caprio

Nestor Darío Franco Marulanda

Tópicos Especiais em Genética Aplicada

Volume 5



Janete Aparecida Desidério
Amanda Cristina Baldassi
Carlos Henrique Caprio
Nestor Darío Franco Marulanda

Tópicos Especiais em Genética Aplicada

Volume 5

Jaboticabal - São Paulo
Funep
2018

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



Conheça nosso site

ISBN - 978-85-7805-179-2

T674 Tópicos especiais em genética aplicada / Coordenador Janete Aparecida
Desidério ... [et al.]. -- Jaboticabal : Funep, 2018

v. 5, viii, 140 p. : il.

Inclui bibliografia
ISBN 978-85-7805-179-2

1. Genética. 2. Melhoramento. 3. Genômica. 4. Biologia molecular. 5. Bioinformática. I. Desidério, Janete Aparecida. 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.



2018

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 está em sua 14ª edição e já se tornou tradição na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/UNESP). Ele é realizado pelos discentes e docentes dos cursos de Pós-Graduação da Instituição e é voltado para alunos de graduação, pós-graduação e profissionais atuantes na área. O evento tem como objetivo abordar e disseminar o conhecimento através de diferentes temas fundamentais e aplicados, relacionados à genética, tais como biologia molecular, melhoramento, inovações e técnicas nas áreas animal, vegetal, de microrganismos e humanas, além de discutir sobre tópicos relativos às “ômicas” e à bioinformática. Desde sua 10ª edição, o curso desenvolve o livro “Tópicos Especiais em Genética”, onde os capítulos são elaborados pelas equipes responsáveis por ministrar os minicursos oferecidos ao longo do evento, a fim de aprimorar o conhecimento técnico-científico tratado e debatido durante o mesmo.

Este ano, a obra intitulada “Tópicos Especiais em Genética Vol. V” vem dar continuidade ao trabalho realizado nas edições anteriores, cujos temas e assuntos abordados tiveram grande receptividade dos participantes. Sendo assim, buscamos abordar tópicos atuais, significativos e diversificados em uma linguagem de fácil compreensão, de maneira a propagar o conhecimento acerca das atualidades em torno das recentes pesquisas envolvendo genética. Neste sentido, o conteúdo apresentado nesta edição está relacionado à enxertia, edição genômica, transformação genética, salmoneloses, bioinformática, filogenia, além de princípios básicos sobre PCR e Citometria de Fluxo. Assim como nas edições anteriores, os temas vêm ao encontro dos interesses, não somente dos estudantes, como também de profissionais atuantes na área de genética.

Desde sua primeira edição, o Curso de Inverno de Genética é fruto da participação de discentes e docentes dos programas de Pós-Graduação (Genética e Melhoramento de Plantas, Microbiologia Agropecuária, Genética e Melhoramento Animal, Zootecnia, Produção Vegetal, Entomologia e Medicina Veterinária), os quais, mais uma vez, não mediram esforços para a realização desta edição do Curso, o que nos torna imensamente gratos pela colaboração. Da mesma forma, somos também gratificados pela direção da FCAV/UNESP, à FUNEP,

pelo apoio ao evento e, em especial, à Comissão Organizadora do 14º Curso de Inverno de Genética, pelo empenho, parceria e comprometimento no desenvolvimento desta obra.

Coordenação do Curso de Inverno de Genética 2018

Amanda Cristina Baldassi
Carlos Henrique Caprio
Nestor Darío Franco Marulanda

Sumário

Capítulo 1

Enxertia como ferramenta de controle de doenças de solo em hortaliças ...	9
1. Introdução	9
2. Enxertia	10
3. Enxertia em solanáceas	11
4. Enxertia em cucurbitáceas	12
5. Desafios e perspectivas	14
Referências	14

Capítulo 2

Recursos genéticos e métodos de melhoramento aplicados a hortaliças...	17
1. Introdução.....	17
2. Recursos genéticos e pré-melhoramento	18
3. Principais métodos de melhoramento em hortaliças.....	20
3.1. Hibridação	20
3.2. Retrocruzamento	21
3.3. Método genealógico (Pedigree)	21
3.4. Método descendente de uma única semente - Single Seed Descent (SSD)	22
4. Aplicação dos marcadores moleculares no melhoramento de hortaliças	23
5. Perspectivas e Desafios	25
Referências	25

Capítulo 3

Ferramentas de edição genômica aplicadas no melhoramento genético de plantas para resistência a fitopatógenos	30
1. Introdução.....	30
2. Ferramentas de edição Genômica.....	32
2.1. Edição genômica via Meganucleases	33
2.2. Edição genômica via Zinc Finger Nucleases (ZFNs)	34
2.3. Edição genômica via TALENs.....	35
2.4. Edição Genômica via o sistema CRISPR	36
3. Considerações finais	37
Referências	37

Capítulo 4

Melhoramento de Forrageiras Tropicais Apomíticas.....	41
1. Introdução.....	41
2. Origem e formação de sementes apomíticas.....	42
3. Melhoramento	44
4. Genotipagem	45
Referências	47

Capítulo 5

Aplicações do R e outras práticas para análises robustas e reprodutíveis de bioinformática	49
1. Introdução.....	49
2. R para análises de Bioinformática.....	51
3. Reprodutibilidade e robustez em análises.....	54
4. Considerações finais	55
Referências	56

Capítulo 6

Diferentes genes, diferentes filogenias: incongruências nas relações filogenéticas e na delimitação das espécies	59
1. O conceito de espécie e o método filogenético	59
2. Por que ocorrem problemas para se identificar as relações evolutivas entre os organismos?	61
3. Recombinação meiótica	61
4. Transferência intergenômica e horizontal de genes	62
5. Hibridização	62
6. Comparação entre sequências parálogas	63
7. Segregação incompleta de linhagens	64
8. Poliploidização	65
9. Atração de ramos longos.....	65
10. Possíveis caminhos para a solução dos problemas	66
Referências	67

Capítulo 7

Princípios básicos de biologia molecular e PCR	71
1. Introdução.....	71
2. Nucleotídeos, estrutura e química dos ácidos nucleicos.....	72
3. Replicação do DNA e RNA.....	74
4. Tradução e metabolismo das proteínas.....	75
5. PCR: reação da polimerase em cadeia	76
Referências	81

Capítulo 8

Atenuantes de estresses abióticos em plantas cultivadas	82
1. Introdução.....	82
2. Atenuantes	84
3. Reguladores de crescimento como atenuantes.....	85
4. Aplicação exógena de substâncias químicas	86
5. Nutrientes.....	87
6. Perspectivas	89
Referências	90

Capítulo 9

Diagnóstico Molecular de Bacterioses de Interesse em Avicultura e Saúde Pública	95
1. Descrição do gênero <i>Salmonella</i> spp.	95
2. Importância em saúde pública	96
3. Monitoramento das salmoneloses aviárias	96
4. Diagnóstico molecular de <i>Salmonella</i> spp.	97
5. Metodologias moleculares para análise genômica comparativa de <i>Salmonella</i> spp.	99
6. Considerações finais	101
Referências	101

Capítulo 10

Enzimas recombinantes utilizadas na indústria: foco para a produção de etanol de 2ª geração	105
1. Introdução.....	105
2. Obtenção de enzimas recombinantes e necessidade de coquetéis enzimáticos.....	107
3. Perspectivas do uso de enzimas em processos industriais: exemplo da produção do etanol de segunda geração	107
4. Celulases.....	108
5. Lacases.....	110
6. Hemicelulases	110
7. Xantana Liase.....	112
8. Considerações Finais	112
Referências	113

Capítulo 11

Princípios da citometria de fluxo.....	119
1. Introdução.....	119
Referências	125

Capítulo 12

Transformação genética de plantas e suas aplicações	126
1. Introdução.....	126
2. Identificação de genes de interesse	127
3. Métodos de transformação genética de plantas	129
3.1. Vantagens e desvantagens dos principais métodos de transformação	130
4. Aplicações: plantas utilizadas, eventos e características de interesse ..	131
4.1. Eventos de transformação para plantas resistentes a insetos	132
4.2. Eventos de transformação para plantas resistentes a herbicidas ...	132
Referências	133

Capítulo 13

Ferramenta de edição genômica CRISPR/Cas9 aplicada ao melhoramento genético de Soja.....	135
1. A cultura da soja e o melhoramento genético	135
2. Edição Genômica CRISPR/Cas9.....	136
3. Aplicação da técnica na cultura da soja	138
Referências	139

Capítulo 1



Enxertia como ferramenta de controle de doenças de solo em hortaliças

Edgard Henrique Costa Silva

Edicleide Macedo da Silva

Larissa Nogueira de Souza

Aline Oliveira

Leila Trevisan Braz

1 Introdução

As hortaliças constituem importante fonte de vitaminas e minerais na dieta humana, desempenhando papel destacado na segurança alimentar. Cada vez mais, a sociedade informa-se e se preocupa-se com o que está consumindo, o que, aliado ao crescimento contínuo da população mundial, gera demanda para maior produção de alimentos com o menor impacto socioambiental possível (LEE et al., 2010). O aumento de produtividade deverá ocorrer de maneira sustentável, com menor uso de produtos fitossanitários. Todavia, sistemas de produção mais intensificados e produtivos são, também, aqueles que apresentam maior suscetibilidade fitossanitária.

Inúmeros problemas fitossanitários acometem as culturas olerícolas, os quais diminuem a produtividade e depreciam a qualidade dos produtos hortícolas. As doenças em hortaliças causadas por fitopatógenos habitantes do solo, tais como fungos, bactérias e nematoides, são muito frequentes. Estas doenças são inseridas nos sistemas de produção por meio de materiais vegetais contaminados, como sementes e mudas, e também pela contaminação

de substratos, de maquinários e outros. Depois que ocorre a infestação da área por esses patógenos, torna-se difícil o controle, sendo um desafio para os olericultores, pois, geralmente, os agentes causais são consideravelmente virulentos e são responsáveis por doenças-chave em culturas.

Algumas hortaliças de alto rendimento, como tomateiro, pepineiro, pimenteiro, meloeiro e melancia, têm doenças-chave causadas por agentes causais habitantes do solo, como os nematoides de galha, e ocorrem de maneira irregular na gleba. Assim, controlar em área total significa diminuir de maneira significativa a eficiência do processo, além de aumentar custos desnecessários.

Técnicas que objetivam esterilizar o solo ou mesmo diminuir a população de um determinado patógeno, como a solarização, além de alto custo e baixa eficiência, podem atingir os microrganismos benéficos. Dessa forma, outras alternativas de manejo que possam minimizar o custo e obter hortaliças atrativas ao consumidor devem ser aplicadas, principalmente nas situações em que há utilização intensiva dos solos, assim como ocorre nos ambientes de cultivo protegidos.

A enxertia apresenta-se como uma ferramenta eficiente de controle de fitopatógenos de solo, além de não oferecer riscos socioambientais evidentes. Ademais, a enxertia pode ser utilizada para inserir resistência genética em um determinado sistema de produção a curto e médio prazos, considerando que, para que se desenvolva uma cultivar resistente por meio de melhoramento convencional, demanda-se tempo. Se a resistência genética for identificada em porta-enxerto potencial e, ainda, se este material for compatível para enxertia com o enxerto (cultivar comercial), tem-se, de maneira rápida, uma opção de resistência.

Além de ser uma estratégia para inserir resistência genética no sistema de produção de maneira mais rápida, o uso de mudas enxertadas pode proporcionar vantagens no manejo de estresses de ordem abiótica, na minimização do uso de produtos fitossanitários químicos e na obtenção de melhor qualidade de frutos (ROUPHAEL et al., 2010; SCHWARZ et al., 2010).

O objetivo deste é explorar o estado da arte, os desafios e as perspectivas do uso de enxertia em hortaliças, com foco em solanáceas e cucurbitáceas, como ferramenta eficiente de manejo de fitopatógenos habitantes do solo.

2 Enxertia

Em culturas olerícolas, a enxertia é utilizada principalmente com a finalidade de conferir resistência às mudas, propiciar aumento da produção e agregar melhorias no aspecto externo dos frutos, por exemplo, os frutos de pepino (ZEIST; GIACOBBO; DORNELES, 2015).

A adoção da enxertia em hortaliças no Brasil é recente e faz-se principalmente em culturas cucurbitáceas e solanáceas (PEIL, 2003). Pelo fato de a muda enxertada custar mais que uma muda tradicional, o uso desta técnica vem sendo adotado principalmente em culturas de alto valor agregado.

A enxertia consiste na união dos sistemas vasculares de, pelo menos,

duas plantas diferentes, formando uma única planta. De um ponto de vista mais aplicado, Gaion, Braz e Carvalho (2018) definem enxertia como o uso de uma planta vigorosa que substituirá o sistema radicular de uma determinada cultivar de interesse econômico que é suscetível a um ou mais fatores estressantes.

Sendo assim, o enxerto representa a parte da planta que se pretende multiplicar, isto é, a cultivar suscetível que apresenta boas características agronômicas, ao passo que o porta-enxerto que recebe o enxerto configura-se numa planta jovem, com boa taxa de crescimento, bastante rústica e resistente (ZEIST; GIACOBBO; DORNELES, 2015).

Entretanto, o sucesso na utilização da enxertia, implica adequação da metodologia empregada e adoção de espécies que se ajustem a técnica, pois a seleção de espécies compatíveis constitui um entrave no uso da enxertia (GOTO; SANTOS; CAÑIZARES, 2003).

A compreensão da relação entre enxertia compatível e incompatível ainda não está bem especificada, e algumas espécies são favoráveis quando enxertadas; no entanto, outras são incapazes de unirem-se, embora ocorra a cicatrização do ponto de enxertia, posteriormente demonstrando sintomas de desordens no ponto de união ou crescimento anormal (PEIL, 2003; ZEIST; GIACOBBO; DORNELES, 2015).

3 Enxertia em solanáceas

As solanáceas são uma importante família botânica, com representantes de importância olerícola, como a batata, o tomate, o pimentão e a berinjela. Na cultura do tomate e do pimentão, por exemplo, os sistemas de manejo adotados são diversos, desde o cultivo em sistema convencional em campo aberto, até o semi-hidropônico em ambiente protegido.

Devido à importância socioeconômica dessas culturas e à grande suscetibilidade a patógenos habitantes do solo, a enxertia vem sendo usada de maneira crescente. A cultura do tomateiro é a que apresenta maiores possibilidades de porta-enxerto comerciais, todavia também há materiais específicos para as culturas do pimentão e da berinjela.

Para que um porta-enxerto tenha expressão econômica, faz-se necessário que um pacote básico de resistências a doenças seja contemplado. Dessa forma, para a cultura do tomateiro, resistência a Tomato mosaic virus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Oidium neolycopersici*, *Verticillium alboatrum*, *Verticillium dahliae*, *Pyrenochaeta lycopersici*, *Fulvia fulva*, *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* é encontrada, de maneira geral, em todos os porta-enxertos disponíveis. Resistência genética à murcha-bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), embora em níveis moderados, é encontrada em metade dos porta-enxertos comerciais disponíveis para a cultura do tomateiro.

Para a cultura do pimentão, resistências a *Phytophthora capsici*, *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* são comuns a todos os porta-enxer-

tos disponíveis. Resistência à murcha-bacteriana e a algumas viroses parece ser diferencial.

Os nematoides de galha são problemas-chave em sistemas de produção de hortaliças, principalmente em ambientes protegidos, onde o uso da terra é intensificado. Em geral, os porta-enxertos disponíveis para tomate e pimentão são resistentes às duas principais espécies de nematoides de galha, *M. javanica* e *M. incognita*, todavia novas espécies têm-se tornado importantes e, provavelmente, não são controladas pelos mesmos genes envolvidos na resistência às espécies citadas (CANTU et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009). O nematoide *M. enterolobii* (sin. *M. mayaguensis*) tem sido relatado como resistente ao conjunto de genes *Mi* e, por essa razão, representa risco potencial. Outra espécie que foi recentemente relatada e apresenta ser agressiva e, assim como *M. enterolobii*, resistente às fontes disponíveis no mercado, é *M. ethiopica* (ROSA; WESTERICH; WILCKEN, 2015; BELLE et al., 2017).

A murcha-bacteriana é uma doença altamente destrutiva e é um desafio real em algumas regiões brasileiras. O controle dessa doença é difícil, e o uso de resistência genética caracteriza-se como a estratégia mais promissora e eficiente de controle. A herança da resistência à murcha-bacteriana é complexa, de ordem quantitativa, o que dificulta a obtenção de cultivares resistentes e com boas características agrônômicas. Nesse sentido, a enxertia apresenta-se como ferramenta essencial para o manejo desta bacteriose, embora, em condições muito favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, possa não ser eficiente (LOPES; BOITEUX; ESCHENBACK, 2015). Resistência genética a essa doença foi relatada no ‘híbrido Hawaii 7996’ por Cardoso et al. (2006) e em acessos de jurubeba (*Solanum scuticum* e *S. stramonifolium*) por Lopes e Mendonça (2016).

A murcha de fitófтора (*Phytophthora capsici*) é um dos maiores desafios fitossanitários da cultura do pimentão. Santos e Goto (2004) concluíram que a enxertia controla eficientemente essa doença, não havendo interferência na produção de frutos.

4 Enxertia em cucurbitáceas

As cucurbitáceas são importantes hortaliças-fruto para a olericultura brasileira. Algumas culturas são amplamente valorizadas e exploradas, como a cultura do pepino, do melão, da melancia e das abóboras e abobrinhas. Outras culturas, como chuchu e o maxixe, são importantes regionalmente, porém com grande potencial de exploração. Assim como as solanáceas, as cucurbitáceas são cultivadas em diversos sistemas de produção. A enxertia vem sendo usada principalmente em pepino do tipo japonês para aumentar a qualidade dos frutos, haja vista que os porta-enxertos proporcionam o aspecto *bloomless* (brilhante), isto é, a casca externa do fruto torna-se mais atraente aos consumidores (KAWAIDE, 1985).

Em melão e em melancia, enxertam-se aquelas cultivares exploradas em ambientes altamente intensificados e produtivos, como o cultivo em am-

biente protegido e em ambiente semi-hidropônico com uso de substrato ou fibra de casca de coco. Pelo alto investimento, a adoção dá-se em melões nobres (como o rendilhado) e em minimelancias. Gama et al. (2013) verificaram incremento de produtividade e de manutenção da qualidade de frutos em melancia enxertada, contudo a prática ainda não é difundida em escala comercial no Brasil.

Há poucos porta-enxertos comerciais disponíveis para cucurbitáceas, e estes apresentam resistência a um pequeno número de doenças. Resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* está relatada em quase todos os porta-enxertos. Logo, nessas culturas, a enxertia é adotada para melhorar os aspectos produtivos e a qualidade de frutos, pois o pacote de resistência dos porta-enxertos comerciais não contempla importantes doenças, como os nematoides de galha e o cancro da haste (*Didymella bryoniae*).

Embora suscetível a uma determinada doença, o uso de porta-enxerto com alto vigor de sistema radicular pode proporcionar maior tolerância a alguns patógenos. Salata et al. (2012) relataram que o porta-enxerto abóbora híbrida 'Shelper' apresentou reação de suscetibilidade a *M. incognita* raça 2 e *M. javanica*, e proporcionou maior número de frutos e menor fator de reprodução das duas espécies de nematoides quando comparado aos genótipos pés-franco e porta-enxerto abóbora híbrida 'Excite Ikki'. Wilcken et al. (2010) avaliaram a reprodução de *M. incognita* raça 2 e *M. javanica* em porta-enxertos e híbridos de pepino e observaram que os porta-enxertos foram suscetíveis, todavia apresentaram menor fator de reprodução que os híbridos avaliados. Conclusões semelhantes foram obtidas por Wilcken et al. (2013) quando avaliaram a reação de porta-enxertos e híbridos de pepino a *M. enterolobii*.

Os produtores, em geral, não identificam as espécies de nematoides de galha que ocorrem em seus cultivos, o que dificulta significativamente o manejo. Ito et al. (2014) avaliaram diversos porta-enxertos de cucurbitáceas a *M. incognita* e *M. javanica* e verificaram que apenas *Benincada hispida* foi resistente a ambas as espécies. Considerando as espécies separadamente, outros materiais mostraram-se resistentes. Nesse sentido, faz-se importante conhecer qual espécie está presente na área para que o porta-enxerto mais adequado seja escolhido. A adoção de porta-enxertos com moderada resistência a um determinado tipo de doença deve ser criteriosa, pois o cultivo sucessivo em mesma área pode elevar a população ou a densidade do patógeno a níveis críticos.

O cancro da haste causado por *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm (anamorfo *Ascochyta cucumis* Fautrey & Roum.) é uma doença fúngica de melão cultivado em ambiente protegido (GASPAROTTO et al., 2016). Trata-se de uma doença com alta capacidade destrutiva, não sendo relatada no pacote de resistência dos porta-enxertos comerciais, embora Gasparotto et al. (2016) tenham verificado que a abóbora híbrida 'Shelper' é capaz de controlar o patógeno.

Ito et al. (2009) relataram resistência genética ao cancro da haste em 15 genótipos de cucurbitáceas, bem como os efeitos na produtividade de me-

lão 'Bônus nº 2', concluindo que *Benincada hispida* é o porta-enxerto com maior potencial. Braz et al. (2011) relataram resistência ao cancro da haste em abóbora 'Brasileirinha', abóbora 'Maranhão' e abóbora 'Goianinha', sendo porta-enxerto potencial.

5 Desafios e perspectivas

Embora não se tenha estatísticas confiáveis sobre o uso de mudas de hortaliças enxertadas, os integrantes do setor mostram-se positivos quanto ao aumento desta tecnologia. A possibilidade de manejar mais eficientemente doenças de herança complexa, o incremento de produtividade e a melhoria da qualidade de frutos impulsiona o crescimento do setor.

Um dos aspectos necessários para aumentar a adoção da enxertia em olerícolas é a redução do preço de mudas. Em países como Japão, China, Coreia, Espanha, Itália, Israel e Holanda, entre outros, a enxertia já é difundida. Nesses locais, o processo de enxertia foi ou está sendo robotizado, o que aumenta consideravelmente a eficiência do processo, diminuindo, consequentemente, o custo de produção.

A maioria dos porta-enxertos comerciais disponíveis não passou por um processo de melhoramento genético propriamente dito, sendo oriundos de programas de triagem de genótipos para resistência a doenças. O melhoramento de porta-enxertos pode vir a ser uma possibilidade, pois pode-se piramidar genes de resistência e incorporar características específicas de porta-enxertos.

Referências

BELLE, C.; KASPARY, T.E.; GROTH, M.Z.; COCCO, K.L.T. *Meloidogyne ethiopica* parasitizing melon fields in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 124, n. 4, p. 393-397, 2017.

BRAZ, L.T.; ITO, L.A.; GAION, L.A.; CARMARGO, M. Avaliação de genótipos de cucurbitáceas quanto à resistência à *Didymella bryoniae*. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 2, S.1327-S.1334, 2011.

CANTU, R.R.; WILCKEN, S.R.S.; ROSA, J.M.O.; GOTO, R. Reação de porta-enxertos comerciais de tomateiro a *Meloidogyne mayaguensis*. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 3, p. 216-218, 2009.

CARDOSO, S.C.; SOARES, A.C.F.; BRITO, A.S.; CARVALHO, L.A.; LEDO, C.A.S. Viabilidade de uso do híbrido Hawaii 7996 como porta-enxerto de cultivares comerciais de tomate. **Bragantia**, v 65, n. 1, p. 89-96, 2006.

GAION, L.A.; BRAZ, L.T.; CARVALHO, R.F. Grafting in vegetable crops: a great technique for agriculture. **International Journal of Vegetable Science**, v. 24, n. 1, p. 85-102, 2018.

GAMA, R.N.C.S.; DIAS, R.C.S.; ALVES, J.C.S.F.; DAMACENO, L.S.; TEIXEIRA, F.A.; BARBOSA, G.S. Taxa de sobrevivência e desempenho agrônômico de melancia sob enxertia. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 128-132, 2013.

GASPAROTTO, F.; OLIVEIRA, R.R.; PENHARBEL, M.P.; TESSMANN, D.J.; NASCIMENTO, J.F.; VIDA, J.B. Effect of grafting on the control of gummy stem blight in muskmelons. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 2.859-2.866, 2016.

GOTO R.; SANTOS, H.S.; CAÑIZARES, A.L. **Enxertia em Hortalças**. 1. ed. UNESP. São Paulo, Brasil, 2003, 75p.

ITO, L.A.; CHARLO, H.C.O.; CASTOLDI, R.; BRAZ, L.T.; CAMARGO, M. Seleção de porta-enxertos resistentes ao cancro da haste e seus efeitos na produtividade de melão 'Bônus nº2'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 262-267, 2009.

ITO, L.A.; GAION, L.A.; GALATTI, F.S.; BRAZ, L.T.; SANTOS, J.M. Resistência de porta-enxertos de cucurbitáceas a nematoides e compatibilidade da enxertia em melão. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 297-302, 2014.

KAWAIDE, T. Utilization of rootstocks in cucurbits production in Japan. **Japanese Agricultural Research Quarterly**, v. 18, n. 4, p. 285-288, 1985.

LEE J.M.; KUBOTA C.; TSAO S.J.; BIEL Z.; HOYOS ECHEVARIA P.; MORRA, L.; ODA, M. Current status of vegetable grafting: diffusion, grafting techniques, automation. **Scientia Horticulturae**, v. 127, p. 93-105, 2010.

LOPES, C.A.; BOITEUX, L.S.; ESCHEMBACK, V. Eficácia relativa de porta-enxertos comerciais de tomateiro no controle de murcha bacteriana. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 125-130, 2015.

LOPES, C.A.; MENDONÇA, J.L. Reação de acessos de jurubeba à murcha bacteriana para uso como porta-enxerto em tomateiro. **Horticultura Brasileira**, v. 34, n. 3, p. 356-360, 2016.

OLIVEIRA, C.D.; BRAZ, L.T.; SANTOS, J.M.; BANZATTO, D.A.; OLIVEIRA, P.R. Resistência de pimentas a nematoides de galha e compatibilidade enxerto/porta-enxerto entre híbridos de pimentão e pimentas. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 520-526, 2009.

PEIL, R.M. A enxertia na produção de mudas de hortaliças. **Ciência Rural**, v. 33, n. 6, p. 1.169-1.177, 2003.

ROSA, J.M.O.; WESTERICH, J.N.; WILCKEN, S.R.S. Reprodução de *Meloidogyne enterolobii* em olerícolas e plantas utilizadas na adubação verde. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 4, p. 826-835, 2015.

ROUPHAEL, Y.; SCHWARZ, D.; KRUMBEIN, A.; COLLA, G. Impact of grafting on product quality of fruit vegetables. **Scientia Horticulturae**, v. 127, n. 2, p. 172-179, 2010.

SALATA, A.C.; BERTOLINI, E.V.; MAGRO, F.O.; CARDOSO, A.I.I.; WILCKEN, S.R.S. Enxertia e sua influência na produção de pepino e reprodução de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 590-594, 2012.

SANTOS, H.S.; GOTO, R. Enxertia em plantas de pimentão no controle de murcha de fitófтора em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n.1, p. 45-49, 2004.

SCHWARZ, D.; RUPHAEL, Y.; COLLA, G.; VENEMA, J.H. Grafting as a tool to improve tolerance of vegetables to abiotic stresses: Thermal stress, water stress and organic pollutants. **Scientia Horticulturae**, v. 127, n. 2, p. 162-171, 2010.

WILCKEN, S.R.S.; ROSA, J.M.O.; HIGUTI, A.R.O.; GARCIA, M.J.M.; CARDOSO, A.I.I. Reprodução de *Meloidogyne* spp. em porta-enxertos de pepino. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 120-123, 2010.

WILCKEN, S.R.S.; ROSA, J.M.O.; WESTERICH, J.N.; GARCIA, M.J.M.; CARDOSO, A.I.I. Reproduction of *Meloidogyne enterolobii* in rootstocks and cucumber hybrids. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 618-621, 2013.

ZEIST, A. R.; GIACOBBO, C. L.; DORNELES, K. R. Compatibility and Feasibility of Graft Tomato Cultivar Santa Cruz Kada in Different Rootstocks. **Scientific Electronic Archives**, v. 8, n. 1, p. 77-81, 2015.

Capítulo 2



Recursos genéticos e métodos de melhoramento aplicados a hortaliças

*Bruna Fukumoto Kobayashi
Carlos Henrique Caprio, Lucas Matias Gomes
Renato Silva Soares
Leila Trevisan Braz*

1 Introdução

As hortaliças ocupam papel de destaque mundialmente, seja pelo vasto número de espécies, seja por seus valores nutracêuticos, os quais são cada vez mais exigidos pelos consumidores. Em termos produtivos, as hortaliças ocupam posição de destaque na agricultura brasileira, com sua área cultivada de, aproximadamente, 837 mil hectares e volume de produção em torno de 63 milhões de toneladas (CNA BRASIL, 2016). Assim, para suprir a demanda crescente por alimentos, altas produtividades associadas a produtos de qualidade são o foco do desenvolvimento de novas variedades, de modo que as combinações genéticas obtidas tolerem/resistam às principais intempéries que recaem sobre as hortaliças, tais como pragas, doenças, nematoides, variações nas condições edafoclimáticas, entre outras.

É neste contexto que os programas de melhoramento genético se inserem, os quais, através de seus diversos métodos e técnicas de seleção e cruzamento de genótipos, buscam obter materiais genéticos mais adaptados

às condições atuais de cultivo. Em se tratando de hortaliças, o melhoramento é uma atividade dinâmica que requer ações e resultados rápidos para que sejam atendidas as inúmeras demandas do setor produtivo. Ao mesmo tempo, devem ser considerados múltiplos fatores, tais como a biologia da planta, os patógenos e pragas que afetam a cultura, os interesses do mercado consumidor e dos produtores. Aliados a estes parâmetros, a biologia molecular, por meio de seus marcadores e de diversas ferramentas genômicas, tem-se tornando essencial em pesquisas envolvendo melhoramento genético na maioria das culturas de interesse, visto que aumentam a eficiência e a rapidez no processo de seleção de plantas superiores, proporcionando resultados mais precisos acerca dos objetos de estudo.

Em contrapartida, a necessidade de produzir alimentos com mais eficiência tem levado à alta especialização com reduzida aplicação da variabilidade genética das espécies nas áreas de produção. Sistemas tradicionais de cultivo têm sido progressivamente substituídos por outros altamente produtivos e uniformes, os quais, apesar de serem altamente tecnificados, são frágeis do ponto de vista adaptativo frente às adversidades naturais (COSTA, SPEHAR; SERENO, 2012). Este estreitamento da base genética é preocupante do ponto de vista do melhoramento genético, visto que a principal fonte de trabalho dos melhoristas é a variabilidade genética, havendo então a necessidade de preservar estes bancos genéticos para pesquisas futuras.

Assim, neste capítulo, serão discutidos os principais aspectos e desafios no melhoramento genético de hortaliças, abordando temas como os métodos de melhoramento mais praticados, a manutenção e a exploração dos recursos genéticos, assim como das ferramentas moleculares atualmente utilizadas e aplicadas em diversas hortaliças de interesse econômico.

2 Recursos genéticos e pré-melhoramento

A exploração de recursos genéticos vegetais ocorre desde o início da agricultura, há cerca de 12 mil anos. Com o processo de domesticação e seleção, certas plantas que ofereciam oportunidade alimentícia foram primeiramente cultivadas. Em seguida, com a colonização dos continentes e o começo das expedições para coletas de materiais vegetais, descobriram-se diferentes espécies em regiões distintas, o que estimulou a introdução dessas plantas em novas áreas. Inúmeras expedições têm sido realizadas ao longo dos anos, com diferentes finalidades, desde a conservação da biodiversidade até o uso dos recursos vegetais em programas de melhoramento.

O domínio e a preservação dos recursos genéticos são apontados como

a base para o desenvolvimento de novas cultivares, com características para atender à demanda de um mercado cada vez mais crescente, devido ao aumento populacional. A produção de alimentos e a segurança alimentar são o grande gargalo das nações para os próximos anos. Goedert (2007) ressalta que os níveis atuais da produção agrícola mundial serão insuficientes para satisfazer o aumento da demanda, havendo déficit de cem milhões de toneladas de alimentos por ano. Portanto, são necessários incentivos no desenvolvimento de programas de pré-melhoramento e de melhoramento genético, para suprir a demanda de alimentos e, principalmente, para explorar de forma eficiente e sustentável os recursos fitogenéticos.

O Brasil é considerado um país rico em termos de recursos vegetais. Existem milhares de espécies descritas no território nacional, sendo muitas destas potenciais para a agricultura. Para proteger esta riqueza genética, existem os bancos de conservação, também conhecidos como bancos de germoplasma. São relatados cerca de 250 bancos ativos de germoplasma no Brasil, com cerca de 250 mil acessos. Esses bancos são fontes de alelos, formas alternativas dos genes e que caracterizam a existência de variabilidade genética a ser explorada pelos programas de melhoramento vegetal (FERREIRA; QUEIROZ, 2011).

Considerando as espécies hortícolas, existem diversas instituições públicas e privadas que conservam materiais genéticos em bancos ativos e nucleares. Como exemplo, cita-se a Embrapa, que possui cerca de 15 bancos ativos de germoplasma de hortaliças. Somente a Coleção de Base de Germoplasma Sementes (Colbase), localizada na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília-DF, são mantidos 6.759 acessos de germoplasma de 25 gêneros olerícolas. Dentre estes, destacam-se acessos de alface, berinjela, pimentas e pimentões, cebola, cenoura, brássicas e cucurbitáceas (FERREIRA; QUEIROZ, 2011).

A Embrapa Hortaliças é, atualmente, referência em conservação e uso de recursos genéticos em programas de melhoramento de espécies hortícolas. O banco ativo de germoplasma da unidade possui cerca de 1.850 acessos de pimentas e pimentões, 146 de brássicas, 132 de alho, 2.032 de abóbora e moranga, 110 de alface, 201 de cebola, entre outras espécies, além de 42 acessos de hortaliças não convencionais.

Outras instituições públicas de destaque que preservam materiais genéticos hortícolas são: Instituto Agrônomo de Campinas, Universidade Federal de Viçosa, Universidade Federal de Lavras, Universidade Estadual Norte Fluminense, Embrapa Semiárido e Embrapa Clima Temperado.

As atividades realizadas por estas instituições para a conservação dos recursos vegetais têm como finalidade manter a variabilidade ou ampliar a

base genética e disponibilizá-la para uso em programas de pré-melhoramento, de melhoramento e de biotecnologia.

O pré-melhoramento pode ser definido como o conjunto de atividades que visam à identificação de genes e de características de interesse em germoplasma exótico ou em populações não melhoradas, e sua posterior incorporação em materiais superiores agronomicamente, adaptados e com características comerciais desejáveis (NASS, 2011). Sendo assim, os acessos contidos em um banco de germoplasma devem ser avaliados quanto às características de importância, como resistência a doenças, pragas, estresses abióticos e valor nutricional. O desenvolvimento de programas de pré-melhoramento em hortaliças, assim como em outras culturas, tem sido indicado como alternativa eficaz para promover o aumento do uso dos recursos fitogenéticos.

Neste sentido, como medida protetiva ao patrimônio genético nacional, o Ministério do Meio Ambiente criou o Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen – o qual é um sistema eletrônico criado em 20 de maio de 2015, cuja função é auxiliar o Conselho de Gestão do Patrimônio Genético – CGen – na gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado. Entre outras aplicações, estão: cadastrar acesso ao patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado; ii) cadastrar envio de amostra que contenha patrimônio genético para prestação de serviços no exterior; iii) cadastrar remessa de amostra de patrimônio genético; iv) notificar produto acabado ou material reprodutivo; v) solicitar autorização de acesso ao patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado e de remessa ao exterior; vi) solicitar credenciamento de instituições mantenedoras das coleções *ex situ* que contenham amostras de patrimônio genético; vii) obter comprovantes de cadastros, de remessa e de notificações; viii) obter certidões do procedimento administrativo de verificação; e ix) solicitar atestados de regularidade de acesso. O SisGen pode ser acessado pelo endereço eletrônico: <https://sisgen.gov.br>.

3 Principais métodos de melhoramento em hortaliças

3.1 Hibridação

As vantagens da utilização de híbridos F_1 estão fundamentadas na combinação de diferentes características qualitativas e quantitativas (MALUF, 2001). A hibridação é o método preferível de empresas e de ramos comerciais por permitir a obtenção de cultivares com características favoráveis, tais como: qualidade, precocidade, uniformidade e padronização de frutos, resistência a

doenças e pragas, produtividade e maior invariabilidade do comportamento das plantas sob diferentes condições ambientais. A técnica ainda garante às empresas o retorno financeiro, uma vez que elas são detentoras das linhagens que compõem os híbridos comerciais, o que garante a comercialização das sementes híbridas. A obtenção de híbridos é dada em função da heterose obtida entre o cruzamento de duas linhagens contrastantes e complementares, onde a progênie F_1 apresenta alto vigor. Assim, as técnicas voltadas à produção de híbridos são utilizadas, principalmente, no melhoramento de olerícolas com alto potencial de produção no Brasil, como tomate, melão, pimentão, cebola e cenoura. Por outro lado, a produção de híbridos comerciais pode ser inviabilizada quando a tecnologia da produção de sementes eleva muito seu custo. Como exemplo, cita-se cultura da alface, que apesar de apresentar vigor híbrido, o processo de obtenção de sementes é muito trabalhoso, e a quantidade de sementes obtidas por cruzamento é muito baixa, (aproximadamente 10 a 12 sementes), o que torna a exploração comercial inviável.

3.2 Retrocruzamento

Em hortaliças, o retrocruzamento é um método muito utilizado, tanto para espécies autógamas como para alógamas. É empregado quando se deseja incorporar uma característica mono ou oligogênica em uma linhagem ou cultivar já adaptada, implementando a introgressão de alelos de resistência a patógenos e a pragas em cultivares com alta qualidade e produtividade (NICK; BORÉM, 2016). O retrocruzamento consiste na recuperação de atributos agrônômicos de um genitor recorrente, sendo de interesse a substituição de uma característica indesejável que deve ser fornecida pelo genitor doador. Este método consiste no cruzamento entre dois genótipos, gerando um híbrido F_1 , que será retrocruzado com o genitor recorrente por sucessivas gerações, até a completa recuperação do genoma do parental recorrente (BORÉM; MIRANDA, 2013). O método é muito comum em programas de melhoramento de espécies da família das brássicas, curcubitáceas e solanáceas.

3.3 Método genealógico (Pedigree)

O método genealógico, inicialmente proposto por Nilsson (1914), consiste, a princípio, na seleção individual de plantas da população segregante, tendo como base a avaliação de cada progênie separadamente. A seleção tem início na geração F_2 , na qual se espera o máximo de variabilidade genética. Nas gerações F_3 e F_4 , ainda persiste heterozigose, e a seleção é praticada

pela escolha das melhores plantas dentro das melhores famílias. Nas gerações F_5 e F_6 , é esperado que a maioria das famílias esteja em homozigose para uma grande parte dos loci, enfatizando a seleção entre famílias (ALLARD, 1971). As vantagens destacam-se por permitir o descarte de indivíduos inferiores nas gerações precoces, controle do grau de parentesco entre as seleções, obtenção de dados para estudos genéticos e treinamento dos melhoristas a cada avaliação (BORÉM, 2001). Porém, é um método trabalhoso que demanda tempo, elevada mão de obra e exige qualificação de avaliadores, utilizado para a maioria das espécies olerícolas, como nos programas de melhoramento de abóboras e abobrinhas, alface, brócolis e couve-flor, pimentas e pimentões, pepino e tomate.

3.4 Método descendente de uma única semente - Single Seed Descent (SSD)

O método descrito por Brim (1966), denominado Single Seed Descent (SSD), é uma modificação do método genealógico. A principal vantagem do SSD é a redução do tempo requerido para obtenção de linhagens homozigóticas, sendo que os processos de avaliação e de seleção de genótipos só se iniciam após a obtenção das linhagens em homozigose, e, assim, várias gerações podem ser conduzidas em menor espaço de tempo (BORÉM, 2001). Este procedimento garante que cada linhagem homozigótica na população final corresponda a uma planta da geração F_2 e, portanto, tem-se maior representatividade da variabilidade genética. Além disso, permite que a população segregante possa ser conduzida em ambientes e em condições distintos em que seria cultivada (FEHR, 1978). O método prevê que cada semente de F_2 seja colhida aleatoriamente e separada para compor a próxima geração e assim sucessivamente, sendo o processo repetido até a geração F_6 , quando as plantas individuais são submetidas a teste de progênie e avaliadas separadamente em ensaios de linhagens. A seleção pelo método genealógico em gerações iniciais, aliada ao método SSD nas gerações subsequentes, tem mostrado alta eficiência (VENCOVSKY et al., 2001). O método é empregado, utilizado em programas de melhoramento de pimentas e pimentões, melões, pepinos e tomates.

4 Aplicação dos marcadores moleculares no melhoramento de hortaliças

Os marcadores moleculares são todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso (como isoenzima) ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Estes têm sido usados para sinalização de genes de resistência a doenças, insetos e pragas; avaliação e caracterização de germoplasma; melhoramento dos pais de híbridos; introgressão gênica e seleção auxiliada por marcadores; desenvolvimento de mapas genéticos; determinação de grupos heteróticos e associação com regiões genômicas que afetam heterose; reconstituição de pedigrees; testes de pureza genética; associação com caracteres quantitativos; estudos de interação genótipo-ambiente; processos legais; entre outros (RAFALSKI; TINGEY, 1993; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Em programas de melhoramento, os marcadores moleculares são amplamente utilizados dada suas diversas características que os tornam mais eficientes no processo de seleção, além de aumentarem a possibilidade de obtenção de genótipos superiores em um espaço de tempo menor, em relação ao melhoramento genético vegetal clássico. No entanto, cabe ressaltar que, apesar de o melhoramento clássico demandar mais tempo, é etapa imprescindível para o sucesso da obtenção de cultivares superiores, visto que as avaliações de campo não podem ser substituídas por análises laboratoriais, sendo os marcadores ferramenta auxiliar poderosa e cada vez mais presente em programas de melhoramento vegetal.

Os marcadores conhecidos como RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) foram muito utilizados para análise de similaridade, divergência genética, caracterização de acessos nas culturas da alface (SILVA, SILVA-MANN; CARVALHO, 2010), gênero *Capsicum* (DA COSTA et al., 2006), melão (DANTAS, 2012), cebola (LEITE; ANTHONISEN, 2009), entre outras. No entanto, seu uso também tem sido substituído por técnicas mais modernas e estáveis, pois o RAPD, por suas peculiaridades, possui baixa reprodutibilidade entre laboratórios diferentes, além de não permitir a diferenciação entre indivíduos homozigotos e heterozigotos, o que reduz seu poder de distinção de genótipos (BORÉM; CAIXETA, 2008).

Outro marcador também de expressão dominante é o AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), o qual se baseia na diferença de tamanho dos fragmentos de DNA gerados a partir da digestão deste pelas enzimas de restrição. Tem sido utilizado com certa frequência para estudos voltados à caracterização molecular de acessos de cebola, estudos filogenéticos de aces-

tos de tomate, relações genéticas dentro e entre espécies do gênero *Lactuca spp.*, divergência genética entre acessos de pimentão e pimenta, mapeamento genético de espécies do gênero *Capsicum* e demais hortaliças. Porém, devido ao custo relativamente alto e à extensa metodologia de aplicação, este marcador tem sido aplicado apenas quando seu uso é estritamente necessário (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Assim, marcadores codominantes, tais como os microssatélites, têm sido muito utilizados em programas de melhoramento, visto que são extremamente eficientes na análise molecular devido ao fato de apresentar diversas características de interesse, tais como: natureza codominante e multialélica, elevado nível de polimorfismo, abundância e uniformidade de dispersão por todo o genoma, elevada reprodutibilidade e por apresentarem elevada eficiência quando analisados pela técnica de PCR (BONDRANI et al., 1998; FALEIRO et al., 2004). Este marcador tem abrangência em praticamente todas as culturas de interesse agrônomo, destacando-se estudos sobre detecção de alelos de resistência ao *Begomovirus* (DE CASTRO NIZIO et al., 2009) e fusário (CARRER FILHO et al., 2015) em tomateiro, assim como estudos de divergência e similaridade genética em acessos de melão (CARVALHO et al., 2016), abóbora (PRIORI et al., 2012), cebola (AMS et al., 2017), pimentão (ULHOA et al., 2014), alface (HONG et al., 2015), melancia (CHENG et al., 2016) e muitas outras hortaliças, havendo também a possibilidade de mapeamento genético das espécies em estudo através deste marcador.

Já os marcadores do tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphism) são os mais utilizados para análises genômicas atualmente, visto que apresentam grande interesse para estudos de filogenia da evolução das espécies cultivadas, mapeamento genético e, principalmente, na diferenciação de alelos do mesmo gene (QUIRINO et al., 2003). Devido à sua peculiaridade em identificar alterações nas bases nitrogenadas uma a uma, ao longo da cadeia de DNA, este marcador vem sendo amplamente utilizado em estudos de melhoramento de hortaliças.

A partir do exposto, teve-se breve exposição das aplicações dos principais marcadores moleculares utilizados em melhoramento de hortaliças. No entanto, cabe ressaltar que estudos desta natureza evoluem rapidamente e compete aos pesquisadores adaptar seus experimentos de acordo com a necessidade e a precisão dos resultados pretendidos. Conclui-se, portanto, que os marcadores moleculares, se bem aplicados, fornecem informações preciosas acerca das estruturas genéticas e do funcionamento dos organismos, de maneira que o uso cadenciado e responsável destes dados é de extrema importância para o avanço da ciência em torno do melhoramento genético de plantas.

5 Perspectivas e Desafios

A população mundial atingirá a marca de 9,8 bilhões de pessoas em 2050, com incremento anual médio de 83 milhões de pessoas (FAO, 2018). Esse aumento populacional resultará em maior demanda por alimentos, energia e água em 70%, 50% e 40%, respectivamente (FAO, 2018). Ao mesmo tempo que existe a necessidade de produzir mais alimentos, as mudanças climáticas decorrentes do aquecimento global estão entre os principais fatores que podem limitar a segurança alimentar. Diante disso, um dos grandes desafios dos melhoristas de plantas, incluindo aqueles que trabalham com hortaliças, será o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas às variações ambientais, selecionando genótipos que apresentem maior capacidade de aproveitamento d'água, que suportem o cultivo em temperaturas mais elevadas e que tenham maior aproveitamento dos nutrientes disponíveis no solo. Para tanto, além dos métodos clássicos de melhoramento, indispensável dentro de um programa, serão necessárias aplicações multidisciplinares na obtenção dessas novas cultivares, tais como: biotecnologia (seleção assistida por marcadores moleculares, mapeamento genético, seleção genômica, edição genômica e organismos geneticamente modificados), fisiologia vegetal, fitopatologia, nutrição de plantas e estatística experimental.

Referências

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blucher, 381p. 1971

AMS, L.; SANTOS, C.; da SILVA, A. M., da COSTA, S. R. Seleção molecular assistida para a identificação de alelo para cor rósea em população de cebola roxa. In: **Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO, 12., 2017, Petrolina. **Anais...** Petrolina: Embrapa Semiárido, 2017.

BORÉM, A. 2001. **Melhoramento de Plantas**. 3. ed. Viçosa: UFV, 500p.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. Marcadores moleculares. 2. ed. Viçosa-MG: UFV, 2008. v.1, 532p.

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

BRIM, C.A. 1966. A modified pedigree method of selection in soybeans. **Crop Science**, 6 (1); p. 220.

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.97, p.816-827, 1998.

CARRER FILHO, R.; OLIVEIRA, R. M.; DIAS, V. D.; BOITEUX, L. S.; DE CAMPOS DIANESE, Ê.; da CUNHA, M. G. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 12, p. 1.225-1.231, 2015.

CARVALHO, N.; LEITE, P. D. S.; CANELA, F. M.; FERREIRA, M. A.; OLIVEIRA, V. R.; SANTOS, M. F.; BUSO, G. S. C. Análise genética e caracterização molecular de cultivares comerciais de melão utilizando marcadores moleculares SSR. In: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 4., 2016, Curitiba. Recursos genéticos no Brasil: a base para o desenvolvimento sustentável: **anais**. Brasília-DF: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2016.

CHENG, Y.; LUAN, F.; WANG, X.; GAO, P.; ZHU, Z.; LIU, S.; ZHANG, Y. Construction of a genetic linkage map of watermelon (*Citrullus lanatus*) using CAPS and SSR markers and QTL analysis for fruit quality traits. **Scientia horticulturae**, v. 202, p. 25-31, 2016.

CNA BRASIL – Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Balanço 2016 - Perspectivas 2017. Disponível em: <www.cnabrazil.org.br/sites/default/files/sites/default/files/uploads/11_hortalicas.pdf> Acesso em: 15 mar. 2018.

COSTA, A. M.; SPEHAR, C. R.; SERENO, J. R. B. (2012). Conservação de recursos genéticos no Brasil. **Embrapa Cerrados-Livro científico (ALICE)**, 2012.

DA COSTA, F. R.; PEREIRA, T. N. S.; VITÓRIA, A. P.; DE CAMPOS, K. P.; RODRIGUES, R.; da SILVA, D. H.; PEREIRA, M. G. Genetic diversity among Capsicum accessions using RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Technology**, v. 6, n. 1, p. 18, 2006.

DANTAS, A. C. D. A.; NUNES, G. H. S.; ARAÚJO, I. S.; ALBUQUERQUE, L. B. Caracterização molecular de acessos de melão coletados no Nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, p. 183-189, 2012.

DE CASTRO NIZIO, D. A.; MALUF, W. R.; DOS REIS FIGUEIRA, A.; NOGUEIRA, D. W.; de FÁTIMA SILVA, V.; NETO, Á. C. G. Caracterização de genótipos de tomateiro resistentes a begomovírus por marcador molecular codominante ligado ao gene Ty1. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n.12, p. 1.699-1.705, 2009.

FALEIRO, F. G. (2007). **Marcadores genéticos-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. EMBRAPA Cerrados, Planaltina-DF.102p.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2017. The future of food and agriculture – Trends and challenges. Rome. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i6583e.pdf>> Acesso em: 12 mar 2018.

FEHR, W.R. Principles of cultivar development: theory and technique. Ames, Iowa: **Macmillan Publishing Company**. v.1. 536p. 1987.

FERREIRA, M.A.J.F.; QUEIROZ, M.A. Pré-melhoramento de hortaliças. In: LOPES, M.A.; FÁVERO, A.P.; FERREIRA, M.A.J.F.; FALEIRO, F.G.; FOLLE, S.M.; GUIMARÃES, E.P. **Pré-melhoramento de plantas**: Estado da arte e experiências de sucesso. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. p. 509-526.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.220. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

GOEDERT, C.O. História e avanços em recursos genéticos no Brasil. In: NASS, L.L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnológicos, 2007. p. 23-60.

HONG, J. H.; KWON, Y. S.; MISHRA, R. K.; KIM, D. H. Construction of EST-SSR databases for effective cultivar identification and their applicability to complement for lettuce (*Lactuca sativa* L.) distinctness test. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 01, p. 113, 2015.

LEITE, D. L., ANTHONISEN, D. (2009). Caracterização molecular de cultivares de cebola por marcadores RAPD. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 420-424, 2009.

MALUF WR. Heterose e emprego de híbridos F1 em hortaliças. In: NASS LL; VALOIS A.C.C.; MELO I.S.; VALADARES M.C. (eds). **Recursos genéticos e melhoramento**: plantas. Rondonópolis: Fundação MT. p.650- 671. 2001.

NASS, L.L.(Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnológicos, 2007. 858p.

NICK, C.; BOREM, A. (Ed.) **Melhoramento de hortaliças**. Viçosa-MG: Editora UFV, 465p. 2016.

NICK, C.; BOREM, A. **Melhoramento de hortaliças**. 1. ed. UFV, 464p. 2016.

NILSSON, H. Plant-Breeding in Sweden. Pioneer work of the Svalöf Institute has resulted in revolution in breeding methods throughout the world – the theory and practice of pedigree cultures – hybridizing now being taken up – new varieties put in the trade. **Journal of Heredity**, 5, p. 281-296. 1914.

PRIORI, D.; BARBIERI, R. L.; CASTRO, C. M.; OLIVEIRA, A. C.; VILELLA, J. C.; MISTURA, C. C. Caracterização molecular de variedades crioulas de abóboras com marcadores microssatélites. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 3, 2012.

QUIRINO, M. S. **Polimorfismo de sequência nucleotídica em fragmentos genômicos de cana-de-açúcar homólogos a genes de resistência**. 2003. 52f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

SILVA, S. A.; SILVA-MANN, R., & CARVALHO, S. V. (2010). Diversidade Genética e Seleção Assistida por Marcadores moleculares RAPD em populações de alface. **Scientia Plena**, v. 6, n. 3, 2010.

ULHOA, A. B., PEREIRA, T. N.; SILVA, R. N.; RAGASSI, C. F.; RODRIGUES, R.; PEREIRA, M. G.; REIFSCHNEIDER, F. J. Molecular characterization of inbred lines of yellow Jalapeño pepper. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 35-40, 2014.

VEIGA, R.F.A.; QUEIROZ, M.A. **Recursos fitogenéticos**: a base da agricultura sustentável no Brasil. Viçosa-MG: Editora UFV, 2015. 496p.

VENCOVSKY, R.; PEREIRA, M.B.; CRISÓSTOMO, J.R.; FERREIRA, M.A.J.F. Genética e melhoramento de populações mistas. In: NASS, L.L.; VALOAIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Org.) **Recursos genéticos e melhoramento**. 1. ed. Rondonópolis: Fundação MT, p.231-281. 2001.

Capítulo 3



Ferramentas de edição genômica aplicadas no melhoramento genético de plantas para resistência a fitopatógenos

Helen Alves Penha

Bruno Weiss

Jéssica Alcimari Ferreira Mello

Daniela Konrad

Maria Inês Tiraboschi Ferro

1 Introdução

Um dos principais objetivos do melhoramento genético de plantas de interesse agrônômico é o desenvolvimento de cultivares de plantas com resistência ou tolerância a estresses bióticos e abióticos. Dentre os fatores bióticos, destaca-se a busca por resistência ou tolerância a fitopatógenos. Os fitopatógenos (bactérias, fungos, vírus, viroides, protozoários, nematoides e moluscos) são responsáveis por prejuízos de bilhões de dólares anuais, afetando a cadeia produtiva das mais diversas espécies de plantas de importância agrônômica. O combate aos fitopatógenos é realizado principalmente através do uso de defensivos agrícolas, o que eleva os custos de produção. Ainda, quando tais defensivos são utilizados de maneira inadequada, podem causar danos ao meio ambiente. Além disso, mudanças ambientais relacionadas às variações climáticas podem afetar a dispersão de fitopatógenos; também, com o uso indiscriminado de defensivos agrícolas, pode ocorrer o

surgimento de linhagens resistentes. Associado a estes fatos, o aumento da demanda por produtos de origem agrícola, ocasionado principalmente pelo crescimento demográfico observado nas últimas décadas, torna premente o desenvolvimento de plantas mais produtivas, adaptadas a ambientes adversos, e resistentes a fitopatógenos.

Os métodos convencionais de melhoramento para o desenvolvimento de cultivares resistentes ou tolerantes a fitopatógenos baseiam-se na transferência, por cruzamento, de alelos de resistência presentes em plantas encontradas na natureza seguida por seleção fenotípica. Entretanto, a descoberta e a disponibilidade de alelos que resultem em uma característica agronomicamente favorável para a planta, principalmente relacionada à resistência ou à tolerância a fitopatógenos, são restritas, o que limita o potencial desta abordagem. Outra abordagem que foi e ainda tem sido utilizada para aumentar a variabilidade genética, e assim gerar plantas com características desejáveis, como resistência a patógenos, é a mutagênese por radiação ou agentes químicos, as quais geram mutações ao acaso.

A partir do desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante e da Engenharia Genética, na década de 1970, foi possível o desenvolvimento de diversas técnicas moleculares capazes de serem aplicadas no melhoramento de plantas. Dentre estas técnicas, está a identificação de marcadores moleculares associados a características agrônomicas de interesse e seu uso para a seleção assistida por marcadores moleculares, acelerando o processo de obtenção de plantas com características desejadas (COLLARD; MACKILL, 2008). A grande vantagem da abordagem molecular está na possibilidade de manipulação direta de genes de interesse presentes em qualquer organismo, incluindo-se aqueles relacionados à resistência ou à tolerância a fitopatógenos.

A introdução de sequências de DNA sintético ou provenientes de outras espécies no genoma de plantas tem levado à obtenção de plantas geneticamente modificadas (PGMs) que expressam características de interesse (RINALDO; AYLIFFE, 2015), como, por exemplo, aumento da qualidade nutricional, resistência a um determinado herbicida, doença ou praga. Os transgênicos são considerados como um dos maiores avanços no melhoramento do germoplasma de espécies cultiváveis, sendo que já estão disponíveis no comércio de plantas que: (i) apresentam maior crescimento e, conseqüentemente, maior produção; (ii) possuem sistemas de controle de polinização; (iii) apresentam melhor qualidade de seus produtos; (iv) toleram o estresse abiótico e herbicidas; (v) além de plantas que apresentam resistência a insetos e a doenças causadas por fitopatógenos (vírus e fungos).

Em 1998, Fire e colaboradores identificaram um mecanismo celular responsável pelo silenciamento gênico pós-transcricional, denominado de

RNA de interferência (RNAi). O RNAi atua clivando moléculas de RNA mensageiro, podendo inibir completamente ou reduzir a expressão de um gene em particular. O mamão do Havaí, resistente ao vírus da mancha anelar do mamoeiro (FITCH et al., 1992), e o feijão da Embrapa, resistente ao vírus do mosaico dourado (BONFIM et al., 2007), são exemplos de PGMs obtidas usando RNAi no controle contra fitopatógenos.

Na última década, novas tecnologias no melhoramento de plantas (*New Plant Breeding Techniques* - NPBTs), baseadas em modificações precisas no genoma, foram desenvolvidas. Estas tecnologias, que podem ser utilizadas para a obtenção de cultivares de plantas resistentes a fitopatógenos, incluem a Cisgenia, Intragenia, Enxertia em Porta-Enxerto Geneticamente Modificado, Agroinfiltração (Agroinfiltração *strictu sensu*, Agroinoculação e Imersão Floral - floral dip), Melhoramento Reverso (Reverse Breeding), Metilação do DNA Dependente de RNA (RNA Dependent DNA Methylation), Mutagênese Direcionada por Oligonucleotídeo (Oligo Directed Mutagenesis - ODM), RNA Interferente (RNAi), Vetor Viral e Biologia Sintética (Synthetic Biology) (LUSSER et al., 2011; HARTUNG; SCHIEMANN, 2014).

Mais recentemente, uma tecnologia capaz de revolucionar a obtenção de plantas com características desejáveis é a edição de genomas por Nucleases Sítio Dirigidas (Single Directed Nucleases), dada a precisão e a relativa facilidade das modificações que são feitas no genoma através desta técnica (RINALDO; AYLIFFE, 2015). Estas tecnologias de edição genômica baseiam-se, de maneira simplificada, na dupla quebra no DNA em sítios particulares, levando a célula a ativar o sistema de reparo de DNA via recombinação homóloga ou ligação de extremidades não homólogas. Na natureza, isso pode resultar em nocautes gênicos, substituições, inserções e rearranjos cromossômicos em *loci* particulares. A atividade de reparo de DNA pode ser manipulada, permitindo que estas modificações sejam realizadas de maneira controlada em laboratório.

2 Ferramentas de edição Genômica

A edição de genomas via Nucleases Sítio Dirigidas (SDNs) é realizada por quatro técnicas, denominadas meganucleases (ROUET et al., 1994), - ZFNs (Zinc Finger Nucleases) (KIM et al., 1996), TALENs (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) (CHISTIAN et al., 2010), e a CRISPR/Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas nuclease*) (JINEK et al., 2012). As meganucleases foram as primeiras ferramentas de edição genômica utilizadas e consistem em nucleases naturais com sítios de reconhecimento que podem ser modificados artificialmente para identificar

e clivar alvos específicos. As ZNFs e TALENs são técnicas que utilizam nucleases quiméricas e adaptadas para atuar em genes particulares (FENG et al., 2013). A última grande novidade tecnológica em edição de genomas é baseada na clivagem sítio-específica por nucleases guiadas por RNA, as CRISPR/Cas (BORTESI; FISHER, 2015).

Um detalhamento, para melhor compreensão sobre estes quatro sistemas e uma visão sobre suas aplicações em estudos de edição genômica em plantas, no melhoramento contra fitopatógenos, será feito a seguir.

2.1 Edição genômica via Meganucleases

As meganucleases foram as primeiras enzimas utilizadas como ferramentas de edição genômica. Estas endonucleases estão envolvidas em modificação genômica como rearranjos, proteção e reparo de DNA. São consideradas enzimas de restrição naturais em diversos organismos, como arqueias, bactérias, fagos, fungos, leveduras e algas. As meganucleases possuem um domínio de reconhecimento de DNA, o qual é capaz de reconhecer sequências longas de 12 a 40 pares de bases em um dado genoma e clivar, atuando como verdadeiras “tesouras moleculares” (STODDARD, 2011) (Figura 1A).

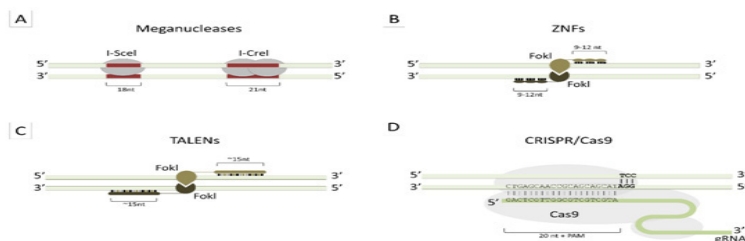


Figura 1. Representação esquemática dos quatro sistemas de edição genômica ligados ao DNA (verde-claro). (A) Meganucleases da família LAGLIDADG ligadas ao DNA-alvo com seus respectivos motivos catalíticos (vermelho), mostrando duas das melhores endonucleases caracterizadas: I-SceI (reconhece 18 nucleotídeos) e I-CreI (reconhece 21 nucleotídeos) (cinza). (B) Dímero de ZFN ligado ao sítio de reconhecimento no DNA. Cada monômero possui três dedos de zinco (verde-claro), que contêm três bases cada (preto), e encontra-se fusionado ao domínio de clivagem da endonuclease FokI. (C) Dímero de TALEN ligado ao DNA. Os TALENs são uma fusão entre as proteínas de ligação contendo os dirresíduos de repetições

variáveis (~15 nucleotídeos) com o domínio de clivagem da endonuclease *FokI*. (D) CRISPR/Cas9 interagindo com o DNA-alvo. O complexo CRISPR/Cas9 consiste no domínio catalítico da endonuclease Cas9 (cinza-claro) ligado a um RNA guia (gRNA). A sequência “AGG” (em negrito) representa o *Protospacer Adjacent Motif* (PAM), localizado imediatamente *downstream* da sequência de 20 nucleotídeos que são complementares às sequências do DNA-alvo.

Para serem utilizadas como ferramentas de edição genômica, o domínio de reconhecimento de uma meganuclease pode ser modificado para reconhecer um *locus* de interesse, com o uso da engenharia genética. Essas enzimas são modificadas artificialmente através de técnicas moleculares e utilizadas para edição genômica em diversos organismos. Esta técnica levou a uma revolução na engenharia genética em diversas áreas, incluindo no melhoramento genético de plantas (STODDARD, 2011).

Diversas aplicações do sistema de meganuclease em edição genômica foram utilizadas em plantas de importância agrônômica. O algodão, por exemplo, teve seu genoma editado através desta técnica, no qual foi realizada a inserção dos genes *hpss* e *epsps*, que conferem resistência a um herbicida, em um sítio específico adjacente ao *locus* transgênico (*cry2Ae* e *bar*), que confere resistência a insetos. Este exemplo ilustra a capacidade desta ferramenta para introduzir ou modificar características agrônômicas favoráveis à cultura, incluindo *locus* que possam conferir resistência a fitopatógenos (D’HALLUIN; RUITER, 2013).

2.2 Edição genômica via *Zinc Finger Nucleases* (ZFNs)

As *Zinc Finger Nucleases* (ZFNs) são endonucleases sintéticas, desenvolvidas exclusivamente para clivar sequências de DNA particulares em genes (KIM et al., 1996). Esta ferramenta foi originada a partir de estudos da enzima de restrição natural *FokI*, encontrada em diversos organismos, que apresenta dois domínios: o primeiro relacionado com o reconhecimento do sítio-alvo na molécula de DNA, e o segundo com atividade de clivagem da fita de DNA. Assim como a *FokI*, as ZFNs são constituídas por dois domínios funcionais, porém modificados com a finalidade de aplicação como ferramenta de edição genômica (Figura 1B). O domínio de ligação ao DNA consiste na fusão de três a seis proteínas de DNA *zinc finger* que reconhecem, cada uma, três bases de DNA e encontram-se organizadas em tandem. Fusionado a esse domínio, temos o domínio nuclease, proveniente da enzima *FokI* (CARROLL, 2011). Como esse domínio não é sítio-específico, o domínio de ligação é modificado

de maneira a reconhecer segmentos particulares de DNA, direcionando a clivagem nos sítios-alvo de interesse (KIM; CHANDRASEGARAN, 1994; KIM et al. 1996, 1998). O ZNF liga-se a uma sequência específica de cada lado do sítio de clivagem, resultando em um dímero e permitindo especificidade de ligação de 18 a 24 pares de bases (RINALDO; AYLIFFE, 2015).

Este sistema já foi utilizado no melhoramento genético de plantas, visando à resistência a patógenos. Como exemplo, ZNFs sintéticos inibiram a replicação do vírus do frisado amarelo do tomateiro (*Tomato Yellow Leaf Curl Virus* – TYLCV), levando ao desenvolvimento de plantas resistentes a esse vírus (TAKENAKA et al., 2007), demonstrando seu potencial no melhoramento genético de plantas, visando à resistência a fitopatógenos.

2.3 Edição genômica via TALENs

Os *Transcription Activator Like Effectors* (TALEs) são uma classe de enzimas, naturalmente encontrada em bactérias do Gênero *Xanthomonas*, que são capazes de se ligar a sequências específicas do DNA e modular a transcrição de genes, ou seja, apresentam atividade análoga a fatores de transcrição (BOGDANOVE et al., 2010). A partir da elucidação deste mecanismo, foi possível o desenvolvimento de nova ferramenta de edição genômica, os *Transcription Activator-Like Effector Nucleases* (TALENs) sintéticos, baseando-se no princípio da ligação dos TALEs a sequências de DNA particulares, e o fuscionamento a um domínio da nuclease *FokI*, mecanismo semelhante ao sistema de edição genômica ZNF. Os TALENs podem ser construídos com 15 a 20 dirresíduos de repetições variáveis. Assim como em ZNFs, cada TALEN liga-se a uma sequência particular de cada lado do sítio de clivagem, conferindo uma especificidade mínima de 30 pares de bases, o que torna TALENs uma ferramenta de edição genômica mais precisa e vantajosa em relação às meganucleases e ZNFs (Figura 1C) (CHRISTIAN et al., 2010; JOUNG; SANDER, 2013; BALTES; VOYTAS, 2015).

Assim como nas demais ferramentas de edição genômica, os TALENs podem ser utilizados para o melhoramento genético de plantas visando à resistência a fitopatógenos. Como exemplo, Wang (2014) e sua equipe utilizaram a metodologia de edição genômica TALEN (juntamente com a metodologia CRISPR/Cas9, que será descrita a seguir) em trigo hexaploide, e obtiveram plantas resistentes ao oídio - doença causada por fungos unicelulares que afeta grande variedade de plantas.

Em outro exemplo, esta tecnologia foi aplicada contra a mancha bacteriana - doença responsável pela perda de grandes produções de arroz (*Oryza sativa* L.), onde os pesquisadores responsáveis obtiveram resistência à bacté-

ria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) (LI et al., 2012; BLANVILLAIN-BAUFUMÉ et al., 2017). A metodologia utilizada para a edição do genoma do trigo e do arroz pode ser facilmente modificada e aplicada em outras culturas, demonstrando o potencial da ferramenta de edição genômica TALEN na modificação genética, no melhoramento de plantas para resistência a diversas pragas.

2.4 Edição Genômica via o sistema CRISPR

A tecnologia de edição genômica CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats* - repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas) é baseada em nucleases guiadas por RNA, e é considerada mais robusta, acessível e de fácil desenvolvimento que as demais (CHEN; GAO, 2015). Esta tecnologia surgiu a partir da observação e da pesquisa sobre quais proteínas e RNAs são utilizadas por bactérias na resposta contra a invasão por bacteriófagos (TRAVIS, 2015). Este sistema de defesa foi adaptado para editar fragmentos de DNA em mamíferos e plantas, e otimizado para se tornar a ferramenta de edição genômica mais utilizada do mundo. A transição do sistema CRISPR/Cas para uma ferramenta de edição genômica ocorreu pelo fato de ser possível desenvolver um RNA-guia (gRNA), que consiste em um pequeno RNA sintético composto por um crRNA com 20 nucleotídeos reprogramados para uma sequência particular, e um tracrRNA (RNA de interferência), os quais atuam juntamente com a endonuclease Cas e clivam a sequência desejada. Desta forma, o sistema complexo CRISPR/Cas natural em procariotos foi simplificado e pode ser sintetizado artificialmente para ser utilizado em edição genômica (JINEK et al., 2012; JIA; WANG, 2014) (Fig. 1D).

O sistema CRISPR/Cas9 também é utilizado como ferramenta no combate a diversos fitopatógenos. Como exemplos, tem-se o desenvolvimento de protoplastos de trigo resistentes ao fungo causador do Oídeo (SHAN et al., 2013), de plantas de toranja (*Citrus paradisi* Macf.) resistentes à *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (JIA et al., 2016) e na criação de plantas de *Nicotiana benthamiana* e tomate (*Solanum lycopersicum*) imunes ao vírus do frisado amarelo do tomateiro (*Tomato Yellow Leaf Curl Virus* – TYLCV) (MAHFOUZ et al., 2017). Ainda, foi realizada a primeira aplicação da tecnologia no genoma no cacau (*Theobroma cacao*), resultando em aumento da resistência à infecção pelo patógeno do cacau *Phytophthora tropicalis* (FISTER et al., 2018).

3 Considerações finais

O processo de seleção de variedades resistentes a patógenos é uma atividade de execução tradicionalmente demorada, pois tais processos são essencialmente complexos e demandam elaboração de projetos equivalentemente custosos. Desta maneira, a busca de soluções na natureza, que podem ser manipuladas e controladas em laboratório e aceleram o desenvolvimento de soluções agronômicas, mostra-se de grande benefício para a comunidade científica envolvida nestas atividades. Nesta busca, alguns métodos foram desenvolvidos com vasta aplicação e precisão, dentre os quais estes aqui apresentados. Embora algumas destas ferramentas sejam mais frequentemente utilizadas atualmente, todas estas apresentadas já foram e ainda são largamente utilizadas em procedimentos de edição genômica de plantas visando ao melhoramento genético. Devido às características do sistema CRISPR/Cas9, esta é a ferramenta mais utilizada na edição genômica de plantas atualmente. Supõe-se que, no futuro, teremos variedades desenvolvidas com resistência às suas principais pragas via sistema CRISPR, reduzindo a necessidade do uso de insumos químicos combatentes de patógenos de plantas, o que representa um grande avanço científico, socioeconômico e ambiental. A pesquisa de processos precisos e manipuláveis de edição genômica leva ao desenvolvimento de novos procedimentos com maior aplicabilidade, inclusive na seleção de variedades cultivadas resistentes a fitopatógenos, mostrando a prolifidade científica e a valia social dos estudos neste campo científico.

Referências

- BALTES, N. J.; VOYTAS, D. F. Enabling plant synthetic biology through genome engineering. **Trends in biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 120-131, 2015.
- BLANVILLAIN-BAUFUMÉ, S.; RESCHKE, M.; SOLÉ, M.; AUGUY, F.; DOUCOURE, H.; SZUREK, B.; MEYNARD, D.; PORTEFAIX, M.; CUNNAC, S.; GUIDERDONI, E.; BOCH, J.; KOEBNIK, R. Targeted promoter editing for rice resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* reveals differential activities for SWEET14-inducing TAL effectors. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 3, p. 306-317, 2017.
- BONFIM, K.; FARIA, J.C.; NOGUEIRA, E.O.P.L.; MENDES, E. A.; ARAGÃO, F.J.L. RNAi-mediated resistance to *Bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Molecular Plant-microbe interactions**, v. 20, n. 6, p. 717-726, 2007.

BOGDANOVE, A. J.; SCHORNACK, S.; LAHAYE, T. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. **Current opinion in plant biology**, v. 13, n. 4, p. 394-401, 2010.

BORTESI, L.; FISCHER, R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 1, p. 41-52, 2015.

CARROLL, D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. **Genetics**, v. 188, n. 4, p. 773-782, 2011.

CHEN, K.; GAO, C. Targeted Gene Mutation in Plants. In: LI, X.; DONNELLY, D.J.; JENSEN, T.G. **Somatic Genome Manipulation**. Springer-Verlag, cap. 12, p. 253-272, 2015.

CHRISTIAN, M.; CERMAK, T.; DOYLE, E.L.; SCHMIDT, C.; ZHANG, F.; HUMMEL, A.; BOGDANOVE, A.J.; VOYTAS, D.F. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. **Genetics Society of America**, v. 186, n. 2, p. 757-761, 2010.

COLLARD, B.C.Y.; MACKILL, D.J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1491, p. 557-572, 2008.

D'HALLUIN, K.; RUITER, R. Directed genome engineering for genome optimization. **International Journal of Developmental Biology**, v. 57, n. 6-7-8, p. 621-627, 2013.

FENG, Z.; ZHANG, B.; DING, W.; LIU, X.; YANG, D.; WEI, P.; CAO, F.; ZHU, S.; ZHANG, F.; MAO, Y.; ZHU, J. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. **Cell research**, v. 23, n. 10, p. 1229, 2013.

FIRE, A.; XU, S.; 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**, v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998.

FISTER, A.S.; LANDHERR, L.; MAXIMOVA, S.N.; GUILTINAN, M.J. Transient Expression of CRISPR/Cas9 machinery targeting *TcNPR3* enhances defense response in *Theobroma cacao*. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 268, 2018.

FITCH, M.M.; MANSHARDT, R.M.; GONSALES, D.; SLIGHTOM, J.L.; SANFORD, J.C. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. **Nature Biotechnology**, v. 10, n. 11, p. 1.466-1.472, 1992.

HARTUNG, F.; SCHIEMANN, J. Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU. **Plant Journal**, v. 78, n. 5, p. 742-752, 2014.

JIA, H.; WANG, N. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93.806, 2014.

JIA, H.; ORBOVIC, V.; JONES, J.B.; WANG, N. Modification of the PthA4 effector binding elements in Type I CsLOB1 promoter using Cas9/sgRNA to produce transgenic Duncan grapefruit alleviating XccDpthA4:dCsLOB1.3 infection. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 5, p. 1.291-1.301, 2016.

JINEK, M.; CHYLINSKI, K.; FONFARA, I.; HAUER, M.; DOUDNA, J.A.; CHARPENTIER, E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**, v. 337, n. 6.096, p. 816-821, 2012.

JOUNG, J.K.; SANDER, J.D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 1, p. 49-55, 2013.

KIM, Y.G.; CHANDRASEGARAN, S. Chimeric restriction endonuclease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 3, p. 883-887, 1994.

KIM, Y.G.; CHA, J.; CHANDRASEGARAN, S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to *FokI* cleavage domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 3, p. 1.156-1.160, 1996.

KIM, Y.G.; SMITH, J.; DURGESHA, M.; CHANDRASEGARAN, S. Chimeric restriction enzyme: Gal4 fusion to *FokI* cleavage domain. **Biological chemistry**, v. 379, n. 4-5, p. 489-496, 1998.

LI, T.; LIU, B.; SPALDING, M.H.; WEEKS, D.P.; YANG, B. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 390-392, 2012.

LUSSER, M.; PARISI C.; PLAN D.; RODRIGUEZ-CEREZO, E. New plant breeding techniques: State-of-the-art and prospects for commercial development. European Commission Joint Research Centre. **Institute for Prospective Technological Studies JRC**, v. 63.971, p. 1-39, 2011.

MAHFOUZ, M.M.; TASHKANDI, M.; ALI, Z.; ALJEDAANI, F.; SHAMI A. **Engineering resistance against Tomato yellow leaf curl virus via the CRISPR/Cas9 system in tomato**. 2017.

RINALDO, A.R.; AYLIFFE, M. Gene targeting and editing in crop plants: a new era of precision opportunities. **Molecular Breeding**, v. 35, n. 1, p. 40, 2015.

ROUET, P.; SMIH, F.; JASIN, M. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 13, p. 6.064-6.068, 1994.

SHAN, Q.; WANG, Y.; LI, J.; ZHANG, Y.; CHEN, K.; LIANG, Z.; ZHANG, K.; LIU, J.; XI, J.J.; QIU, J.L.; GAO, C. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 686-688, 2013.

STODDARD, B.L. Homing endonucleases: from microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification. **Structure**, v. 19, n. 1, p. 7-15, 2011.

TAKENAKA, K.; KOSHINO-KIMURA, Y.; AOYAMA, Y.; SERA, T. Inhibition of tomato yellow leaf curl virus replication by artificial zinc-finger proteins. In: **Nucleic Acids Symposium Series**. Oxford University Press, v. 51, p. 429-430, 2007.

TRAVIS, J. Making the cut – CRISPR genome-editing technology shows its power. **Science**, v. 350, n. 6267, p. 1456-1457, 2015.

WANG, Y.; CHENG, X.; SHAN, Q.; ZHANG, Y.; LIU, J.; GAO, C.; QIU, J.L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 9, p. 947-951, 2014.

Capítulo 4



Melhoramento de Forrageiras Tropicais Apomíticas

Naiara Scarabeli Zancanari

Kevyn Belonssi de Oliveira

Kian Eghrari Moraes

Flávia Alves Marques da Silva

Gustavo Vitti Môro

1 Introdução

A pecuária bovina brasileira coloca o Brasil numa posição de destaque no mercado internacional, e estudos apontam o Brasil como o detentor do segundo maior efetivo de bovinos do mundo, sendo responsável por 22,2% do rebanho mundial, atrás apenas da Índia. O País foi também o segundo maior produtor de carne bovina, responsável por 15,4% da produção global. Os Estados Unidos (maior produtor mundial), o Brasil e a União Europeia, juntos, representaram quase metade de toda a carne produzida no mundo, em 2016. (IBGE, 2016).

Quando se trata da produção a pasto, o Brasil é o maior produtor mundial de leite e carne bovina. Esses produtos possuem expressiva participação no PIB nacional e nas exportações brasileiras. As cadeias de carne e leite têm nas pastagens a principal fonte de alimento para o rebanho, e 31,54% do território brasileiro é ocupado por áreas de pastagens, sendo 12,12% ocu-

pado por forrageiras cultivadas, e o restante constituído de pastagens naturais (IBGE, 2014).

Os pastos brasileiros compõem-se, em quase sua totalidade, de cultivares forrageiras tropicais, sendo que as dos gêneros *Brachiaria* e *Megathyrsus* apresentam maior importância. A maior parte das espécies desses gêneros é caracterizada, segundo seu modo reprodutivo, como espécie apomítica. A apomixia corresponde à formação de sementes sem a ocorrência de fecundação prévia, onde são mimetizados muitos dos eventos da reprodução sexual até dar origem às sementes férteis. Este modo de reprodução já tem sido constatado em cerca de 300 espécies, incluídas em 95 gêneros de 35 famílias de monocotiledôneas e dicotiledôneas. (Nygren apud BROWN; EMERY, 1958; MARSHALL; BROWN, 1981).

Estima-se que mais de 80% da área com pastagens cultivadas no Brasil utilizam cultivares do gênero *Brachiaria* e *Megathyrsus*. As forrageiras tropicais apomíticas adaptam-se bem às condições brasileiras de clima e solo e permitem bom desenvolvimento do rebanho bovino; no entanto, apesar do bom desempenho, a produtividade animal nas pastagens tropicais ainda é baixa se comparada à capacidade de seu potencial produtivo.

Esse desempenho inferior pode ser atribuído a três fatores básicos: uso de cultivares não melhoradas; uso de áreas marginais ou de baixa fertilidade e manejo inadequado das pastagens. Entre esses fatores, o desenvolvimento de cultivares geneticamente melhoradas apresenta-se como a alternativa mais viável e de maior potencial para o aumento da produtividade das pastagens brasileiras (FERNANDES, VALÉRIO; FERNANDES, 2000).

O melhoramento genético de espécies forrageiras apomíticas poderá propiciar o aumento do desempenho das cultivares forrageiras, que acarretará uma série de benefícios, sendo eles, principalmente, o aumento da qualidade e de produtividade dos pastos, o melhor aproveitamento dos mesmos pelos animais, melhor qualidade e quantidade de carne e leite, maiores ganhos econômicos e menores impactos ambientais.

Assim, neste capítulo, abordaremos assuntos referentes ao melhoramento de espécies apomíticas forrageiras, recorrendo sobre temas relacionados à apomixia, bem como à aplicação de marcadores moleculares.

2 Origem e formação de sementes apomíticas

Para explicar os mecanismos envolvidos na formação de sementes apomíticas, adotaremos a espécie *Megathyrsus maximus* (classificada anteriormente como *Panicum maximum*) como exemplo. O modo de reprodução de plantas apomíticas é a base para a aplicação deste sistema no melhoramento genético de forrageiras apomíticas.

O centro de diversidade de várias forrageiras apomíticas tropicais é a África. Em relação a *M. maximus*, seu centro de origem é o leste da África, mais especificamente nos países Tanzânia, Quênia e Uganda. As forrageiras africanas são mais adaptadas ao pastejo, pois seu processo de evolução envol-

veu a alimentação e o pisoteio, por milhares de anos, de animais herbívoros de grande porte (CUMMING, 1982), mas se este pastejo for intenso, a degradação das savanas pode chegar a até 80% (ASNER et al., 2009). Vale salientar a adaptação destas espécies às queimadas que ocorrem na savana africana, também comuns no cerrado brasileiro (BOND; MIDGLEY; WOODWARD, 2003).

Com o início dos estudos por Darlington, em 1939, a apomixia foi considerada um mecanismo evolutivo como alternativa para a ausência da reprodução sexual. A apomixia tornou viável a perpetuação de diversas espécies, porém foi entendida inicialmente como uma evolução malsucedida e que logo teria seu fim (DARLINGTON, 1939). Com o avanço nas observações, perceberam-se os benefícios da apomixia, como a fixação do vigor híbrido (heterose) e o baixo custo na produção de sementes híbridas (SAVIDAN et al. 1989).

Na década de 70, o pesquisador Savidan trouxe mais de 400 acessos de *P. maximum* para o Brasil. Em estudos realizados na África, foram encontrados acessos apomíticos tetraploides e também plantas sexuais diploides. A fim de determinar a diferença entre o genótipo de plantas apomíticas e sexuais, Savidan (1985) realizou 10 tipos de cruzamentos com plantas sexuais e apomíticas, o que culminou na dominância da apomixia em relação à reprodução sexual. Além disso, ele indicou que o genótipo de plantas apomíticas é Aaaa, enquanto o de plantas sexuais seria homozigoto recessivo (aaaa). As observações que deram base para a criação deste modelo foram as proporções das progênes dos cruzamentos. Os cruzamentos entre os genótipos sexuais diploides com apomíticos tetraploides foram realizados a partir da duplicação cromossômica dos diploides sexuais, utilizando colchicina.

Savidan et al. (1989) mencionaram três tipos de cruzamentos que podem ser utilizados em um programa de melhoramento de espécies apomíticas: 1) sexual x apomítico; 2) apomítico facultativo x apomítico; e 3) apomítico obrigatório x apomítico, sendo os últimos dois apenas uma alternativa para a ausência de plantas sexuais. Apesar de não afetar as características genéticas da planta, este estudo mostrou que a formação do endosperma híbrido pode melhorar características como peso e dormência de sementes, assim como rápido crescimento inicial da plântula.

É importante destacar os processos necessários para a fecundação dessas plantas: singamia e tripla fusão, sendo o primeiro referente à formação do embrião e o último relacionado à formação do endosperma. Em plantas sexuais diploides, a formação do embrião ocorre pelo contato entre a célula espermática (n) e a oosfera (n). A tripla fusão envolve a ligação entre outra célula espermática (n) e os núcleos polares (2n).

A natureza da apomixia envolve o entendimento de dois conceitos fundamentais: aposporia e partenogênese. A aposporia é o desenvolvimento do saco embrionário através de uma célula somática (célula não sexual), que não envolve meiose. A partenogênese é a formação de embrião sem fertilização, ou seja, através de reprodução assexuada. Sendo assim, sementes apomíticas apresentam o mesmo genótipo da planta-mãe.

A formação do saco embrionário (megagametogênese e megaesporogênese) em plantas sexuais e apomíticas apresenta aspectos distintos. Na via sexual, a célula-mãe da megáspora sofre meiose, que é sucedida por três mitoses para a formação do saco embrionário do tipo *Polygonum*, contendo oosfera, duas sinérgides, dois núcleos polares e três antípodas (SAVIDAN et al., 1989). Por outro lado, a via apomítica compreende na formação do saco embrionário do tipo *Panicum*, através de duas mitoses de células somáticas do nucelo, tendo como resultado um óvulo com oosfera, um núcleo polar e duas sinérgides.

O entendimento da formação de embriões sexuais e apomíticos possibilita a diferenciação dos sacos embrionários por análises citoembrionárias. Além das diferenças apresentadas entre os sacos embrionários obtidos por via sexual e apomítica, o óvulo sexual apresenta apenas um saco embrionário com oito núcleos, enquanto óvulos de plantas apomíticas podem apresentar vários sacos embrionários (estrutura com quatro núcleos), pois várias células nucleares diferenciam-se ao mesmo tempo.

Savidan (1985), ao comparar 80 plantas naturais apomíticas e 80 híbridos apomíticos (cruzamento entre planta apomítica e sexual), notou que, após observar 80 óvulos por planta, pode ocorrer plantas apomíticas facultativas, que apresentam baixo percentual de sexualidade ao avaliar a composição dos sacos embrionários.

Dentre as várias conclusões de Savidan (1985), destaca-se que, em um cruzamento entre uma planta apomítica (doadora de pólen) e uma planta sexual, a proporção da progênie será de 1:1 apomíticas e sexuais. Sendo assim, ao observar a progênie, genótipos promissores podem ser selecionados diretamente e, caso sejam apomíticos, poderão ser reproduzidos indefinidamente, facilitando o melhoramento de espécies forrageiras apomíticas.

3 Melhoramento

Em plantas apomíticas, dois modos de reprodução ocorrem naturalmente na população, espécies apomíticas tetraploides ($2n=32$) e sexuais diploides ($2n=16$). Os genótipos apomíticos são cópias idênticas da planta-mãe (KHAN et al., 2015), enquanto as plantas sexuais permitem a recombinação para geração de variabilidade genética e obtenção de genótipos híbridos mais produtivos, resistentes a estresses e que atendam fins específicos. As espécies *M. maximus*, *M. infestus* e *M. trichicladium*, pertencentes ao gênero *Megathyrsus*, são capazes de se intercruzar de forma natural, gerando uma progênie segregante com indivíduos diploides sexuais e tetraploides apomíticos (JANK et al., 2009).

A EMBRAPA gado de corte desenvolve um programa de melhoramento para as espécies forrageiras tropicais apomíticas, em especial do gênero *Megathyrsus*. Inicialmente, foram lançadas cultivares com apenas caracterização e conhecimento dos acessos do banco de germoplasma, coletado no centro de origem da espécie, sendo estas a cv. Tanzânia (1990), cv. Mombaça

(1993) e cv. Massai (2000), o que resultou no aumento da produtividade, da qualidade e de maiores ganhos na produção de gado (JANK et al. 2009).

Em qualquer programa de melhoramento, a variabilidade genética é um ponto de destaque, pois sem a mesma não é possível realizar seleção de genótipos com diferentes características. Assim, é necessário gerar a variabilidade genética e no melhoramento de espécies apomíticas, isso ocorre com a obtenção de progênies. As progênies (híbridos) são obtidas através do cruzamento entre as plantas apomíticas (doadora de pólen/masculina) e plantas sexuais (receptora de pólen/feminina) para que ocorra a fecundação (VALLE; JANK; RESENDE, 2009). Ainda detalham que estes cruzamentos podem envolver a coleta do grão de pólen sobre uma placa de Petri, seguida de sua transferência para a progênie feminina e proteção com saco de papel; plantio alternado de plantas progenitoras femininas e masculinas, ou utilização de blocos de 25 m² com a progênie feminina (sexual) ao centro e progênies masculinas ao redor (apomíticas). Para viabilizar o programa para geração de variabilidade, é necessário o tratamento dos genótipos diploides sexuais com colchicina para a duplicação do número de cromossomos e compatibilidade com os tetraploides apomíticos, que são receptores e doadores de pólen, respectivamente (PESSIM et al., 2010). O resultado do cruzamento é uma progênie híbrida com segregação do tipo 1:1 para o modo de reprodução (SAVIDAN, 1985), que pode ser diferido por análise microscópica do saco embrionário ou marcador molecular.

Dos híbridos obtidos, cerca de 100 a 200 clones compõem a **fase 1**, os quais são selecionados de acordo com sua produção, adaptação, modo de reprodução, número de cromossomos, resistência a pragas, doenças e rebrota, principalmente. Dentre os selecionados, cerca de 20 a 25 clones são avaliados para as mesmas características em diversos ambientes, por meio das redes de experimentos, com repetição para diferentes tipos de solo, valor nutritivo, capacidade de suporte, etc., compondo a **fase 2**. Já na **fase 3**, os genótipos-elite, possíveis candidatos ao lançamento, são avaliados em um comparativo com uma testemunha comercial quanto ao desempenho animal, como palatabilidade, ganho de peso, e ainda resposta a fertilizante, valor nutritivo, resistências e manejo entre outras (JANK et al., 2014).

Portanto, o melhoramento de espécies forrageiras apomíticas possui características únicas que faz com que o tempo para obtenção de genótipos superiores e o seu lançamento no mercado seja menor do que das outras culturas. Além disso, garante maiores ganhos no rebanho, pastagem de melhor qualidade e supre necessidades e condições específicas.

4 Genotipagem

As plantas apomíticas possuem um sistema reprodutivo assexuado com formação de sementes, possibilitando o cruzamento e a obtenção de genótipos superiores de forma simplificada em relação à propagação vegetativa e à hibridação. Os genótipos obtidos são avaliados e selecionados com base

em técnicas de fenotipagem e genotipagem, as quais geram informações sobre cada indivíduo, com o mínimo possível de interferências ambientais. O desenvolvimento das técnicas de genotipagem, como o uso de marcadores moleculares, permite avanços nos estudos de melhoramento das espécies forrageiras tropicais (WORTHINGTON et al., 2016).

Um marcador molecular é simplesmente uma característica presente no DNA, herdada geneticamente e capaz de distinguir indivíduos. Foram desenvolvidos com intuito de identificar polimorfismos do DNA, e apresentam maior precisão de resultados em comparação a marcadores morfológicos, principalmente pela falta de interações pleiotrópicas e epistática, neutralidade fenotípica, herança codominante e possibilidade de identificação independente da idade do tecido vegetal (BRAMER et al., 2000).

Segundo Worthington et al. (2016), os marcadores moleculares ligados à apomixia são capazes de avaliar o modo reprodutivo dos indivíduos em meio à progênie segregante, de forma rápida e eficaz quando comparado com os métodos tradicionais de análises citológicas e testes de progênie. Devido a essas vantagens no uso de marcadores, diversos estudos são realizados para aperfeiçoar e concretizar a técnica no melhoramento das espécies forrageiras apomíticas.

No programa de melhoramento de *Brachiaria* do CIAT, Worthington e Miles (2015) utilizaram a seleção assistida por marcadores para auxiliar no descarte de híbridos sexuais não passíveis de continuar no programa. Assim, a seleção passa a ser uma etapa da pesquisa com economia de tempo e recursos. O marcador N14, utilizado nesse programa para identificação da apomixia, é um SCAR (região amplificada de sequência caracterizada) derivado de um RAPD (amplificação aleatória de DNA polimórfico). Contudo, seu uso e resultados apresentam limitações de acordo com o tipo de cruzamento avaliado envolvendo *B. decumbens* e *B. brizantha* e nenhum efeito para *B. humidicula*.

Marcadores estudados em outras culturas da família *Poacea* também são estudados na possibilidade de identificar a apomixia. Nas pesquisas de Pessino et al. (1997) com marcadores AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) e RFLP (polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição), a Embrapa obteve resultados em que a apomixia em *B. brizantha* (cv. Marandu) envolve marcadores encontrados no milho e no arroz. O marcador p779/p780, da região ASGR, vem sendo estudado por apresentar alta preditividade para apomixia em trabalhos com os gêneros *Brachiaria* e *Megathyrus* (WORTHINGTON et al., 2016).

Desta forma, a seleção genômica traz benefícios ao programa de melhoramento de espécies forrageiras apomíticas, com o encurtamento de cada fase do ciclo de seleção e simultâneo aumento de ganho médio genético. Apesar dos aspectos positivos, existem especificidades no melhoramento de plantas forrageiras apomíticas que dificultam os trabalhos com marcadores moleculares. Os possíveis genes para identificação da apomixia são estudados em diversas espécies, contudo são poucos os mapas genéticos desenvolvidos, em função principalmente da falta de disponibilidade de recursos financeiros, autoincompatibilidade, herança multissômica e altos níveis de heterozigossidade apresentados (WORTHINGTON et al., 2016).

Referências

- ASNER, G. P.; LEVICK, S.R.; KENNEDY-BOWDOIN, T.; KNAPP, D. E.; EMERSON, R.; JACOBSON, J.; COLGAN, M. S.; MARTIN, R. E. Large-scale impacts of herbivores on the structural diversity of African savannas. **PNAS**, v. 106, p. 4.947-4.952, 2009.
- BONATO, A. L. V.; VALLE, C. B.; JANK, L.; RESENDE, R. M. S.; LEGUIZAMON, G. D. C. **Extração de DNA genômico de *Brachiaria* e *Panicum maximum***. Embrapa Gado de Corte-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2002.
- BOND, W. J.; MIDGLEY, G. F.; WOODWARD, F. I. The importance of low atmospheric CO₂ and fire in promoting the spread of grasslands and savannas. **Global Change Biology**, v. 9, p. 973-982, 2003.
- BRAMER, S. P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. Embrapa Trigo-Documentos (INFOTECA-E), 2000.
- BROWN, W. V., EMERY, W. H. P. Apomixis in the Gramineae: Panicoideae. **Am J Bot**, Baltimore, v. 45, p. 253-263, 1958.
- CUMMING, D. H. M. The influence of large herbivores on savanna structure in Africa. In: HUNTLEY, B. J. et al. (eds.), **Ecology of Tropical Savannas**. Springer-Verlag: Berlin, 1982.
- DARLINGTON, F. R. S. **The evolution of genetic systems**. Cambridge University Press: London, p. 108-113, 1939.
- FERNANDES, C. D.; VALÉRIO, J. R.; FERNANDES, A T. F. Ameaças apresentadas pelo atual sistema de produção de sementes à agropecuária na transmissão de doenças e pragas. In: WORKSHOP SOBRE SEMENTES DE FORRAGEIRAS, 1., 1999, Sete Lagoas. **Anais ... Sete Lagoas: Embrapa Negócios Tecnológicos**, 2000. p. 55-68.
- JANK, L.; BARRIOS, S. C.; VALLE, C. B.; SIMEÃO, R. M.; ALVES, G. F. The value of improved pastures to Brazilian beef production. **Crop & Pasture Science**, v.65, n.11, p.1.132-1.137, 2014.
- JANK, L.; RESENDE, R. M. S.; VALLE, C. B.; RESENDE, M. D. V.; CANÇADO, L. J.; SIMIONI, C. Melhoramento genético de *Panicum maximum*. In: **Melhoramento de Forrageiras Tropicais** (Resende RMS, Valle CB and Jank L eds.). Embrapa, Campo Grande, p.55-87, 2009.
- KHAN, Y. J.; CHOUDHARY, R.; TYAGI, H.; SINGH, A. K. Apomixis: The Molecular Perspectives and its Utilization in Crop Breeding. **Journal of Agri-Search**, v.2, n.3, p.153-161, 2015.

MARSHALL, D. R.; BROWN, A. H. D. The evolution of apomixis. *Heredity, Essex*, v. 47, p. 1-15, 1981.

Mudanças na Cobertura e Uso da Terra 2000 - 2010 - 2012 - 2014, 2016. In: IBGE. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<https://ww2.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/usodaterra/default.shtm>>. Acesso em: mar 2018.

PESSIM, C.; PAGLIARINI, M. S.; JANK, L.; ALICE MARIA DE SOUZA KANESHIMA, A. M. S.; BONATO, A. B. M. *Acta Scientiarum*, v. 32, n. 3, p. 417-422, 2010.

PESSINO, S. C. J. P. A.; ORTIZ, O.; LEBLANC, C. B.; VALLE, C.; EVANS et al. Identification of a maize linkage group related to apomixes in *Brachiaria*. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 94, n. 3-4, p. 439-444, 1997.

Produção da pecuária municipal. In: IBGE. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2016_v44_br.pdf>. Acesso em: mar 2018.

SAVIDAN, Y. H. Genetics and utilization of apomixis for the improvement of guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *International grassland congress*, p. 182-184, 1983.

SAVIDAN, Y. H.; JANK, L.; COSTA, J. C. G.; VALLE, C. B. Breeding *Panicum maximum* in Brazil. 1. Genetic resources, modes of reproduction and breeding procedures. *Euphytica*, v. 41, p. 107-112, 1989.

VALLE, C. B.; JANK, L.; RESENDE, R. M. S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. *Revista Ceres*, v.56, n.4, p.460-472, 2009.

WORTHINGTON, M. L.; MILES, J. W. Reciprocal full-sib recurrent selection and tools for accelerating genetic gain in apomictic *Brachiaria*. In: **Molecular Breeding of Forage and Turf**, Springer International, p. 19-30, 2015.

WORTHINGTON, M.; HEFFELFINGER, C.; BERNAL, D.; QUINTERO, C.; ZAPATA, Y. P.; PEREZ, J. G.; VEJA, J.; MILES, J.; DELLAPORTA, S.; TOHME, J. A parthenogenesis gene candidate and evidence for segmental allopolyploidy in apomictic *Brachiaria decumbens*. *Genetics*, v. 203, n.3, p.1.117-1.132, 2016.

Capítulo 5



Aplicações do R e outras práticas para análises robustas e reprodutíveis de bioinformática

Maria Fernanda Zaneli Campanari

Rafael Correia da Silva

Michelli Inácio Gonçalves Funicelli

Luis Teheran Sierra

Daniel Guariz Pinheiro

1 Introdução

A Bioinformática é uma área multidisciplinar que procura integrar conhecimentos oriundos das disciplinas das áreas de Ciências Biológicas, Ciência da Computação, Estatística e Matemática, cuja finalidade é a exploração computacional (*in silico*) de questões biológicas. Logo, essa ciência embasa-se em análises quantitativas de dados e informações pertinentes a respeito de macromoléculas de origem biológica, utilizando-se da tecnologia de informação (TI) para manipular e compreender aspectos relevantes a respeito do contexto biológico onde elas estão atuando.

As aplicações avançam em duas fronteiras: a primeira, baseada na pesquisa, dá-se através da utilização de ferramentas computacionais, a fim de expandir a prospecção de respostas em dados biológicos, comportamentais e médicos, enquanto a segunda fronteira busca desenvolver seus próprios métodos para aquisição, armazenamento, organização, análise e visualização

desses dados (PEVSNER, 2015).

O pioneirismo e intensificação dos avanços desta nova área deu-se com o lançamento e o desenvolvimento do Projeto do Genoma Humano (HGP) em 1990, que atraiu o investimento de 3,4 bilhões de dólares e levou 13 anos, com a colaboração de centenas de laboratórios internacionais para conseguir completar o primeiro rascunho do genoma humano e acelerou muito o desenvolvimento e a automatização dos sequenciadores de ácidos nucleicos, primeiramente baseados na técnica de Sanger (BAO et al. 2014; PABINGER et al., 2014).

Em 2007, iniciou-se a introdução das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS), levando a uma intensa queda nos custos de sequenciamento. A partir de 2014, a empresa Illumina introduziu nova plataforma, HiSeq X, oferecendo o sequenciamento do genoma humano individual pelo preço de 1000 dólares em sua fase experimental (BAO et al., 2014; HAYDEN, 2014).

Baseando-se nestas melhorias relativas ao desempenho dos sequenciadores de nova geração, várias novas iniciativas foram estabelecidas, aproveitando essa queda em relação aos custos, para assim sequenciar milhares de genomas humanos. Por exemplo, o projeto do *Genome England*, concluído em 2017, que sequenciou 100.000 genomas humanos de pacientes com doenças raras e suas famílias, tais como pacientes com neoplasias comuns, para disponibilizar essas informações como parte do sistema médico do Reino Unido (NHS ENGLAND AND GENOMICS ENGLAND, 2018).

Outro exemplo de destaque é a *Human Longevity*, empresa fundada em 2014 por J. Craig Venter, com a ambição de se tornar o maior centro de sequenciamento do genoma humano, com capacidade de sequenciar até 40.000 genomas humanos por ano, estabelecendo o maior banco de dados de informações genéticas e fisiológicas, para assim tentar compreender o processo de envelhecimento e muitas doenças vinculadas a ele, incluindo câncer e doenças cardíacas (HUMAN LONGEVITY, 2018).

No contexto dos grandes investimentos em análises de dados biológicos, os progressos relativos ao sequenciamento de nova geração passaram a definir essa área nos limites do termo *Big Data*, ou seja, que se refere a um imenso volume de dados que surge com oportunidades não precedentes (GREENE et al., 2014), que pode ser observado de forma analítica em busca de padrões e de informações interessantes, resolvendo questões biológicas como as citadas acima.

O pesquisador que lida com problemas da área possui ferramentas computacionais estruturadas de forma a se compreender os mecanismos fundamentais de problemas biológicos, como, por exemplo, estrutura e função de

macromoléculas, vias bioquímicas, processos patológicos e evolução (GREENE et al., 2014). No caso, o grande desafio das ciências da vida é dar sentido a essa grande quantidade de sequências e dados produzidos por projetos envolvendo a análise de genomas, proteomas, transcritomas e outras aplicações da Biologia Molecular.

Para a obtenção de dados e de respostas interessantes, que atendam a perguntas biológicas cada vez mais complexas, ferramentas são propostas e disponibilizadas continuamente, especialmente novos algoritmos, que se apresentam cada vez mais diversos e complexos, e que demandam um olhar acurado para julgar se é adequada sua aplicação para a investigação de determinada questão biológica. Assim, requerem também uma habilidade de manuseio de dados cada vez maior. Pode-se dizer que as novas ferramentas evoluem conforme o volume de dados biológicos cresce, e também seus algoritmos subjacentes (BUFFALO, 2015).

Esse rápido desenvolvimento pode trazer problemas para o ambiente de análise, pois as ferramentas, quando publicadas, não têm sua competitividade testada devidamente (*benchmarking*), ou essa comparação ocorre apenas para um grupo específico de organismos e conjunto de dados, o que leva a uma imprevisibilidade na aplicação da ferramenta, sendo necessário o teste de várias, até a descoberta de uma que se adapte a análise. Dificultando ainda mais o processo, parte dos programas utilizados não possui uma comunidade que promova seu desenvolvimento ativo, e em pouco tempo, eles tornam-se ultrapassados ou portam erros (*bugs*) que podem afetar negativamente os resultados da análise - o que retoma a importância da escolha adequada dos programas e ferramentas para a resolução de um novo problema biológico (BUFFALO, 2015).

2 R para análises de Bioinformática

Nesse contexto, a intensificação do volume de dados biológicos disponíveis, especialmente a partir da década de 90 e da necessidade de se desenvolver ferramentas e aplicações para extrair informações, atacando problemas biológicos de uma forma computacional robusta e reproduzível, evidenciamos a linguagem R.

Ela é uma implementação da linguagem S (BECKER; CHAMBERS; WILKS, 1988), uma ferramenta popular entre analistas de dados e usuários de aplicações na área de Estatística, e têm-se tornado uma das ferramentas mais proeminentes devido a sua gratuidade, flexibilidade e capacidade de manuseio e modelagem de dados (GENTLEMAN, 2008).

Apesar da adaptabilidade da linguagem R para testes estatísticos tradicionais (como teste *t* de Student, ou análises de variância), sua utilização como ferramenta de análise exploratória de dados é ainda mais interessante, sendo possível visualizar e manipular dados de forma altamente interativa, permitindo ajustes finos instantâneos e sua imediata visualização, e também iterativa, moldando a análise conforme se revelam as pistas biológicas nos conjuntos de dados interessantes para responder às hipóteses propostas (BUFFALO, 2015).

A estratégia de análise exploratória de dados, nomeada assim por John W. Tukey em seu livro de mesmo nome (1977), é completamente aplicável em bioinformática, e através desta estratégia, é possível certificar a validade das ferramentas de análises e sua robustez, ou seja, a capacidade de atender a problemas cada vez mais complexos de forma igualmente poderosa.

Para dados genômicos fornecidos por tecnologias de alto rendimento, uma ferramenta de referência é o Bioconductor (GENTLEMAN et al., 2004), um projeto aberto que contém uma série de pacotes para o R relativos à análise e compreensão destes dados. Esta aplicação fornece estruturas fundamentais para análises de alto rendimento, como sequenciamento de ácidos nucleicos, provenientes de genomas (DNA-Seq), transcritomas (RNA-Seq), captura de DNA por imunoprecipitação de cromatina (ChIP-Seq), captura de conformação de cromossomos (Hi-C), metilomas (Methyl-Seq), caracterização de ribossomos (Ribo-Seq) e outras (HUBER et al., 2015). Após sua instalação na suíte da linguagem R, o acesso às ferramentas do Bioconductor dá-se de forma modular, através de pacotes - que podem ser explorados em seu repositório (BIOCONDUCTOR, 2018). Da data desta publicação, março de 2018, havia 1.477 pacotes disponíveis apenas para o Bioconductor. Exploraremos, assim, a usabilidade de alguns desses pacotes, delineando sua aplicação.

Na análise de ácidos nucleicos em larga escala - RNA ou DNA - um passo fundamental é o alinhamento das leituras do sequenciamento contra um genoma de referência, seguido da interpretação destes alinhamentos. Esta análise é comumente associada em um arquivo no formato BAM - mapa de alinhamento binário, que pode ser explorado para a obtenção de diversas métricas e visualização destes arquivos, através dos pacotes *Rsamtools*, utilizado para a importação do arquivo de alinhamento BAM (entrada requerida pelo pacote) no R, além de prover uma interface para gerenciamento do mesmo (MORGAN; PAGES; OBENCHAIN, 2013).

Também são utilizados para esta finalidade os pacotes de análise de intervalos ou coordenadas (*ranges*), como o *IRanges*, *GenomicRanges*, *GenomicAlignments*, entre outros. Tais ferramentas não são apenas convenientes para o usuário final devido à sua funcionalidade, performance e usabilidade,

mas também são estruturadas para utilização como base para outras aplicações mais avançadas (LAWRENCE, et al., 2013).

Para análises de metataxonomia, que são embasadas no sequenciamento de regiões conservadas, marcadoras, como 16S e ITS, existem algumas ferramentas específicas, como *phyloseq* (MCMURDIE; HOLMES, 2013). Através deste pacote, podem ser geradas figuras de natureza exploratória sobre a distribuição taxonômica, como visualização de redes (*networks*), mapas de calor (*heatmaps*) e testes de variância, assim como procedimentos de normalização dos dados de abundância. Dentre os testes estatísticos empregados, há o teste hipergeométrico e outros testes não paramétricos. Para a execução deste pacote, é necessário fornecer como entrada uma matriz de UTOs (unidades taxonômicas operacionais), observadas por amostra.

Ainda em metataxonomia, o pacote *Tax4Fun* (AßHAUER, 2015) realiza predições funcionais baseadas no gene marcador 16S, tentando prover uma forma mais custo-efetiva de explorar a funcionalidade de comunidades compostas por bactérias ou arqueias. Nesta estratégia, é necessário fornecer como entrada uma matriz de UTOS pré-processada, agrupada e atribuída a sequências de referência do banco de dados de RNA ribossomais SILVA (QUAST et al., 2012).

Para análises de expressão gênica diferencial baseadas nas tecnologias de sequenciamento de RNA (RNA-Seq), há, por exemplo, os pacotes *edgeR* (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010) e *DEseq2* (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). Para o primeiro destes pacotes, a entrada necessária consiste em três dados - uma tabela de contagem de expressão e dois vetores (listas) que contenham: (1) o tamanho das bibliotecas (número total de leituras) e (2) as condições experimentais para cada grupo ou amostra. A partir disso, explora-se a expressão diferencial através da atribuição de um modelo estatístico de Poisson sobredisperso (que possui muito mais variabilidade que a esperada em um modelo paramétrico) para explicação da variabilidade técnica e biológica dos transcritos.

O outro pacote, por sua vez, também tem como entrada uma matriz de expressão e se utiliza de um estimador de encolhimento para a razão (*fold change*) e a dispersão, a fim de aperfeiçoar a estabilidade e a interpretabilidade dessas estimativas. De acordo com os autores, o *DESeq2* considera em sua abordagem as características dos experimentos de RNA-Seq, tais como o baixo número de réplicas, a natureza discreta, a larga faixa dinâmica, além dos valores atípicos (*outliers*) para os dados.

Por outro lado, para conjuntos de dados de expressão obtidos por microarranjos, há o pacote *limma*, que possui métodos mais apropriados para a natureza dos dados obtidos dessa forma, baseados na intensidade do sinal de

hibridação (RITCHIE et al., 2015).

Além de todos os pacotes de utilidades da plataforma R, também existem, por fim, muitas opções para visualização de dados, tendo-se como referência principal o pacote *ggplot2*. Este é um pacote para geração de gráficos e é fundamentado em uma gramática de componentes gráficos independentes que podem ser compostos em novas formas, perfeitamente ajustáveis para resolução de cada problema, o que o torna uma opção muito poderosa para a visualização das análises (WICKHAM, 2016).

3 Reprodutibilidade e robustez em análises

Para análises reprodutíveis, não basta apenas a utilização de ferramentas rápidas, precisas e acuradas - são necessárias práticas de controle dos experimentos, além de formas de armazenamento estável dos dados e subconjuntos de dados brutos e processados, para que as análises possam ser reproduzidas, posteriormente, por outros cientistas, além de permitir a análise crítica dos procedimentos e das metodologias adotadas. Assim, no ato da publicação de pesquisas computacionais, torna-se sempre necessário, também, compartilhar o código utilizado e os dados, práticas consideradas o padrão-ouro para análises de Bioinformática (PENG, 2011).

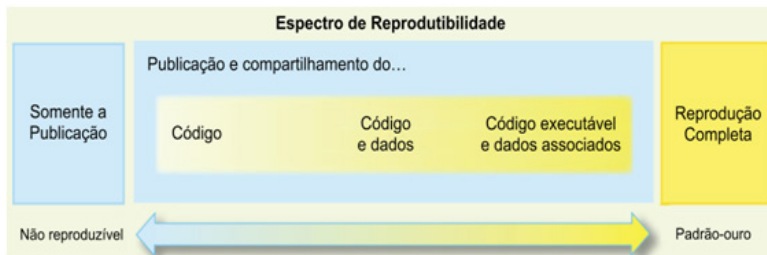


Figura 01. Espectro de reprodutibilidade de experimentos baseados em análises computacionais. Adaptado de Peng (2011).

O montante de informações geradas pelo volume cada vez mais crescente de análises demanda dois atributos do analista e da análise em si - a reprodutibilidade e robustez das ferramentas e práticas adotadas - critérios essenciais para que o trabalho possa ser observado por olhos críticos e julgado pela comunidade científica - critério que, em sua ausência, mesmo no menor dos experimentos, reduz drasticamente a validade do trabalho (SMITH; DENSMORE; LENER, 2016).

Para a manipulação e análise de dados, seja de qualquer natureza, são necessárias habilidades e certa desenvoltura com as metodologias e ferramentas, que se baseiam em linguagens de programação e algoritmos. Assim, o conhecimento das linguagens mais populares de Bioinformática e também de *Shell scripting* (a linguagem dos sistemas baseados em UNIX) são fundamentais para alcançar objetivos mais ambiciosos demandados pelo crescente volume de dados, pois nem todos os programas possuem uma forma amigável de contato com o usuário, sendo necessário, por vezes, construir a conexão entre duas aplicações de funcionalidades diferentes (PEVSNER, 2015).

Uma das práticas mais valiosas no sentido de se manter a reprodutibilidade e a rastreabilidade do trabalho dá-se pela construção de bancos de dados, que permitem o fácil acesso à natureza dos mesmos, além das respostas geradas por sua análise.

Os bancos de dados permitem o acesso aos dados de forma estruturada, de fácil recuperação (XIONG, 2006). Muitos formatos padrões dos arquivos gerados em bioinformática (GTF/GFF, BED, VCF/BCF, SAM/BAM) são organizados em arquivos tabulados, que não possuem estrutura ou hierarquia interna, de difícil acesso. Estes arquivos podem também ser organizados em bancos de dados relacionais, que podem ser acessados pela linguagem SQL (*Structured Query Language*), permitindo sua fácil recuperação (BUFFALO, 2015).

Além disso, outra prática de interessante adoção é a manutenção de um repositório de código, através de sistemas de controle de versão, como o Git, uma arquitetura de trabalho que permite o gerenciamento de arquivos e documentos, como conjunto de dados, código, figuras, anotações de laboratório e manuscritos, tornando-se uma maneira poderosa de comparar versões de arquivos, encontrar erros, explorar novas estratégias de forma estruturada e auditável (RAM, 2013).

4 Considerações finais

Apesar das recomendações da plataforma R e de seus pacotes, reconhecemos que, por vezes, programas de Bioinformática caem em desuso em favor de novas abordagens, mais desenvolvidas nos quesitos delineados - robustez e reprodutibilidade. Entretanto, a manutenção de habilidades fundamentais, como linguagens de programação duradouras como Perl, Python e o próprio R, e boas práticas de condução de experimentos computacionais são perenes, e seu aprendizado e utilização serão sempre válidos.

A descoberta e o aprendizado de ferramentas e métodos em Bioinfor-

mática baseiam-se em especial na leitura da literatura relacionada (artigos publicados), tutoriais, fóruns de discussão e também na execução e na utilização dessas ferramentas, considerando os parâmetros disponíveis para configuração. Assim, deve-se sempre buscar a adaptação de cada estratégia para o problema sob investigação: além disso, a comparação com outras ferramentas existentes dentro do mesmo contexto é uma prática oportuna. O desenvolvimento da metodologia de análise personalizadamente tecida para a obtenção de informações biologicamente interessantes em cada novo conjunto de dados já é, em si, um experimento.

Recomendamos, como introdução sensata e mais abrangente aos tópicos explorados neste trabalho, a leitura do livro *Bioinformatics Data Skills* de Buffalo (2015), que explora mais detalhadamente o conjunto de problemas citados aqui e as possíveis soluções, com ênfase em práticas perenes para a produção de experimentos *in silico* com fundamentação concreta em metodologia científica.

Referências

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.

BAO, R.; HUANG, L.; ANDRADE, J.; TAN, W.; KIBBE, W. A.; JIANG, H.; FENG, G. Review of current methods, applications, and data management for the bioinformatics analysis of whole exome sequencing. **Cancer informatics**, v. 13, p. CIN. S13.779, 2014.

BECKER, R. A.; CHAMBERS, J. M.; WILKS, A. R. The New S Language: a programming environment for data analysis and statistics. **Wadsworth Brooks**, 1988.

BIOCONDUCTOR, OPEN SOURCE SOFTWARE FOR BIOINFORMATICS. Disponível em: <https://www.bioconductor.org/packages/release/BiocViews.html#___Software> Acesso em: 11 mar. 2018.

BUFFALO, V. Bioinformatics data skills: Reproducible and robust research with open source tools. **O'Reilly Media, Inc.**, 2015.

GENTLEMAN, R. C.; CAREY, V. J.; BATES, D. M.; BOLSTAD, B.; DETTLING, M.; DUDOIT, S.; HORNIK, K. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome biology**, v. 5, n. 10, p. R80, 2004.

GENTLEMAN, R. R programming for bioinformatics. **CRC Press**, 2008.

GREENE, C. S.; TAN, J.; UNG, M.; MOORE, J. H.; CHENG, C. Big data bioinformatics. **Journal of Cellular Physiology**, v. 229, n. 12, p. 1.896–1.900, 2014.

HAYDEN, E. C. Is the \$1,000 genome for real? **Nature News**, 2014.

HUBER, W.; CAREY, V. J.; GENTLEMAN, R.; ANDERS, S.; CARLSON, M.; CARVALHO, B. S.; GOTTARDO, R. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. **Nature methods**, v. 12, n. 2, p. 115, 2015.

HUMAN LONGEVITY INC. Disponível em: <<https://www.humanlongevity.com/>> Acesso em: 11 mar. 2018.

LAWRENCE, M.; HUBER, W.; PAGES, H.; ABOYOUN, P.; CARLSON, M.; GENTLEMAN, R.; CAREY, V. J. Software for computing and annotating genomic ranges. **PLoS computational biology**, v. 9, n. 8, p. e1.003.118, 2013.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 2014.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61.217, 2013.

MORGAN, M.; PAGES, H.; OBENCHAIN, V. Rsamtools: Binary alignment (BAM), variant call (BCF), or tabix file import. **R package version**, v. 1, n. 3, 2013.

NHS ENGLAND AND GENOMICS ENGLAND. **100,000 Genomes Project**. Disponível em: <<https://www.genomicsengland.co.uk/>> Acesso em: 11 mar. 2018.

PABINGER, S.; DANDER, A.; FISCHER, M.; SNAJDER, R.; SPERK, M.; EFREMOVA, M.; TRAJANOSKI, Z. A survey of tools for variant analysis of next-generation genome sequencing data. **Briefings in bioinformatics**, v. 15, n. 2, p. 256-278, 2014.

PENG, R. D. Reproducible research in computational science. **Science**, v. 334, n. 6.060, p. 1.226-1.227, 2011.

PEVSNER, J. **Bioinformatics and functional genomics**. John Wiley & Sons, 2015.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research**, v. 41, n. D1, p. D590-D596, 2012.

RAM, K. Git can facilitate greater reproducibility and increased transparency in science. **Source code for biology and medicine**, v. 8, n. 1, p. 7, 2013.

RITCHIE, M. E.; PHIPSON, B.; WU, D.; HU, Y.; LAW, C. W.; SHI, W.; SMYTH, G. K. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 7, p. e47-e47, 2015.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139-140, 2010.

SMITH, R. V.; DENSMORE, L. D.; LENER, EDWARD F. Graduate research: A guide for students in the sciences. **Academic Press**, 2016.

TUKEY, J. W. **Exploratory data analysis**. 1977.

WICKHAM, H. ggplot2: elegant graphics for data analysis. **Springer**, 2016.

XIONG, J. Essential Bioinformatics. **Cambridge University Press**, 2006.

Capítulo 6



Diferentes genes, diferentes filogenias: incongruências nas relações filogenéticas e na delimitação das espécies

Guilherme Camara Seber

Saura Rodrigues da Silva

Néstor Darío Franco Marulanda

Samanta Gabriela Medeiros Carvalho

Fernanda Gomes Rodrigues

Vitor Fernandes Oliveira de Miranda

1 O conceito de espécie e o método filogenético

Conceituar uma espécie ainda é um dos principais desafios da biologia, assim como encontrar parâmetros e critérios para resolver essa definição (DE QUEIROZ, 2007). O assunto é tão controverso que, nas últimas décadas, foram propostos dezenas de conceitos de espécie (MAYDEN, 1997), cada qual seguindo critérios próprios. Segundo o conceito biológico, uma espécie trata-se de um grupo de indivíduos que compõem uma população, e seu intercruzamento resulta em uma prole fértil (MAYR, 1942). De acordo com o conceito evolutivo, por outro lado, uma espécie é constituída por um grupo que se mantém coeso por conta do fluxo gênico, sendo que qualquer fator de barreira a esse fluxo pode quebrar essa coesão e levar ao processo de especia-

ção (TEMPLETON, 1998). Já o conceito filogenético de espécie tem a monofilia como premissa, ou seja, um conjunto de indivíduos da mesma espécie deve possuir ancestralidade comum (HENNIG, 1966).

Identificar e classificar os organismos em espécies foi durante a maior parte da história da biologia uma competência exclusiva da Taxonomia, antes mesmo de a evolução darwiniana ter sido incorporada pela ciência. Entretanto, o conceito de ancestralidade comum começou a ser assimilado pelo meio acadêmico a partir da segunda metade do século XIX, principalmente após a popularização do livro “A Origem das Espécies”, de Darwin (1859). Dessa forma, foi dado o início ao desenvolvimento e aprimoramento de novas ferramentas e abordagens, como a Sistemática Filogenética, que vieram a servir como suporte para uma visão de fato evolutiva para a classificação dos seres vivos.

Historicamente, as informações utilizadas para agrupar os organismos em táxons, desde espécies a grupos mais amplos (gêneros, famílias, classes, filos, por exemplo), foram os de natureza morfológica e estrutural (presença de penas, nadadeiras, braços, por exemplo). Entretanto, com o advento de métodos que permitiram vislumbrar as biomoléculas (DNA, RNA e proteínas), um conjunto maior de informação pôde ser utilizado para resgatar as relações evolutivas.

A princípio, os métodos utilizados para agrupar as espécies a partir de uma matriz molecular eram fenéticos, ou seja, baseados na similaridade entre os organismos. A partir da segunda metade do século XX, começou-se a utilizar o Princípio da Parcimônia em estudos evolutivos (CAMIN; SOKAL, 1965). Posteriormente, métodos estatísticos mais sofisticados foram incorporados aos estudos filogenéticos (FELSENSTEIN, 2004), como, por exemplo, os baseados em probabilidades, principalmente a partir do desenvolvimento de computadores com maior capacidade de processamento.

Atualmente, com os avanços nos métodos de sequenciamento, capazes de gerar grandes quantidades de dados genômicos e transcritômicos, a filogenômica tornou-se uma abordagem importante para resgatar as relações filogenéticas entre as espécies (DELSUC et al., 2005). Esse desconunal e crescente aumento no conjunto de dados biológicos, inclusive com a disponibilização de genomas inteiros, trouxe ao debate científico algumas questões importantes, principalmente no que diz respeito à natureza complexa e dinâmica da evolução dos genomas e como isso pode afetar a construção das árvores filogenéticas. Dados de diferentes genes nem sempre convergem em uma história evolutiva. Para compreendermos melhor as causas dessa incongruência, na qual diferentes genes podem contar histórias evolutivas distintas, precisamos ampliar nosso conhecimento a respeito dos processos biológicos relacionados

à organização e à transmissão da informação genética.

Nesse contexto, as incongruências encontradas podem estar relacionadas aos métodos analíticos empregados para a produção das árvores filogenéticas (fenética, parcimônia ou métodos probabilísticos), assim como à informação biológica empregada. As questões metodológicas são de grande importância; no entanto, será dado enfoque aos processos biológicos que podem gerar incongruências nas análises filogenéticas.

2 Por que ocorrem problemas para se identificar as relações evolutivas entre os organismos?

Em muitos casos, os dados moleculares podem sustentar a monofilia de grupos já reconhecidos com base em aspectos morfológicos. No entanto, podem existir casos em que os resultados de análises moleculares são contrastantes. Frequentemente, os dados morfológicos e moleculares permitem hipóteses alternativas de relacionamento filogenético, e táxons nos quais esse caso é recorrente são conhecidos como grupos taxonomicamente complexos ou TCGs (*Taxonomically Complex Groups*). Assim, acaba sendo responsabilidade dos sistematas posicionar esses táxons segundo a hipótese mais sólida do ponto de vista biológico (ENNOS, 2005).

As incongruências referentes à reconstrução filogenética de um grupo de espécies relacionadas ocorrem principalmente devido à violação da premissa da homologia por ortologia. A homologia é um critério indispensável em estudos de biologia comparada, funcionais, de genômica comparativa, taxonômicos e filogenéticos. Entende-se por homologia a ocorrência de ancestralidade comum entre dois caracteres (sejam morfológicos, moleculares, sejam de outra natureza).

Existe uma série de fatores biológicos que podem causar incongruências nas análises filogenéticas, sendo os principais: recombinação, transferência intergenômica, transferência horizontal, hibridização, paralogia, segregação incompleta de linhagens, poliploidização e atração de ramos longos, temas que serão tratados a seguir.

3 Recombinação meiótica

A troca de material genético entre dois cromossomos homólogos durante sua divisão é chamada recombinação por *crossing-over*, ou recombinação meiótica. A recombinação meiótica pode produzir descendentes de ma-

terial genético diferente de seus parentais.

Com a recombinação entre cromossomos, as diferentes partes de uma sequência podem apresentar histórias filogenéticas distintas, dada a origem também distinta das partes dessa sequência, causando conflito entre as árvores filogenéticas (POSADA; CRANDALL, 2002).

4 Transferência intergenômica e horizontal de genes

A transferência de genes de organelas para o núcleo é um fenômeno relativamente comum. Desde a proposta da teoria da endossimbiose, que explicou a origem de organelas com DNA e replicação próprios, surgiram inúmeras evidências de cópias nucleares de DNA plastidial (NuPt), cópias nucleares de DNA mitocondrial (NuMt) (NACIRI; LINDER, 2015) e cópias de DNA plastidial nas mitocôndrias (LEISTER, 2005). Também, não é incomum a transferência de genes de uma espécie para outra, principalmente quando estas possuem alguma relação ecológica (KEELING; PALMER, 2008). Esse DNA exógeno pode ser sequenciado e comparado com sequências não homólogas em uma matriz de dados moleculares, sendo esse um possível fator de erros em estudos filogenéticos.

5 Híbridização

Um dos processos que podem levar à construção de uma árvore filogenética com pouca resolução, é o fato de que algumas espécies podem hibridizar-se. Dentro deste contexto, as linhagens ancestrais dos táxons comportam-se como uma rede, ao invés de uma árvore que representa as linhagens como resultantes de processos bem determinados e dicotômicos de especiação (POSADA; CRANDALL, 2001; Fig.1).

O conceito de hibridização pode ser definido como o processo em que linhagens independentes se recombinaem de maneira sexuada para criar uma nova linhagem, podendo ser essa uma espécie independente. A especiação híbrida pode ocorrer de duas maneiras: por aloploidização e por hibridização diploide. A aloploidização consiste na hibridização entre duas espécies distintas, a qual produz descendentes com ambos os genomas (LINDER; RIESEBERG, 2004), o que pode gerar um híbrido estéril devido à ausência de pareamento cromossômico na meiose. Porém, se ocorrer a duplicação do genoma desse híbrido (autopoliploidia), o pareamento cromossômico volta a se estabelecer, formando-se uma espécie nova e isolada reprodutivamente de ambos os parentais (PETIT, 1999). Por outro lado, diploides híbridos (homo-

ploides) podem ser formados por cruzamento entre espécies no qual a espécie resultante mantém seu estado diploide (MALLET, 2007).

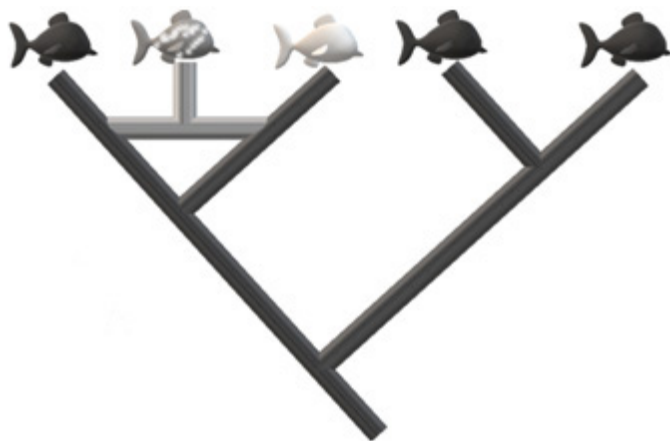


Figura 1. Exemplo de filogenia com evento de hibridização. A espécie de peixe cinza e malhada é oriunda da hibridização entre as linhagens de duas espécies distintas, representadas por uma espécie preta e outra branca.

Contudo, há situações em filogenia que é desejável encontrar evidências de eventos de hibridização. Portanto, na filogenia molecular, recentemente, foram propostos algoritmos que permitem representar as linhagens ancestrais em sistemas de redes, ao invés de árvores filogenéticas (KUBATKO, 2009).

6 Comparação entre sequências parálogas

Quando consideramos genes, a homologia pode ser de dois tipos principais: a ortologia, na qual genes em diferentes espécies são segregados devido a eventos de especiação; e a paralogia, na qual, após a divergência, ocorre duplicação do gene na espécie subjacente, surgindo uma cópia extra daquele gene (FITCH, 1970, 2000).

Uma vez que as sequências ortólogas são similares entre espécies que divergiram recentemente, e diferem das suas homólogas em espécies distantes, estas podem ser usadas como marcadores moleculares para inferir relações filogenéticas (CICCARELLI et al., 2006). Desse modo, a inferência

filogenética de sequências ortólogas reflete a história evolutiva das espécies (FITCH, 1970, 2000) e, geralmente, os genes ortólogos conservam as mesmas funções em espécies diferentes (KOONIN, 2005). Por sua vez, as cópias parálogas podem ser originadas por mecanismos de duplicação em pequena escala (*small-scale duplication*, SSD) ou duplicações de todo o genoma (*whole-genome duplication*, WGD) (HAKES et al., 2007). Dessa forma, os parálogos podem ter funções de reservatório, compensando funcionalmente a perda de cópias (GU et al., 2003), ou adquirindo diferentes funções biológicas, sendo fonte de novos genes (LONG et al., 2003).

A correta diferenciação entre sequências parálogas e ortólogas é um ponto crítico para obter resultados confiáveis nos estudos evolutivos e de anotação funcional (KOONIN, 2005), sendo que os métodos baseados em similaridade entre as sequências não resgatam, necessariamente, as relações de homologia entre as sequências avaliadas (KOSKI; GOLDING, 2001). Uma vez que podemos, corriqueiramente, gerar sequências parálogas e ortólogas durante o processo de amplificação do DNA devido à sua similaridade, a mistura dessas sequências pode ser uma causa da obtenção de árvores incongruentes (ZMASEK; EDDY, 2002; SCHREIBER, 2009).

7 Segregação incompleta de linhagens

Em estudos filogenéticos, a história evolutiva é resgatada a partir de genes presentes em um grupo de espécies. As divergências encontradas entre os genes ortólogos, ou seja, mesmo gene com ancestralidade comum, ocorrem devido às mutações que se acumulam nas linhagens ao longo do tempo. O esperado é que a separação entre duas linhagens, a partir de uma ancestral, acompanha a separação que ocorre entre duas sequências de DNA, a partir de uma sequência ancestral. O tempo transcorrido desde o evento pretérito, quando ocorreu essa separação até o presente, é denominado tempo de coalescência, sendo que este difere quando se comparam diferentes genes ou um gene com alelos diferentes. Essa diferença no tempo de coalescência faz com que o evento de segregação que ocorreu, não necessariamente, coincida com o evento de especiação. Em outras palavras, as divergências que ocorrem entre genes, de uma sequência ancestral para duas descendentes, nem sempre coincidem com as cladogêneses, que ocorrem a partir de uma linhagem ancestral e geram duas derivadas. Esse problema é conhecido como segregação incompleta de linhagens, e trata-se de um fator capaz de gerar incongruências entre filogenias baseadas em diferentes genes ou alelos de mesmo gene (NACIRI; LINDER, 2015).

8 Poliploidização

Entre várias espécies, o nível de ploidia, ou seja, o número de cópias de cada cromossomo que os indivíduos possuem, pode ser bastante variável (OTTO, 2007). Esse pode ser um problema quando se pretende comparar cópias de um mesmo gene entre diferentes indivíduos. Um número extra de alelos pode permitir que algum destes acumule mutações, pois estas tornam-se menos sensíveis à seleção purificadora. Assim, podem ocorrer diferenças nas taxas de substituição nucleotídica entre as diferentes cópias do gene, e isso pode causar a pseudogenização (WANG et al., 2005).

A poliploidização é importante no processo de especiação, especialmente no caso das plantas, devido à ocorrência de aloploidização (WENDEL, 2000). Por decorrência da formação de espécies não necessariamente monofiléticas, como no caso dos aloploidos, bem como devido aos problemas oriundos da possibilidade de se sequenciar diferentes alelos de um mesmo gene, a poliploidização pode ser um problema expressivo em estudos filogenéticos.

9 Atração de ramos longos

Devido a diferentes pressões seletivas ao longo do genoma, genes distintos acumulam mutações em diferentes níveis, e esta taxa mutacional pode ser observada em uma árvore filogenética, representada pelo comprimento dos ramos. Quando ocorrem taxas mutacionais muito altas, ou quando as sequências analisadas são muito divergentes, pode ocorrer atração entre ramos longos, ou seja, linhagens podem agrupar-se por terem em comum bases nitrogenadas por causa das altas taxas mutacionais. Note que as mutações compartilhadas, no caso de linhagens de ramos longos, não se dá por herança do ancestral comum (sinapomorfias), mas, sim, por coincidências, uma vez que as mutações surgem por eventos históricos independentes e não compartilhados (homoplasias). Assim, essa ocorrência acaba sendo a causa de “ruído” para a análise, visto que duas sequências não relacionadas podem compartilhar a mesma base nitrogenada em determinado sítio por uma simples causa estocástica, por homoplasia, que se torna mais provável devido à alta concentração de mutações, representada pelos ramos longos (HUELSENBECK, 1997).

10 Possíveis caminhos para a solução dos problemas

Existem alguns procedimentos que podem minimizar os principais problemas referentes às incongruências existentes quando se utilizam vários marcadores para a reconstrução filogenética. Realiza-se a análise filogenética dos genes e espera-se que esta reflita a história evolutiva das linhagens; no entanto, em muitos casos, cada gene possui uma história evolutiva diferente, principalmente nos casos de reticulação (hibridização e transferência horizontal) (NACIRI; LINDER, 2015).

Primeiramente, a ortologia deve ser premissa básica para qualquer análise filogenética e pode ser mais facilmente obtida, utilizando-se de genes de cópia única (PHILIPPE et al., 2011). Também pode ser verificada posteriormente, comparando-se a congruência da topologia da árvore do gene com a das espécies estudadas (FITCH, 2000; KOONIN, 2005), ou contra inferências obtidas a partir da concatenação de múltiplos genes (PHILIPPE, 2009). Vale ressaltar que cada gene possui taxas de mutação distintas, e cada linhagem possui um ritmo mutacional em seu genoma, problema que pode ser minimizado por meio da utilização de modelos evolutivos nas análises filogenéticas que empregam métodos probabilísticos. Dessa maneira, as análises tornam-se menos sensíveis à atração de ramos longos.

A amostragem do maior número possível de espécies dentro do grupo taxonômico em estudo também é um fator importante para que se resgate mais fielmente as relações evolutivas entre as diferentes linhagens (NACIRI; LINDER, 2015). Ademais, a escolha dos marcadores é de grande importância para a construção de filogenias de espécies ou de genes. Sendo assim, para minimizar os efeitos da reticulação nas filogenias, é preferível a utilização de marcadores de herança uniparental, como os plastidiais e mitocondriais.

Na filogenia de espécies, uma amostragem maior de marcadores moleculares, como no caso da filogenômica, pode fazer com que o sinal filogenético convergente de uma maioria de genes se sobreponha ao ruído causado por incongruências oriundas de alguns marcadores (DELSUC et al., 2005). Além disso, por causa do ruído causado pela diferença no tempo de coalescência de cada marcador, uma amostragem maior de genes pode aumentar a probabilidade de obtenção da correta reconstrução filogenética das linhagens (NACIRI, 2015).

Vale ressaltar que, em certos casos, a representação da história evolutiva dos organismos é mais bem representada por uma rede, e não por uma árvore que se ramifica em um padrão dicotômico. Isso pode ser explicado pelo fato de que a reticulação evolutiva é um fenômeno comum, assim como o intercâmbio de DNA é muito frequente entre linhagens distantes (DOOLI-

TITLE, 1999). Nesse contexto, a comparação de filogenias de genes distintos pode ser um método interessante para que se identifiquem eventos de reticulação, uma vez que árvores dicotômicas isoladas nem sempre representam de forma fidedigna as histórias filogenéticas.

Referências

CAMIN, J. H.; SOKAL, R. R. A method for deducing branching sequences in phylogeny. **Evolution**, v. 19, n. 3, p. 311-326, 1965.

CICCARELLI, F. D.; DOERKS, T.; VON MERING, C.; CREEVEY, C. J.; SNEL, B.; BORK, P. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. **Science**, v. 311, n. 5.765, p. 1.283-1.287, 2006.

DARWIN, C. **On the origin of the species by natural selection**. 1859.

DELSUC, F.; BRINKMANN, H.; PHILIPPE, H. Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 5, p. 361, 2005.

DE QUEIROZ, K. Species concepts and species delimitation. **Systematic biology**, v. 56, n. 6, p. 879-886, 2007.

DOOLITTLE, W. F. Phylogenetic classification and the universal tree. **Science**, v. 284, n. 5.423, p. 2.124-2.128, 1999.

ENNOS, R. A.; FRENCH, G. C.; HOLLINGSWORTH, P. M. Conserving taxonomic complexity. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 20, n. 4, p. 164-168, 2005.

FELSENSTEIN, J. **Inferring phylogenies**. Sunderland, MA: Sinauer associates, 2004.

FITCH, W. M. Distinguishing homologous from analogous proteins. **Systematic zoology**, v. 19, n 2, p. 99-113, 1970.

FITCH, W. M. Homology: a personal view on some of the problems. **Trends in genetics**, v. 16, n. 5, p. 227-231, 2000.

GU, Z.; STEINMETZ, L. M.; GU, X.; SCHARFE, C.; DAVIS, R. W.; LI, W. H. Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. **Nature**, v. 421, n. 6.918, p.63, 2003.

HAKES, L.; PINNEY, J. W.; LOVELL, S. C.; OLIVER, S. G.; ROBERTSON, D. L. All duplicates are not equal: the difference between small-scale and genome duplication. **Genome biology**, v.8, p.10, p.R209, 2007.

HENNIG, W. **Phylogenetic Systematics** (University of Illinois Press: Urbana, IL, USA.). 1966.

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

KEELING, P. J.; PALMER, J.D. Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 8, p. 605, 2008.

KOONIN, E. V. Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. **Annual Review of Genetics**, v. 39, p. 309-338, 2005.

KOSKI, L.B.; GOLDING, G. B. The closest BLAST hit is often not the nearest neighbor. **Journal of molecular evolution**, v. 52, n 6, p. 540-542, 2001.

KUBATKO, L. S. Identifying Hybridization Events in the Presence of Coalescence via Model Selection. **Systematic Biology**, v. 58, n. 5, p. 478-488, 2009.

LEISTER, D. Origin, evolution and genetic effects of nuclear insertions of organelle DNA. **Trends in Genetics**. v.21, n. 12, p. 655-63, 2005.

LINDER, C. R.; RIESEBERG, L. H. Reconstructing patterns of reticulate evolution in plants. **American Journal of Botany**. v. 91, n. 10, p. 1700-1.708, 2004.

LONG, M.; BETRÁN, E.; THORNTON, K.; WANG, W. The origin of new genes: glimpses from the young and old. **Nature Reviews Genetics**, v.4, n.11, p. 865, 2003.

MALLET, J. Hybrid speciation. **Nature**, v. 446, n. 7.133, p. 279, 2007.

MAYR, E. **Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist**. Harvard University Press, 1942.

MAYDEN, R. L. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. **Species: The units of biodiversity**, London, Chapman and Hall, p. 381-424, 1997.

NACIRI, Y.; LINDER, H. P. Species delimitation and relationships: the dance of the seven veils. **Taxon**, v. 64, n. 1, p. 3-16, 2015.

PETIT, C.; BRETAGNOLLE, F.; FELBER, F. Evolutionary consequences of diploid–polyploid hybrid zones in wild species. **Trends in Ecology & Evolution**.v. 14, n. 8, p. 306–311, 1999.

PHILIPPE, H.; DERELLE, R.; LOPEZ, P.; PICK, K.; BORCHIellini, C.; BOURY-ESNAULT, N.; DA SILVA, C. Phylogenomics revives traditional views on deep animal relationships. **Current Biology**, v. 19, n. 8, p. 706-712, 2009.

PHILIPPE, H., BRINKMANN, H., LAVROV, D. V., LITTLEWOOD, D. T. J., MANUEL, M., WÖRHEIDE, G., & BAURAIN, D. Resolving difficult phylogenetic questions: why more sequences are not enough. **PLoS biology**, v. 9, n. 3, p. e1.000.602, 2011.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. **Trends in Ecology & Evolution**. v. 16, n. 1, p. 37–45, 2001.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. The Effect of Recombination on the Accuracy of Phylogeny Estimation. **Journal of Molecular Evolution**. v. 54, n. 3, p. 396–402, 2002.

SCHREIBER, F.; PICK, K.; ERPENBECK, D.; WÖRHEIDE, G.; MORGENTERN, B. OrthoSelect: a protocol for selecting orthologous groups in phylogenomics. **BMC bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 219, 2009.

TEMPLETON, A. R. Species and speciation: geography, population structure, ecology, and gene trees. **Endless forms: Species and speciation**, p. 32-43, 1998.

WANG, H. et al. Molecular evidence for asymmetric evolution of sister duplicated blocks after cereal polyploidy. **Plant molecular biology**, v. 59, n. 1, p. 63-74, 2005.

WENDEL, J. F. Genome evolution in polyploids. In: **Plant molecular evolution**. Springer, Dordrecht. p. 225-249, 2000.

ZMASEK, CHRISTIAN, M.; EDDY, SEAN, R. RIO: analyzing proteomes by automated phylogenomics using resampled inference of orthologs. **BMC bioinformatics**. v. 3, n. 1, p. 14, 2002.

Capítulo 7



Princípios básicos de biologia molecular e PCR

*Andressa de Souza-Pollo
Ingrid Bortolin Affonso Lux Hoppe
Luiz Augusto do Amaral*

1 Introdução

Biologia molecular é um ramo da bioquímica que estuda a base molecular das atividades biológicas entre as biomoléculas nos vários sistemas de uma célula, incluindo as interações entre DNA, RNA, proteínas e sua biossíntese, assim como a regulação dessas interações. Técnicas moleculares são utilizadas tanto para estudos de estrutura gênica e suas funções, quanto para inferir atributos históricos de populações ou espécies no campo da biologia evolucionária, que inclui os ramos da genética de populações e filogenética.

A maioria dos estudos moleculares envolve técnicas de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) que são aplicadas com o principal objetivo de amplificar um fragmento-alvo do DNA ou RNA. A forma com que ocorre a replicação do DNA nas células vivas, a transcrição e a tradução dos genes em cadeias polipeptídicas, reflete a maneira com que essas amplificações de fragmentos-alvo de DNA são realizadas *in vitro* e os recursos utilizados para que isso seja possível. Dessa forma, conhecer os princípios básicos da biologia molecular e, consequentemente, da PCR, é essencial para que os estudos realizados *in vitro* possam ser desenvolvidos e otimizados com base técnica e teórica.

2 Nucleotídeos, estrutura e química dos ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos são formados por nucleotídeos, os quais são compostos por um ou mais grupos fosfato, uma pentose que pode ser desoxirribose (DNA) ou ribose (RNA), e uma base purínica (adenina e guanina que possuem um anel pirimidínico fundido a um anel imidazólico) ou pirimidínica (citossina, timina e uracila que possuem um anel heterocíclico). Tais componentes são unidos da seguinte forma: uma base liga-se de maneira covalente (no N-1 das pirimidinas e no N-9 das purinas) ao carbono 1' da pentose em uma ligação N- β -glicosídica enquanto o fosfato é esterificado ao carbono 5'.

O DNA consiste em duas cadeias antiparalelas em um arranjo de dupla hélice de mão direita. Para tanto, os desoxirribonucleotídeos (dNTPs) complementares são ligados por pontes de hidrogênio na parte interna da molécula (adenina se liga à timina por meio de duas pontes de hidrogênio, enquanto citossina se liga à guanina por três pontes de hidrogênio). Os pares de bases são empilhados perpendicularmente ao eixo longo da dupla hélice, separados por 3,4Å. Cada volta da fita de DNA possui 10,5 pares de bases. Uma vez que os dNTPs estão emparelhados corretamente, a polimerase do DNA catalisa a formação de uma ligação fosfodiéster entre o grupo 5'-hidroxila de uma pentose e o grupo 3'-hidroxila da pentose seguinte. Assim, a ligação fosfodiéster ocorre como consequência de um ataque nucleofílico do grupo 3'-OH livre da cadeia em formação sobre o fosfato do dNTP que está sendo incorporado. A hidrólise do trifosfato do nucleotídeo fornece a energia termodinâmica para a polimerização. Após a formação da ligação fosfodiéster, a polimerase do DNA avança um resíduo de nucleotídeo na cadeia-molde posicionando-se para promover a ligação de um novo dNTP à cadeia em crescimento. As ligações fosfodiésteres possuem a mesma direção ao longo da cadeia, o que confere a cada cadeia linear do ácido nucleico uma polaridade específica. As polimerases do DNA só conseguem catalisar o crescimento de uma cadeia polinucleotídica no sentido 5' $\rightarrow$ 3', pois isso garante que a energia necessária para a incorporação de um novo nucleotídeo seja fornecida por ele mesmo e não pela extremidade da cadeia em crescimento. Assim, a estrutura de uma fita de ácido nucleico está sempre escrita na posição 5'.

O formato original da fita do DNA é denominado de forma B; no entanto, existe a forma A que ocorre em soluções desprovidas de água, na qual a fita de DNA torna-se mais larga e mais curta, e a forma Z, na qual a fita de DNA se apresenta em forma de dupla hélice de mão esquerda, mais estreita e alongada, podendo ocorrer naturalmente nas células. Certas sequências de DNA adotam estruturas não usuais como grampos (fita simples) e cruzes (fita dupla). Arranjos de DNA como palíndromos, sequências polipirimídicas ou

polipúricas, que podem formar hélices tríplices ou mesmo DNA-H, são sítios reconhecidos por proteínas de ligação e podem ser encontrados em regiões de expressão gênica. As fitas simples de RNA geralmente formam gramplos, regiões de dupla hélice ou alças complexas.

Tanto o DNA quanto o RNA contêm bases secundárias, sendo mais comuns as formas metiladas (com adição de um grupo metila -CH₃) das bases principais. Este recurso pode funcionar como defesa do organismo, tendo como exemplo a bactéria *Escherichia coli*, que destrói os segmentos de DNA que não forem metilados. Outro sistema celular metila resíduos de adenina dentro das sequências de DNA, a fim de reparar o pareamento incorreto de bases durante a replicação do DNA. Além disso, a metilação suprime a migração de segmentos de DNA denominados transposons.

As propriedades das bases nucleotídicas afetam a estrutura tridimensional dos ácidos nucleicos. Dependendo do pH, as bases nitrogenadas podem existir em duas ou mais formas tautoméricas. Tautômero é um tipo de isômero resultante do deslocamento transitório das ligações químicas em uma molécula. Na forma tautomérica, as bases emparelham-se diferentemente da forma usual. Por exemplo, a forma imino da adenina emparelha com a citosina, e a forma enol da timina emparelha-se com a guanina. Ao voltar ao seu estado normal, o que ocorre muito rapidamente, o emparelhamento não é mantido e ocorre uma alteração na estrutura da dupla hélice. Se esta base com pareamento errado não for retirada antes da próxima replicação, uma mutação será introduzida no DNA. No momento da replicação do DNA, se a hélice estiver alterada, a DNA polimerase interrompe o processo, volta na direção 3'→5', despolimerizando a cadeia recém-sintetizada e, após algumas dezenas ou até centenas de bases, recomeça o trabalho.

Outras causas de mutações incluem: (i) desaminação, que ocorre quando o aminoácido libera seu grupo amina na forma de amônia e transforma-se em um cetoácido correspondente; (ii) hidrólise da ligação N-β-glicosídica entre a base e a pentose, que ocorre mais frequentemente para as purinas; e (iii) radiação UV, que provoca a condensação de dois grupos etileno para formar um anel ciclobutano, originando dímeros de pirimidina. Dímero de pirimidina é um composto orgânico formado por duas bases pirimidínicas sucessivas ou espacialmente próximas numa sequência de DNA, unidas por uma ligação covalente. A presença desse composto pode impedir o processo de replicação do DNA, causando morte celular.

A dupla hélice do DNA e os gramplos de RNA podem ser desnaturados. O DNA desnatura-se em extremos de pH e em temperatura acima de 80°C, dependendo de seu conteúdo de bases C-G, cuja ligação tripla é mais difícil de ser desnaturada. A ligação RNA-RNA é mais estável do que a ligação

DNA-DNA, e em condições de pH neutro, tal ligação necessita de, pelo menos, 20°C a mais para ser desnaturada. Todas as bases nucleotídicas absorvem luz UV. Além disso, os ácidos nucleicos possuem forte absorção em comprimentos de onda próximos a 260 nm; por este motivo, é possível quantificar ácidos nucleicos neste comprimento de onda em espectrofotômetros. As bases púricas e pirimídicas são hidrofóbicas e relativamente insolúveis em água, em pH neutro. Em pH ácido ou alcalino, as bases tornam-se carregadas e sua solubilidade em água aumenta (NELSON; COX, 2006).

3 Replicação do DNA e RNA

A replicação do DNA é semiconservativa. Cada fita de DNA atua como um molde para a síntese da nova fita. A fita líder é sintetizada continuamente na direção 5'→3' pelas DNAs polimerases, enquanto a outra fita é sintetizada descontinuamente como fragmentos de Okazaki, os quais são subsequentemente ligados. Durante sua ação enzimática, a DNA polimerase polimeriza dNTPs, liberando ânions de pirofosfato como subproduto. A replicação do DNA requer um iniciador que, na maioria das vezes, é uma molécula de RNA em vez de uma de DNA. A maioria das células possui várias DNAs polimerases, sendo que algumas adicionam apenas alguns nucleotídeos antes de se dissociar, já outras adicionam milhares deles. A fidelidade da replicação é mantida pela seleção das bases pela polimerase e pela atividade da exonuclease 3'→5' que remove os nucleotídeos despareados, permitindo com que a polimerase entre em ação novamente, revisando a fita. Já a exonuclease 5'→3' repara tanto o DNA quanto remove os iniciadores de RNA.

A replicação do RNA, por sua vez, é realizada na direção 5'→3' a partir da fita de DNA molde 3'→5'. Assim, a fita codificadora não é a fita molde de DNA. Na transcrição, o DNA desaparece aos poucos, e o RNA é alongado pela enzima RNA polimerase dependente de DNA, que utiliza ribonucleosídeos 5'-trifosfatos. Neste caso, não é necessário um iniciador, a RNA polimerase liga-se a um promotor, e a fita cresce a partir da extremidade 3'-hidroxila. Um íon Mg^{+2} facilita o ataque pelo grupo 3'-OH ao nucleosídeo-trifosfato, o outro íon facilita o deslocamento do pirofosfato inorgânico e ambos os íons metálicos estabilizam o estado de transição pentacovalente. As células eucarióticas possuem três espécies de RNA polimerases nucleares: *PolI*, que faz a síntese do RNA pré-ribossômico que contém o precursor para os RNAs ribossomais; *PolII*, que faz a síntese dos RNAs mensageiros (mRNA) e de alguns RNAs especializados; e *PolIII*, que sintetiza RNAs transportadores (tRNA), o RNA ribossomal 5S e alguns pequenos fragmentos de RNA especializados.

Tanto os íntrons como os éxons são transcritos em RNA a partir do DNA. Os segmentos de DNA codificadores são denominados éxons, enquanto os íntrons são sequências intervenientes de DNA que não são traduzidas. Os íntrons não são exclusivos de eucariontes, podendo ocorrer também em bactérias e vírus (KIENZLE et al., 1999; HAUSNER; HAFEZ; EDGELL, 2014).

A molécula de RNA recém-sintetizada é chamada de transcrito primário, da qual os íntrons são removidos e os éxons unidos, formando uma sequência contínua que especifica um polipeptídeo funcional. Os íntrons do mRNA são processados dentro dos ribonucleossomos que catalisam o processamento interno. Na transcrição do mRNA, um resíduo modificado, chamado de capacete 5', é adicionado à extremidade 5' do RNA. Esse capacete é um resíduo de metilguanossina que ajuda a proteger o mRNA das ribonucleases, além de se ligar a um complexo de proteínas e, também, de participar da ligação do mRNA ao ribossomo para iniciar a tradução. Após a transcrição, a extremidade 3' do mRNA é clivada, e no caso de organismos eucariotos, 80 a 250 resíduos de adenina (calda poliA) são adicionados. Os procariotos também possuem calda poliA no mRNA, que geralmente é menor, de 15 a 60 resíduos de adenina; no entanto, em procariotos, ela não é essencial para a tradução, como ocorre em eucariotos (SARKAR, 1997). A cauda poliA serve como sítio de ligação para uma ou mais proteínas específicas e também ajuda a proteger o mRNA da destruição enzimática. O destino final de qualquer RNA é sua completa e regulada degradação (NELSON; COX, 2006).

4 Tradução e metabolismo das proteínas

Gene é todo DNA que codifica a sequência primária de algum produto gênico final, que pode ser um polipeptídeo ou um RNA com função estrutural ou catalítica. Um gene pode originar múltiplos produtos pelo processamento diferencial do RNA. Já as sequências reguladoras são aquelas que fornecem sinais que podem denotar o início ou o fim dos genes. O processo de tradução do mRNA ocorre no ribossomo, que possui basicamente duas subunidades principais: a pequena e a grande (SSU - *small Subunit* e LSU - *Large Subunit*). Em eucariotos, essas subunidades correspondem a 18S e 28S, e em procariotos a 16S e 23S, respectivamente. Durante a tradução, as duas subunidades de forma irregular ajustam-se para formar uma fenda através da qual passa o mRNA, códon por códon, enquanto a leitura é realizada e traduzida em uma cadeia polipeptídica. Um códon é constituído por três nucleotídeos que codificam um aminoácido. Um aminoácido, por sua vez, pode ser especificado por mais de um códon e, neste caso, é denominado como degenerado. Nesse

contexto, o RNA transportador (tRNA) funciona como uma ponte que carrega os aminoácidos para o ribossomo. Os tRNAs pareiam com os códons do mRNA em uma trinca chamada anticódon. A terceira base do códon (5'-3') pareia com a primeira base do anticódon. Um tRNA pode reconhecer, no máximo, três códons diferentes, caso se inicie com inosina. A terceira posição em cada códon é muito menos específica que a primeira, e a segunda é dita como oscilante. Quando vários códons codificam um aminoácido, a diferença entre eles está na terceira letra da extremidade 3'. O códon de iniciação é composto por AUG, enquanto os códons, de terminação podem ser UAA, UAG e UGA. Um em cada vinte códons em cada pauta de leitura, é, em média, um códon de terminação. Uma pauta de leitura que não tenha um códon de terminação entre 50 ou mais códons é referida como uma pauta de leitura aberta (ORF – *Open Reading Frame*). Geralmente, ORFs longas correspondem a genes que codificam proteínas.

No citosol, as aminoacil-tRNAs sintetases esterificam os vinte aminoácidos aos seus tRNAs correspondentes com o auxílio de íons Mg^{+2} , além de possuírem função de revisão. Esse processo possui duas finalidades: a ativação de um aminoácido para a formação da ligação peptídica, e a ligação do aminoácido a um tRNA adaptador, que garante a colocação apropriada do aminoácido em uma cadeia polipeptídica em crescimento.

Após o término da tradução, as cadeias de polipeptídeos recém-sintetizadas sofrem enovelamento e processamento, que são modificações realizadas pós-tradução como modificação de aminoácidos individuais, fixação das cadeias laterais de carboidratos, formação de pontes dissulfeto, dentre outras. Posteriormente, uma sequência sinalizadora, localizada no terminal amino das proteínas, indica seu endereçamento, onde muitas proteínas serão glicosiladas para formar as glicoproteínas. Quando as proteínas são defeituosas e precisam ser degradadas ou quando precisam ser renovadas, os aminoácidos são reutilizados, e o ciclo recomeça (NELSON; COX, 2006).

5 PCR: reação da polimerase em cadeia

A técnica de PCR foi descrita por Saiki et al. (1985) e inovada por Mullis e Faloona (1987), cuja patente foi comprada pela *Perkin-Elmer Cetus*, rendendo a Mullis o prêmio Nobel de Química, em 1993. A grande inovação de Mullis foi a introdução de oligonucleotídeos iniciadores específicos e a utilização de uma DNA polimerase termoestável, isolada da bactéria *Thermus aquaticus* encontrada em fontes termais. Esta enzima mantém-se estável em temperaturas de até 117°C, com temperatura ótima de 72°C.

Assim como ocorre na replicação do DNA *in vivo*, as reações de PCR também necessitam de oligonucleotídeos iniciadores ou *primers*, uma vez que a DNA polimerase pode adicionar nucleotídeos somente a um grupo 3'-OH preexistente. O par de oligonucleotídeos iniciadores *forward* e *reverse* são compostos, geralmente, por 20 a 30 bases e são desenhados sempre na direção 5'→3', incluindo aquele que se ligará na fita antissenso (lembrando que na replicação do DNA *in vivo* a fita antissenso é composta por fragmentos de Okazaki sintetizados na direção 5'→3'). A Taq DNA polimerase é a enzima que fará o papel da DNA polimerase, estendendo a fita de DNA a partir dos oligonucleotídeos iniciadores que se pareiam à fita de DNA modelo ou DNA *template*, utilizando os dideoxinucleotídeos (dNTPs) A, T, C e G (dATP, dTTP, dCTP, dGTP). A atividade, estabilidade e fidelidade da Taq DNA polimerase são garantidas por uma solução-tampão composta por íons que otimizam as condições da reação, cuja concentração varia de acordo com o fabricante da enzima. Íons metálicos de Mg^{+2} são precursores enzimáticos estritamente essenciais para o funcionamento da Taq DNA polimerase *in vitro*, da mesma forma que *in vivo*, e são usualmente adicionados às reações em forma de $MgCl_2$.

As reações de PCR ocorrem em temperaturas específicas e obedecem a uma fórmula geral, que poderá ser alterada conforme as necessidades de cada trabalho. O passo inicial é sempre o de desnaturação, que ocorre de 94°C a 98°C, dependendo da atividade da DNA polimerase e do conteúdo G-C do DNA *template*. Uma reação típica começa com dois minutos a 94°C, não podendo ser estendida por mais do que três minutos para não destruir a atividade enzimática. Caso o conteúdo G-C do DNA *template* seja muito alto e haja necessidade de estender este tempo de desnaturação, recomenda-se uma *hot-start PCR*, que anteriormente consistia em adicionar a DNA polimerase após o primeiro passo exagerado de desnaturação. Atualmente, existem Taq DNA polimerases no mercado, específicas para este tipo de reação. O próximo passo consiste em um ciclo térmico com três temperaturas que se repetem de 25 a 35 vezes. A primeira temperatura é geralmente a mesma utilizada inicialmente para a desnaturação, de 94°C, em torno de, no máximo, um minuto. Este passo é seguido pela temperatura de anelamento dos *primers* à fita de DNA molde que pode variar, com algumas exceções, de 50 a 60°C, de 30 a 60 segundos. O ciclo termina com um passo de elongação da fita de DNA, que requer de um a dois minutos a cada 1kb do fragmento de DNA-alvo. Essa temperatura é usualmente aquela apropriada para a DNA polimerase utilizada na reação, de 70 a 80°C, sendo a temperatura mais utilizada de 72°C. A fase final da termociclagem compreende um passo de 5 minutos ou mais na temperatura de elongação da Taq DNA polimerase. Este último passo permi-

te a síntese de muitos produtos de PCR ou *amplicons* incompletos e permite que a Taq DNA polimerase adicione um resíduo de adenina à extremidade 3' de todos os produtos de PCR. Essa modificação é necessária para subseqüentes processos de clonagem que requerem uma extremidade 3'-OH livre (LORENZ, 2012).

Com o avanço dos ciclos térmicos, as reações de PCR começam a gerar cópias do fragmento de DNA-alvo, exponencialmente. Apenas durante a fase exponencial da PCR é possível quantificar o número de sequências do DNA-alvo contidas na amostra. Devido à presença de inibidores da polimerase na reação, provenientes da amostra, limitação de reagentes, acumulação de moléculas de pirofosfato e autoanelamento dos produtos de PCR, a reação cessa a amplificação do fragmento-alvo em um determinado ponto e um efeito *plateau* ocorre, fazendo com que, deste ponto em diante os produtos de PCR quantificados não correspondam mais à quantidade de sequências do DNA-alvo na amostra. Por esse motivo, não é usual a quantificação de produtos de PCR em espectrofotômetros. Caso o objetivo do trabalho seja quantificar *amplicons* numa reação de PCR, é necessário lançar mão da técnica de PCR em tempo real.

Embora seja relativamente simples, as reações de PCR podem apresentar falhas de funcionamento, mesmo cumprindo-se todos os passos corretamente. Neste caso, modificações pontuais e assertivas do protocolo são necessárias. Por exemplo, amostras que contêm potenciais inibidores da reação, como compostos fenólicos, podem ser suplementadas com BSA (*Bovine Serum Albumin*), que também é usualmente incluído em reações de digestão com enzimas de restrição, pois este reagente liga-se a substâncias impeditivas da atividade enzimática. Já no caso de reações de PCR de DNAs-alvo com grande conteúdo G-C (>60%), a adição de DMSO (Dimetilsulfóxido) e formamida é recomendada, pois estes reagentes rompem o pareamento de bases. Além disso, a formamida aumenta a estringência do anelamento dos *primers*, o que resulta em diminuição de amplificações inespecíficas e no aumento da eficiência de reação (FARELL; ALEXANDRE, 2012). Tanto o DMSO quanto a formamida são muito tóxicos e devem ser manipulados corretamente, segundo as instruções do fabricante.

Compreender a função dos reagentes utilizados na PCR convencional é um fator crítico na decisão da melhor forma de alterar as condições da reação para obter o produto desejado. A expressão “quanto mais melhor” é desastrosa neste tipo de técnica. Dentre as inúmeras variáveis em uma reação de PCR, alguns pontos devem ser considerados a priori. Um deles é a concentração de $MgCl_2$ na reação, cujo valor ótimo é entre 2,0 a 2,5 mM. Quantidades baixas de Mg^{2+} resultará em baixo rendimento de PCR ou completa

ausência de amplificação, uma vez que este íon é necessário para a atividade da polimerase. No entanto, quantidades muito elevadas de Mg^{2+} podem dificultar a completa desnaturação do DNA *template* por estabilizar a fita dupla de DNA, além de resultar na estabilização do anelamento dos *primers* a fragmentos incorretos do DNA *template* e, portanto, diminuir a especificidade de amplificação dos produtos de PCR desejados. A quantidade de dNTPs na reação também é um fator limitante, principalmente, quando as proporções de A, T, C e G não estão na mesma quantidade na solução. Uma solução de dNTP na concentração final de 200 μM na reação de PCR é ideal, pois baixas concentrações de dNTPs podem aumentar tanto a especificidade quanto a fidelidade das reações, enquanto altas concentrações desse reagente podem, inclusive, inibir a PCR.

A escolha da Taq DNA polimerase apropriada para o trabalho também é muito importante. Assim como a DNA polimerase comete erros na replicação do DNA *in vivo*, a Taq DNA polimerase também os comete *in vitro*. No entanto, a Taq DNA polimerase não possui a atividade exonuclease 3'→5' e, portanto, é incapaz de corrigir nucleotídeos incorporados incorretamente como ocorre na síntese de DNA. As Taq DNA polimerases comerciais têm uma margem de erro de aproximadamente 1×10^{-5} a 2×10^{-4} , sendo as transições AT→GC e GC→AT as mais frequentes, respectivamente. Assim, em caso de reações de amplificação de fragmentos que serão sequenciados, recomenda-se a utilização de Taq DNA polimerases com característica de alta fidelidade, o que não elimina os erros completamente, mas os diminui. As DNAs polimerases mais fiéis do mercado, atualmente, são *Pwo*, *Phusion* e *Pfu* (MCINERNEY; ADAMS; HADI, 2014). Independentemente da Taq DNA polimerase utilizada, quantidades inferiores a 0,45 unidade da enzima na reação diminuirá drasticamente as amplificações; por outro lado, quantidades superiores a uma unidade poderão resultar em inespecificidade de amplificação diretamente proporcional ao aumento da quantidade de enzima na reação.

A quantidade de DNA *template* adicionada à reação também afeta significativamente sua eficiência e está diretamente relacionada com a origem do DNA e a abundância da região-alvo na amostra. Caso todo material genético da amostra contenha o fragmento-alvo, é aconselhável que este DNA *template* seja utilizado na concentração de 2,25 a 3,0 ng a cada μL de reação. A quantificação do DNA poderá ser realizada em espectrofotômetro a 260 nm, cuja relação dos comprimentos de onda 260/280 nm é desejável entre 1,8 a 2,0, o que indica um DNA de boa qualidade. Valores inferiores a estes são indicativos de contaminação por proteínas e/ou compostos orgânicos que, possivelmente, prejudicarão as reações de PCR (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Por outro lado, quando o fragmento-alvo está em pequenas quantidades em uma

amostra que possui material genético de diversas fontes, a quantificação do DNA não será real em termos de DNA *template* e, portanto, a utilização de quantidades maiores de DNA na reação faz-se necessária. No entanto, sabe-se que o excesso de DNA na reação também resulta em inespecificidade de amplificação (RUIZ-VILLALBA et al., 2017); assim, nestes casos, a titulação do DNA seguido de testes de otimização são recomendados.

As características dos oligonucleotídeos iniciadores também constituem fatores primordiais na especificidade das reações de PCR. Recomenda-se que os primers possuam 40 a 60% de conteúdo G-C para que o anelamento seja forte o bastante para ser mantido. Além disso, a presença das bases G e C próximo à extremidade 3' é importante para evitar que as pontas dos *primers* fiquem “soltas”, não ficando aneladas ao DNA *template*. As sequências dos primers *forward* e *reverse* não devem ser complementares entre si nem de forma parcial, assim como a extremidade 3' de um primer não deve ser complementar à outra extremidade dele mesmo. Caso isso ocorra, poderá haver a formação de dímeros de *primers* e estruturas em *hairpin loop*, respectivamente. Atenção também deve ser dada ao que significa temperatura de *melting* (T_m) e temperatura de anelamento (T_a). A T_m de um *primer* é definida pela temperatura na qual este estará anelado a 50% das sequências-alvo do DNA *template*. Essa temperatura, acrescida de aproximadamente 5°C, corresponde à T_a escolhida para a respectiva fase do ciclo de termociclagem. Há inúmeras calculadoras de T_m disponíveis online; no entanto, todas elas baseiam-se na seguinte fórmula: $T_m \approx 4(G-C) + 2(A-T)$. Por fim, repetições dinucleotídicas (ex. ATATATATAT) ou de nucleotídeos únicos (ex. AAAAA), nas sequências de *primers*, devem ser evitadas a fim de prevenir escorregamentos do primer no segmento homólogo a ele e estruturas em *hairpin loop* (LORENZ, 2012).

Tendo em vista tudo o que foi explanado, recomenda-se que se inicie uma reação com 2 mM de $MgCl_2$; 200 μM de dNTPs; 5 pmol de cada *primer*; 0,5-1 U de Taq DNA polimerase; 60 ng de DNA *template*, acrescido de solução-tampão e água ultrapura em proporções a serem calculadas. A temperatura de anelamento calculada para o primer deve ser testada, assim como temperaturas próximas a estas em um intervalo de $\pm 3^\circ C$. Se todos os testes falharem, é interessante que a viabilidade de todos os reagentes seja testada com *primers* e DNAs *template* padrão. Caso todos os reagentes estejam funcionando corretamente, os *primers* deverão ser redesenhados antes de novas tentativas. Desenvolver o protocolo de PCR mais adequado para cada ensaio requer estudo, paciência e conhecimento teórico-prático.

Referências

- FARELL, E. M.; ALEXANDRE, G. Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 257, p. 1-8, 2012. DOI: 10.1186/1756-0500-5-257.
- HAUSNER, G.; HAFEZ, M.; EDGELL, D. R. Bacterial group I introns: mobile RNA catalysts. **Mobile DNA**, v. 5, n. 8., p. 1-12, 2014. DOI: 10.1186/1759-8753-5-8.
- KIENZLE, N.; YOUNG, D. B.; LIASKOU, D.; BUCK, M.; GRECO, S.; SCULLEY, T. B. Intron retention may regulate expression of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3 Family Genes. **Journal of Virology**, v. 73, n. 2, p. 1.195–1.204, 1999.
- LORENZ, T. C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. **Journal of Visualized Experiments**, v. 63, e3.998, p. 1-15, 2012, DOI: 10.3791/3998.
- MCINERNEY, P.; ADAMS, P.; HADI, M. Z. Error rate comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase. **Molecular Biology International**, v. 2014, 287430, p. 1-8, 2014. DOI:10.1155/2014/287430.
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4. ed., Editora Sarvier, cap.8, p. 24-27. 2006.
- RUIZ-VILLALBA, A.; VAN PELT-VERKUIL, E.; GUNST, Q. D.; RUIJTER, J.M.; VAN DEN HOFF, M.J.B. Amplification of nonspecific products in quantitative polymerase chain reactions (qPCR). **Biomolecular Detection and Quantification**, v. 14, p. 7-18, 2017. DOI: 10.1016/j.bdq.2017.10.001.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4.732, p. 1.350-1.354, 1985.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. CSHL Press, 2001. p. 1.448.
- SARKAR, N. Polyadenylation of mRNA in prokaryotes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 66, p. 173-197, 1997. DOI: 10.1146/annurev.biochem.66.1.173.

Capítulo 8



Atenuantes de estresses abióticos em plantas cultivadas

Letícia Rodrigues Alves

Rita de Cássia Alves

Mirela Vantini Checchio

Laílson Kevein Ruas de Oliveira

Sônia Maria Raymundo Carregari

Priscila Lupino Gratão

1 Introdução

Fornecer alimentos em quantidade e em qualidade adequada para a crescente população vai tornar-se um grande desafio em um futuro próximo, devido ao efeito negativo das alterações climáticas no crescimento e no desenvolvimento dos vegetais. O excesso de radiação, salinidade, seca, alagamento e a presença de metais pesados no solo são denominados estresses abióticos, que interferem no crescimento e no desenvolvimento das plantas, acarretando em perdas na produtividade agrícola. Essas adversidades causam um desequilíbrio na homeostase celular, levando a severas alterações no metabolismo do vegetal, que comprometem seu crescimento e seu desenvolvimento (GRATÃO et al., 2005). Em resposta a essas condições desfavoráveis, as plantas desenvolveram vários mecanismos fisiológicos e moleculares que fornecem tolerância ou adaptação aos variados tipos de estresses (IMADI et al., 2015).

O estresse oxidativo é uma consequência direta da exposição do vegetal a adversidades ambientais. Durante uma situação de estresse, ocorre a superprodução das espécies reativas de oxigênio (ERO), na qual, durante a redução do oxigênio molecular em uma molécula de água, ocorre a transferência de um, dois ou três elétrons ao O_2 , formando radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila ($OH^{\bullet}$) e outros produtos como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2) (DEMIDCHIK, 2015). Essas moléculas são altamente reativas e causam a peroxidação lipídica e o extravasamento de membranas, sendo danoso para a sobrevivência do vegetal.

Um dos principais mecanismos de defesa das plantas contra a superprodução das EROs é o sistema antioxidante de defesa, composto por várias enzimas e compostos não enzimáticos que atuam na eliminação das EROs. As enzimas antioxidantes apresentam alta afinidade com EROs específicas, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase de ascorbato (APX), glutathione redutase (GR), monodeidroascorbate redutase (MDHAR), desidroascorbate redutase (DHAR), glutathione peroxidase (GPX), peroxidase de guaicol (GOPX), peroxidase (POX) e glutathione-S-transferase (GST). Por outro lado, os antioxidantes não enzimáticos não são específicos para os EROs, como o ácido ascórbico (AsA), glutathione (GSH), prolina, poliaminas, betaína, carotenos e flavonoides (ZAGORCHEV et al., 2013). Ambos os compostos antioxidantes e as enzimas antioxidantes funcionam em conjunto para interromper a cascata descontrolada de oxidação e evitar danos celulares (GRATÃO et al., 2005).

Estudos em diversos campos têm sido realizados visando a compreender os mecanismos que intermedeiam as respostas aos estresses ambientais. Por exemplo, estudos a nível transcriptômico têm sido aplicados em culturas comerciais, como arroz, cana-de-açúcar, trigo e milho. Esses estudos forneceram informações valiosas sobre as redes genéticas das respostas das plantas aos estresses abióticos e ajudam a compreender as respostas fisiológicas e moleculares em termos da regulação de genes, diferenciação de genes e modificações pós-transcricionais que ocorrem durante uma situação de estresse. Assim, a transcriptoma, juntamente com outras abordagens biotecnológicas ajudam na tolerância ao estresse nas culturas (IMADI et al., 2015).

Outra ferramenta bastante recente que tem sido estudada com o objetivo de aumentar a tolerância contra estresses abióticos é a engenharia genética. Nessa tecnologia, genes responsivos ao estresse são selecionados em organismos (ex. bactérias, plantas selvagens) e são inseridos em culturas de interesse comercial, que geralmente são sensíveis a estresses, criando um vegetal geneticamente modificado. No entanto, esta prática ainda não é completamente compreendida, pois apenas os genes já descritos podem ser

utilizados (ASHRAF; AKRAM, 2009). Portanto, a identificação destes genes são imprescindíveis para superar o estresse induzido por efeitos adversos nos níveis transcricional e translacional (YANG et al., 2014). Além disso, para a implementação de um organismo geneticamente modificado, são necessários anos de estudos para assegurar a inserção desta nova planta no ambiente e também é necessária uma adequação das legislações de cada país e da aceitação do público consumidor (AHANGER et al., 2017). Devido a tais dificuldades com o uso da engenharia genética, o uso de atenuantes tem sido uma estratégia interessante para atenuar os estresses ambientais (Figura 1). Além disso, vários estudos reforçam os efeitos positivos dessas substâncias atenuantes no aumento da produtividade agrícola (VAN OOSTEN et al., 2017).

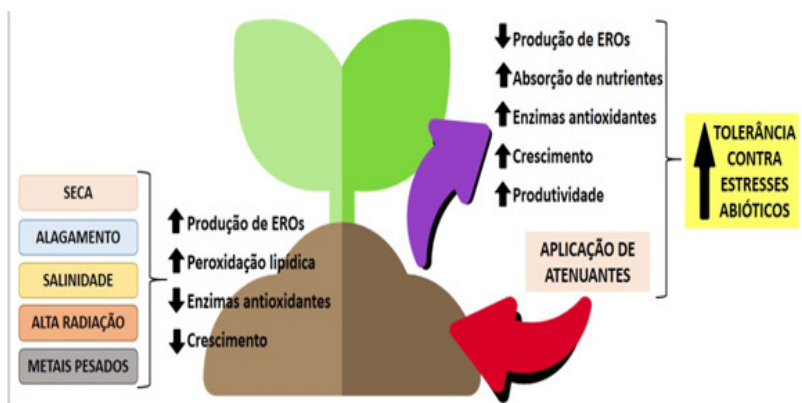


Figura 1. Mecanismo de ação dos atenuantes contra os estresses abióticos.

2 Atenuantes

Os atenuantes são substâncias diversificadas, como reguladores de crescimento, nutrientes e substâncias químicas, que podem ser adicionados ao ambiente em que a planta se encontra, aumentam a absorção e a eficiência de nutrientes essenciais e causam efeitos positivos sobre seu crescimento e desenvolvimento, melhorando a qualidade da cultura (BROWN; SAA, 2015). Além disso, muitos atenuantes mostram efeitos positivos contra os estresses ambientais, aumentando a tolerância da planta contra a seca, a salinidade e altas temperaturas (DU JARDIN, 2015).

O conceito denominado de substância atenuante foi estabelecido em 2012, e, a partir daí, tem sido amplamente adotado na agricultura (VAN OOS-

TEN et al., 2017). Os estudos que comprovam a eficiência dos atenuantes foram realizados principalmente nas espécies cultivadas de grãos, como o trigo, a cevada e o milho; no entanto, vários vegetais também têm sido estudados. A aplicação de atenuantes nas culturas agrícolas demanda muitos estudos de campo, pois é necessário especificar as doses adequadas para produzir o melhor efeito no crescimento e na proteção contra os estresses em cada espécie. Além disso, é fundamental que se compreendam os mecanismos envolvidos de cada atenuante no metabolismo vegetal para aproveitar ao máximo seu potencial. Isso será possível através de uma abordagem combinada, utilizando conhecimentos em biologia, química e a nova tecnologia dos “omics” (POVERO et al., 2016).

3 Reguladores de crescimento como atenuantes

Os hormônios vegetais alteram o crescimento em resposta às mudanças que ocorrem em seu ambiente, portanto estes são de fundamental importância para as respostas das plantas aos diversos estresses abióticos, tendo em vista que os estresses provocam, corriqueiramente mudanças na produção, na distribuição e na transdução de sinal dos hormônios vegetais, o que pode promover mecanismos de proteção específicos (COLEBROOK et al., 2014). Os principais hormônios produzidos pelas plantas são auxinas, giberelinas (GA), citoquininas (CK), ácido abscísico (ABA), etileno (ET), ácido salicílico (SA), jasmonatos (JA), brassinosteroides (BR) e strigolactonas. As vias de sinalização estão intrinsecamente interligadas entre estes hormônios, o que favorece uma eficiente resposta ao estresse (VERMA et al., 2016).

Apesar de todos estes terem estrita relação na defesa das plantas contra estresses abióticos, o hormônio que é corriqueiramente responsável pela defesa das plantas contra os estresses abióticos, é o ABA, pois em condições ambientais adversas, como seca, salinidade, frio, estresse térmico, entre outros, são conhecidos por provocar o aumento nos níveis de ABA nas plantas (VERMA et al., 2016). Não é nenhuma novidade a contribuição que o ABA apresenta como resposta de defesa da planta contra condições de estresse abiótico. Em condições osmóticas, como alta salinidade e seca, o ABA é responsável por estimular respostas de curto prazo, como, por exemplo, o fechamento dos estômatos, resultando no equilíbrio de água na planta, assim como resposta de crescimento a longo prazo através da regulação de genes que respondem ao estresse (ZANG et al., 1987). O acúmulo de ABA ocorre em condições de estresses osmóticos devido à expressão de vários genes de biossíntese do ABA serem regulados positivamente pela seca e pela salinidade (ZHU, 2002).

Não só o ABA, mas também outros hormônios vegetais apresentam

relação bem estrita com os estresses abióticos, como, por exemplo, a auxina e a citocinina, que atuam interagindo com as EROs, fazendo com que as plantas em condições desfavoráveis ajustem seu crescimento (BIELACH et al., 2017).

Jaroslav et al. (2009), através da aplicação exógena de auxina no tomateiro, observaram que os níveis de H_2O_2 foram reduzidos nas raízes, fato que se deu devido à atividade de enzimas como a catalase, o superóxido dismutase e peroxidases. A aplicação de auxina sintética em duas cultivares de milho teve efeito altamente estimulante sobre o crescimento das raízes e da parte aérea em condições de salinidade (ZÖRB et al., 2013). O pré-tratamento com ABA exógeno, em dois genótipos de *Elymus nutans*, um sensível ao frio e outro tolerante ao frio, reduziu os danos oxidativos causados pelas EROs assim como aumentou a atividade de enzimas antioxidantes e de compostos antioxidantes não enzimáticos, em ambos os genótipos (FU et al., 2017). Por outro lado, o uso de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cinetina foi efetiva na atenuação do estresse térmico em *Brassica juncea* (L.) (CHHABRA et al., 2013). Em Canola, sob aplicação foliar de $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ ABA, houve aumento da massa seca, da taxa de fotossíntese, da atividade de enzimas antioxidantes e da concentração de K^+ (FARHOUDI; SAEEDIPOUR, 2011). Portanto, é evidente que a aplicação exógena de hormônios vegetais é uma estratégia interessante para minimizar os danos acarretados pelos estresses abióticos.

4 Aplicação exógena de substâncias químicas

O ácido ascórbico e o óxido nítrico têm sido utilizados na agricultura com o intuito de atenuar os danos dos estresses ocasionados pelas adversidades ambientais a que as plantas estão constantemente expostas. O ascorbato é um importante antioxidante não enzimático, formado nos vegetais através de diversas vias de biossíntese (MASTROPASQUA et al., 2012), sendo constituído por um sistema redox importante na manutenção celular sob condições normais ou estressantes (NOCTOR; FOYER, 1998). O ácido ascórbico, por sua vez, tem sido muito utilizado através da aplicação exógena em pesquisas, a fim de conferir melhores respostas aos estresses abióticos.

Alguns trabalhos destacam sua importância devido aos papéis fisiológicos que apresenta, como, por exemplo, na floração e na senescência, atuando também como um cofator para a síntese de alguns hormônios (BARTH et al., 2006). Além disso, atua também na mitigação do estresse através da desintoxicação das EROs, incluindo a redução do peróxido de hidrogênio na via cíclica, na qual o ácido ascórbico atua como substrato principal dessa desintoxicação (REHMAN et al., 2014). Em conjunto com a glutatona, outro importante antioxidante participa de reações do ciclo ascorbato-glutatona,

associados com o equilíbrio redox celular, exercendo funções relacionadas à preservação de uma série de processos metabólicos (DRAZKIEWICZ et al., 2003), como, por exemplo, na regulação dos mecanismos antioxidantes. A peroxidase do ascorbato detém um papel essencial na regulação dos níveis das ERO, sendo enzimas de ligação heme, componentes-chave na eliminação do peróxido de hidrogênio que o reduzem à água através do ascorbato, como doador de elétrons (SUZUKI et al., 2013).

Já o óxido nítrico é uma molécula de sinalização envolvida em muitos processos fisiológicos, caracterizado como um gás altamente difusível, podendo ser sintetizado endogenamente nas plantas. Com relação ao seu papel, muitos estudos demonstram o óxido nítrico como mediador em diversos processos biológicos associados ao crescimento e ao desenvolvimento vegetal, sendo dessa forma considerado como um regulador de crescimento (BELIGNI et al., 2001), em que sua aplicação exógena a concentrações mais baixas tem mostrado efeitos benéficos, desde a germinação até a senescência (SAMI et al., 2018). Além disso, está envolvido no processo de assimilação de nitrogênio (N) nos vegetais, sendo relatado como uma molécula de sinalização na via de detecção de nitrato (SUN et al., 2015). Um trabalho recente também demonstrou sua importante atuação na regulação transcricional e pós-transcricional das enzimas nessa via de assimilação do N (BALOTF et al., 2018).

Estudos também demonstram o envolvimento do óxido nítrico nos mecanismos de defesa das plantas perante diversos estresses abióticos. Embora estes mecanismos ainda não estejam completamente elucidados, muitos estudos demonstram que, sob estresses abióticos, o óxido nítrico pode atuar de formas distintas, tanto através da eliminação de radicais superóxidos como pela modulação da atividade de várias enzimas antioxidantes, podendo ocasionar o aumento desta atividade em muitas enzimas. Sob estresse por determinados metais, por exemplo o óxido nítrico, tem efeito protetor, e sua aplicação exógena pode aliviar a toxicidade conferida pelo metal (SAMI et al., 2018).

5 Nutrientes

A suplementação exógena de nutrientes não essenciais, como o silício (Si), é benéfica para as plantas, particularmente sob condições de estresse abiótico. O Si possui um papel multifacetado na regulação de genes que podem estar envolvidos no processo de tolerância e induzir respostas de defesa nas plantas, como aumentar a atividade de enzimas antioxidantes e melhorar a capacidade fotossintética, e aumentar a absorção de água, mesmo sob condição de estresse (SIVANESAN et al., 2013).

Embora muitos estudos tenham demonstrado os diversos efeitos benéficos que o uso do Si proporciona às plantas, pouco pode ser encontrado sobre seu papel na regulação molecular de genes em plantas submetidas a estresses abióticos. A expressão de genes dependentes do Si foi primeiramente investigada em arroz, usando a abordagem de microarrays (WATANABE et al., 2004). Dessa forma, técnicas mais modernas podem ajudar a decifrar os importantes genes envolvidos nas respostas das plantas mediadas pelo Si aos diferentes tipos de estresse.

Vários estudos têm relatado os benefícios do Si na regulação e na expressão de genes da fotossíntese em plantas submetidas ao estresse por metais pesados. Em plantas submetidas ao estresse com zinco (Zn), a aplicação de Si aumentou os níveis de transcritos PsbY (Os08g02630), uma poliproteína vital envolvida no fotossistema II (PSII). Em oposição a isso, o estresse causado às plantas por meio do Zn diminuiu os níveis e retardou a expressão de PsbY (SONG et al., 2014). O PsbY é uma subunidade do complexo evolutivo de oxigênio do PSII com uma ligação de manganês polipeptídica que consiste em atividade da enzima metabolizadora de L-arginina (KAWAKAMI et al., 2007). Isso faz com que o aumento mediado por Si no nível de transcritos PsbY possa ativar a capacidade de ligação ao manganês, realizar a oxidação da água, que poderia melhorar a eficiência do PSII e a taxa de transferência de elétrons (SONG et al., 2014). De forma similar, a aplicação de Si aumentou a quantidade de PsaH, que codifica as subunidades de polipéptidos vitais no PS I (PFANNSCHMIDT; YANG, 2012). A adição de Si também aumentou a expressão de PetH. O produto de PetH é a redutase da ferredoxina NADP +, uma importante enzima envolvida na síntese de NADPH através da cadeia fotossintética de transporte de elétrons. Além disso, o teor de glutatona reduzida nas células é mantido por PetH (SONG et al., 2014). Além dos genes mencionados acima, a adição de Si também pode aumentar a expressão dos genes Os03g57120 e Os09g26810 envolvidos no processo de captação de luz (MANIVANNAN; AHN, 2017). Sendo assim, o estudo molecular do papel do Si na regulação positiva de genes associados ao PS I e PS II ilustra os efeitos positivos produzidos pelo Si durante a fotossíntese em uma situação de estresse por metais pesados (MANIVANNAN; AHN, 2017). Além disso, estudos também demonstram que a aplicação de Si em arroz ocasionou uma superexpressão de diferentes genes relacionados ao transporte de metais pesados e à desintoxicação causada pelos mesmos, de forma a amenizar o estresse causado às plantas (BRUNINGS et al., 2009).

Em plantas submetidas ao estresse salino, a inclusão de Si aumentou a absorção de água. Em trabalho realizado com *Sorghum bicolor*, a aplicação de Si proporcionou às plantas maior absorção de água através de um aumento da

atividade das aquaporinas mediante a maior expressão dos genes SbPIP1;6, SbPIP2;2 e SbPIP2;6, codificando a proteína intrínseca da membrana plasmática (PIP), uma aquaporina encontrada na raiz (LIU et al., 2015). Maior expressão de genes relacionados às aquaporinas resulta, portanto, numa rápida absorção de água, diluindo o excesso de íons Na^+ letais para as plantas (GAO et al., 2010). Pode-se dizer, então, que a superexpressão de genes relacionados às aquaporinas induzida pelo Si pode, possivelmente, amenizar o estresse salino em plantas, e também o estresse por déficit hídrico.

Outra defesa de que as plantas dispõem contra o estresse salino seriam níveis mais altos de poliaminas (POTTOSIN; SHABALA, 2014). Assim, maior expressão de genes responsáveis pela síntese de poliaminas tende a atenuar os efeitos negativos do estresse oxidativo (TANG et al., 2007). Em estudo realizado, o uso do Si ocasionou a superexpressão do gene S-adenosil-L-metionina descarboxilase (SAMDC), que codifica uma enzima vital para que haja biosíntese de poliaminas (MANIVANNAN; AHN, 2017). De forma particular, a indução de todas as reações mediadas pelo Si através da via fenipropanoide é responsável pela síntese e pela acumulação de moléculas químicas de defesa, como fenóis e flavonoides, contra diversos patógenos. Além da via fenipropanoide, o Si também pode induzir a resistência sistêmica adquirida (SAR), através da regulação de genes envolvidos nas respostas de hipersensibilidade e via de defesa mediada pelo ácido jasmônico (MANIVANNAN; AHN, 2017). Portanto, entende-se que o Si regula diversos genes responsáveis por funções fisiológicas vitais nas plantas, principalmente sob condições de estresse.

6 Perspectivas

Vimos que os atenuantes, como os reguladores de crescimento, nutrientes e substâncias químicas, quando aplicados no ambiente em que o vegetal se encontra, conferem um aumento na tolerância das plantas contra estresses abióticos. A aplicação dessas substâncias pode alterar a expressão de genes ligados à defesa e melhorar a resposta das plantas durante situações de estresse, como seca, salinidade e presença de metais pesados. Logo, o uso dos atenuantes tornou-se uma estratégia inteligente e de fácil acesso ao agricultor para evitar perdas na produtividade agrícola. Portanto, é de suma importância que estudos sejam desenvolvidos, objetivando conhecer o papel de cada atenuante no metabolismo vegetal, e estabelecer as doses adequadas para cada cultura sob condições adversas.

Referências

AHANGER, M. A.; AKRAM, N. A.; ASHRAF, M.; ALYEMENI, M. N.; WIJAYA, L.; AHMAD, P. Signal transduction and biotechnology in response to environmental stresses. **Biologia Plantarum**, v. 61, n. 3, p. 401-416, 2017.

ASHRAF, M.; AKRAM, N.A. Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: an analytical comparison. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 744-752, 2009.

BALOTE, S.; ISLAM, S.; KAVOOSI, G.; KHOLDEBARIN, B.; JUHASZ, A.; MA, W. How exogenous nitric oxide regulates nitrogen assimilation in wheat seedlings under different nitrogen sources and levels. **PloS ONE**, v. 13, n. 1, p. e0190.269, 2018.

BARTH, C.; TULLIO, M.; CONKLIN, P. L. The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 1.657-1.665, 2006.

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. **Plant, Cell & Environment**, v. 24, p. 267-278, 2001.

BIELACH, A.; HRTYAN, M.; TOGNETTI, V. B. Plants under Stress: Involvement of Auxin and Cytokinin. **International Journal Molecular Science**, v. 18, n. 1.427, p. 1-29, 2017.

BROWN, P.; SAA, S. Biostimulants in agriculture. **Frontiers Plant Science**, v. 6, p.671, 2015. 2015.

BRUNINGS, A. M.; DATNOFF, L. E.; MA, J. F.; MITANI, N.; NAGAMURA, Y.; RATHINASABAPATHI, B. et al. Differential gene expression of rice in response to silicon and rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Annays of Applied Biology**, v. 155, n.2, p. 161–170, 2009.

CHHABRA, M. L.; DHAWAN, A.; SANGWAN, N.; DHAWAN, K.; SINGH, D. Phytohormones induced amelioration of high temperature stress in *Brassica juncea* (L.) Czern & Coss. **Proceedings of 16th Australian Research Assembly on Brassicas**, p. 9-11, 2013.

CHHABRA, M. L.; DHAWAN, A.; SANGWAN, N.; DHAWAN, K.; SINGH, D. Phytohormones induced amelioration of high temperature stress in *Brassica juncea* (L.) Czern & Cross. **Procedure of the 16th Australian Brassica Research Assembly**. Ballarat, Austrália, setembro de 2009, p. 9-11.

COLEBROOK, E. H.; THOMAS, S. G.; PHILLIPS, A. L.; HEDDEN, P. The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, p. 67-75, 2014.

DEMIDCHIK, D. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 212-228, 2015.

DRAZKIEWICZ, M.; POLIT, E. S.; KRUPA, Z. Response of the ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, v. 164, n. 2, p. 195-202, 2003.

DU JARDIN, P. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 3-14, 2015.

FARHOUDI, R.; SAEEDIPOUR, S. Effect of Exogenous Absciscic Acid on Antioxidant Activity and Salt Tolerance in Rapeseed (*Brassica napus*) Cultivars. **Research on Crops**, v. 12, p. 122-130, 2011.

FU, J.; WU, Y.; MIAO, Y.; XU, Y.; ZHAO, E.; WANG, J.; SUN, H.; LIU, Q.; XUE, Y.; XU, Y.; HU, T. Improved cold tolerance in *Elymus nutans* by exogenous application of melatonin may involve ABA-dependent and ABA-independent pathways. **Scientific Reports**, v. 7, n. 39.865, p. 1-11, 2017.

GAO, Z.; HE, X.; ZHAO, B.; ZHOU, C.; LIANG, Y.; GE, R. et al. Overexpressing a putative aquaporin gene from wheat, TaNIP, enhances salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. **Plant Cell Physiology**, v. 51, n. 5, p. 767-775, 2010.

GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, n. 6, p. 481-494, 2005.

IMADI, S. R.; KAZI, A. G.; AHANGER, M. A.; GUCEL, S.; AHMAD, P. Plant transcriptomics and responses to environmental stress: an overview. **Journal of genetics**, v. 94, n. 3, p. 525-537, 2015.

JAROSLAW, T.; DUNAJSKA, K.; MAZUREK, P.; PIOTROWSKA, B.; TRETYN, A. Exogenous auxin regulates H₂O₂ metabolism in roots of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings affecting the expression and activity of CuZn-superoxide dismutase, catalase, and peroxidase. **Acta Physiology Plant**, v. 31, p. 249-260, 2009.

KAWAKAMI, K.; IWAI, M.; IKEUCHI, M.; KAMIYA, N.; SHEN, J. R. Location of PsbY in oxygen-evolving photosystem II revealed by mutagenesis and X-ray crystallography. **FEBS Letters**, v. 581, n. 25, p. 4.983–4.987, 2007.

LIU, P.; YIN, L.; WANG, S.; ZHANG, M.; DENG, X.; ZHANG, S. et al. Enhanced root hydraulic conductance by aquaporin regulation accounts for silicon alleviated salt-induced osmotic stress in *Sorghum bicolor* L. **Environmental and Experimental Botany**, v. 111, p. 42–51, 2015.

MANIVANNAN, A.; AHN, Y. Silicon regulates potential genes involved in major physiological processes in plants to combat stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p.1.346, 2017.

MASTROPASQUA, L.; BORRACCINO, G.; BIANCO, L.; PACIOLLA, C. Light qualities and dose influence ascorbate pool size in detached oat leaves. **Plant Science**. v. 183, p. 57-64, 2012.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 49, p. 249-279, 1998.

PFANNSCHMIDT, T.; YANG, C. The hidden function of photosynthesis: a sensing system for environmental conditions that regulates plant acclimation responses. **Protoplasma**, v. 249, p. 125–136, 2012.

POTTOSIN, I.; SHABALA, S. Polyamines control of cation transport across plant membranes: implications for ion homeostasis and abiotic stress signaling. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 154, 2014.

POVERO, G.; MEJIA, J. F.; DI TOMMASO, D.; PIAGGESI, A.; WARRIOR, P. A systematic approach to discover and characterize natural plant biostimulants. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 435, 2016.

REHMAN, R. U.; ZIA, M.; ABBASI, B. H.; LU, G.; CHAUDHARY, M. F. Ascorbic Acid and Salicylic Acid mitigate NaCl stress in *Caralluma tuberculata* Calli. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 173, p. 968-979, 2014.

SAMI, F.; FAIZAN, M.; FARAZ, A.; SIDDIQUI, H.; YUSUF, M.; HAYAT, S. Nitric oxide-mediated integrative alterations in plant metabolism to confer abiotic stress tolerance, NO crosstalk with phytohormones and NO-mediated post translational modifications in modulating diverse plant stress. **Nitric Oxide**. v. 73, p. 22-38, 2018.

SIVANESAN, I.; SON, M. S.; LIM, C. S.; JEONG, B. R. Effect of soaking of seeds in potassium silicate and uniconazole on germination and seedling growth of tomato cultivars, Seogeon and Seokwang. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 35, p. 6.743-6.749, 2013.

SONG, A.; LI, P.; FAN, F.; LI, Z.; LIANG, Y. The effect of silicon on photosynthesis and expression of its relevant genes in rice (*Oryza sativa* L.) under high-zinc stress. **PLoS ONE**, v. 9, p. e113.782, 2014.

SUN, H.; LI, J.; SONG, W.; TAO, J.; HUANG, S.; CHEN, S.; HOU, M.; XU, G.; ZHANG, Y. Nitric oxide generated by nitrate reductase increases nitrogen uptake capacity by inducing lateral root formation and inorganic nitrogen uptake under partial nitrate nutrition in rice. **Journal of Experimental Botany**. v. 66, p. 2.449-2.459, 2015.

SUZUKI, N.; MILLER, G.; SEJIMA, H.; HARPER, J.; MITTLER, R. Enhanced seed production under prolonged heat stress conditions in Arabidopsis thaliana plants deficient in cytosolic ascorbate peroxidase 2. **Journal of Experimental Botany**. v. 64, p. 253-263, 2013.

TANG, W.; NEWTON, R. J.; LI, C.; CHARLES, T. M. Enhanced stress tolerance in transgenic pine expressing the pepper CaPF1 gene is associated with the polyamine biosynthesis. **Plant Cell Report**, v. 26, p. 115-124, 2007.

VAN OOSTEN, M. J.; PEPE, O.; DE PASCALE, S.; SILLETTI, S.; MAGGIO, A. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 4, n. 5, p. 1-12, 2017.

VERMA, V.; RAVINDRAN, P.; KUMAR, P. P. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 86, p. 1-10, 2016.

WATANABE, S.; SHIMOI, E.; OHKAMA, N.; HAYASHI, H.; YONEYAMA, T.; YAZAKI, J. Identification of several rice genes regulated by Si nutrition. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 50, p. 1.273–1.276, 2004.

YANG, Z.; NAKABAYASHI, R.; OKAZAKI, Y.; MORI, T.; TAKAMATSU, S.; KITANAKA, S.; KIKUCHI, J.; SAITO, K. Toward better annotation in plant metabolomics: isolation and structure elucidation of 36 specialized metabolites from *Oryza sativa* (rice) by using MS/MS and NMR analyses. **Metabolomics**, v. 10, p. 543-555, 2014.

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.

ZHANG, J.; SCHURR, U.; DAVIES, W. Control of stomatal behaviour by abscisic acid which apparently originates in the roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 38, n. 7, p. 1.174–1.181, 1987.

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 247–273, 2002.

ZÖRB, C.; GEILFUS, C. M.; MÜHLING, K.; LUDWING-MÜLLER, J. The Influence of Salt Stress on ABA and Auxin Concentrations in Two Maize Cultivars Differing in Salt Resistance. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p. 220-224, 2013.

Capítulo 9



Diagnóstico Molecular de Bacterioses de Interesse em Avicultura e Saúde Pública

Marcela da Silva Rubio

Fernanda de Oliveira Barbosa

Lucas Bocchini Rodrigues Alves

Andrei Itajahy Secundo de Souza

Adriana Maria de Almeida

Ângelo Berchieri Júnior

1 Descrição do gênero *Salmonella* spp.

As bactérias do gênero *Salmonella* são pequenos bacilos gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, patógenos intracelulares e comumente móveis com flagelos, com exceção dos biovars *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum (SG) e *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Pullorum (SP) (GRIMONT; WEILL, 2007). São conhecidos 2.659 sorovares, dos quais 2.637 pertencem à espécie *S. enterica* e 22 à *S. bongori* (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). Desse total, cerca de 100 sorovares podem infectar tanto seres humanos como animais (CDC, 2016). Em aves, existem três

enfermidades causadas por *Salmonella* spp.: a pulrose, cujo agente é SP; o tifo aviário, causado por SG; e o paratifo aviário, causado por qualquer outro sorovar (POPPE, 2000).

As espécies e subespécies de *Salmonella* spp. evoluíram a partir de um mesmo ancestral. A razão disso é a habilidade genética que possuem, caracterizada pela aquisição e pelas perdas de genes, o que ocasionou a formação de linhagens separadas, fato pelo qual se atribui a principal razão da diferenciação. Devido à associação entre o histórico evolutivo e a proximidade filogenética do gênero, há a representação da alta similaridade entre os sorovares do gênero, relatado em estudos de genética comparativa (MCQUISTON et al., 2008).

2 Importância em saúde pública

A produção avícola é um dos mais importantes setores agropecuários do mundo, com grande relevância em mercados consumidores e exportadores, como Estados Unidos da América, União Europeia e Brasil. Alia baixo custo de produção a técnicas de nutrição, melhoramento genético, manejo e controle sanitário, e possibilita a obtenção de proteína de origem animal de alta qualidade e acessível a todas as classes econômicas do mercado consumidor (SAMANTA et al., 2011).

A incidência de doenças transmitidas por alimentos (DTA), causadas por *Salmonella* spp., é frequentemente alta em levantamentos epidemiológicos (MA et al. 2014). Ao menos 1,3 bilhão de casos de salmonelose humana são reportados anualmente no mundo, e cerca de 3 milhões de pacientes morrem da doença. Os surtos de DTAs relacionados às salmoneloses provocam danos significativos à saúde de animais e a seres humanos infectados, além do grande prejuízo econômico (LIN et al., 2011).

3 Monitoramento das salmoneloses aviárias

O monitoramento e o controle de *Salmonella* spp. no território brasileiro foram iniciados juntamente com a criação do Serviço de Defesa Sanitária Animal, a partir do Decreto n. 24.548, de 3 de julho de 1934, em que aves importadas eram submetidas ao diagnóstico como medida de proteção aos lotes nacionais (BRASIL, 1934). Ao longo dos anos, diversas Portarias e Instruções Normativas foram publicadas, porém somente após a criação do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), em 1994, pelo atual Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que medidas mais rígidas

foram adotadas, sendo utilizadas metodologias sorológicas e microbiológicas de diagnóstico (BRASIL, 1994). O uso de métodos moleculares vem sendo recentemente aceito para a detecção de *S. Typhimurium* (STM), *S. Enteritidis* (SE), SG e SP em aves reprodutoras, a partir da Instrução Normativa n. 41, de 04 de dezembro de 2017 (BRASIL, 2017b), e para *Salmonella* spp. em aves de corte e de postura comercial pela Instrução Normativa n. 8, de 17 de fevereiro de 2017 (BRASIL, 2017a), e nos estabelecimentos avícolas comerciais de perus e frangos de corte, e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF), com a Instrução Normativa n. 20, de 21 de outubro de 2016 (BRASIL, 2016).

4 Diagnóstico molecular de *Salmonella* spp.

A metodologia padrão-ouro para o diagnóstico de *Salmonella* spp. é o isolamento pelo método microbiológico, caracterização bioquímica e sorotipagem da bactéria (MA et al., 2014). Contudo, algumas estirpes podem apresentar perfil atípico na série bioquímica, como é o caso de SP e SG nas provas de ornitina e dulcitol, dificultando a diferenciação de ambos os biovars (BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009). Além disso, possui custo elevado, devido à quantidade de meios de cultura e antissoros necessários. O tempo necessário para a obtenção dos resultados é dependente dos períodos de incubação e de crescimento da bactéria, o que pode levar de 7 a 10 dias para ser concluído (CHEN et al., 2010). Dessa forma, diversos estudos baseados em métodos moleculares foram desenvolvidos para, não somente diferenciar os biovars previamente citados (PAIVA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2009; BATISTA et al., 2016; RUBIO et al., 2017), como também para o gênero *Salmonella* spp. e outros sorovares (OLIVEIRA et al., 2003; LI et al., 2005; BUGAREL et al., 2012).

Quando o teste microbiológico é seguido do molecular, a chance de falso-positivos no diagnóstico é reduzida, uma vez que o primeiro evita a amplificação de material genético proveniente de células mortas pela PCR e o segundo aumenta a especificidade e a sensibilidade do diagnóstico. Nesse contexto, os métodos moleculares funcionariam como valiosas ferramentas de triagem (LI et al., 2005). No estudo conduzido por Oliveira et al. (2003) utilizando amostras de aves, foi demonstrado que somente com o uso da PCR poucas amostras foram positivas (6/87) para *Salmonella* spp. Ao utilizar o método microbiológico tradicional, 15 das 87 amostras foram positivas para o microrganismo. Por outro lado, ao utilizar o enriquecimento seletivo, seguido de PCR, houve aumento no número de amostras positivas para *Salmonella*

spp. (33/87), demonstrando que o uso de ambas aumenta a sensibilidade na detecção do patógeno.

Recentemente, Batista et al. (2016) desenvolveram uma duplex-PCR para evitar o diagnóstico errôneo de estirpes atípicas de SG e SP. Assim, conseguiu-se diferenciar ambos os biovars Gallinarum e Pullorum, amplificando o gene polimórfico *ratA*, que possui 1.047 pares de base (pb) e 243 pb em cada, respectivamente. Ademais, de modo a aumentar a especificidade da reação, foi possível amplificar um fragmento de 543 pb referente a uma região que diferencia o sorovar Gallinarum dos outros sorovares, denominada região identificadora do sorovar (*serovar identifier region* – SIR). Diante do que foi abordado, percebe-se que a PCR é uma ferramenta que aumenta a especificidade e a sensibilidade de técnicas microbiológicas, auxiliando no diagnóstico clínico e na tomada de ações em lotes avícolas positivos para *Salmonella* spp.

Para uma abordagem qualitativa e quantitativa de patógenos, a PCR, em tempo real, tem sido o foco principal do mercado com âmbito em diagnóstico. As vantagens da técnica incluem: reação executada de maneira rápida, a opção de detecção de mais de um patógeno ao mesmo tempo, a detecção imediata do produto dentro de placas fechadas, eliminando a necessidade de eletroforese em gel após a PCR e evitando a contaminação do ambiente com produtos tóxicos e teratogênicos, como o brometo de etídeo, além da possibilidade de quantificar o patógeno atuante em determinada amostra (LEE et al., 2014).

Ma et al. (2014) demonstraram a alta sensibilidade, especificidade, e precisão em estudo desenvolvido com carcaças suínas contaminadas artificialmente por *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *S. aureus*, com obtenção de 99,2%, 100%, e 99,5% de amostras positivas, respectivamente. Esses autores evidenciaram, também, o limite de detecção de 2,0 UFC/g de carcaça contaminada para o teste proposto.

Os laboratórios de diagnóstico de rotina possuem ampla necessidade de técnicas que identifiquem patógenos designados a estudos de vigilância epidemiológica e que podem ser utilizadas como ferramentas rápidas de triagem em surtos de infecções alimentares. Com isso, os estudos voltados à padronização das reações múltiplas (multiplex qPCR) têm demonstrado grande potencial para suprir essa necessidade (O'REGAN et al., 2008). O recente foco está na utilização de reações padronizadas e validadas, que podem, simultaneamente, amplificar mais do que duas sequências de genes em uma única reação e tem sido usado para identificar e diferenciar grande variedade de agentes patogênicos (MA et al., 2014).

De maneira geral, a aplicabilidade da reação por diferentes laborató-

rios, em todo o mundo, depende dos custos que envolvem a execução da reação. Ao considerar que a reação multiplex já reduz os custos com a redução das reações, é necessário considerar o custo com a utilização do fluoróforo na reação. Assim, considera-se que os intercalantes de DNA, são mais atrativos perante os custos com as reações, que quando se utilizam as sondas de hidrólise. Apesar de as reações multiplex que utilizam intercalantes de DNA não proporcionarem índices de especificidade tão elevados quanto os obtidos com a utilização de sondas, a confiabilidade pode ser verificada semiquantitativamente por meio da análise da curva de dissociação dos iniciadores (T_m). Esse tipo de metodologia tem-se demonstrado sensível, específico e barato para a detecção simultânea de múltiplos agentes patogênicos (CHENG et al., 2013).

Li et al. (2014) relataram dificuldade ao se obter uma reação multiplex para o gênero *Salmonella* spp., ao padronizarem uma reação hexaplex para diferenciação de cinco sorovares provenientes do gênero, demonstrando a necessidade de estudos comparativos com outros sorovares mais raros, para que a reação seja realmente validada e a fim de garantir a inexistência de reações cruzadas. Estudos realizados por O'Regan et al. (2008), com amostras de frango artificialmente contaminadas com quatro sorovares de *Salmonella* spp., demonstraram eficiência de 100% das amostras testadas, tanto pelo método microbiológico tradicional, quanto para a multiplex qPCR com utilização de sondas. Rubio et al. (2017) também padronizaram uma reação multiplex qPCR para diagnóstico diferencial de SG e SP. No entanto a técnica utilizada foi a diferenciação pela T_m , pois utilizou-se o fluoróforo SYBr Green I, o que reduz os custos com a reação. Além disso, a fim de avaliar a sensibilidade da reação, foi padronizada uma curva-padrão, o que possibilitou quantificar amostras referentes a 10^8 até 10^1 , evidenciando a acurácia proporcionada pela técnica proposta, mesmo quando em uma reação multiplex.

5 Metodologias moleculares para análise genômica comparativa de *Salmonella* spp.

A epidemiologia tem sido outro campo da Medicina Veterinária e saúde pública em que métodos moleculares vêm sendo aplicados. Os métodos microbiológicos convencionais, embora necessários, não são por si sós capazes de elucidar a relação de similaridade entre os sorovares isolados. Por isso, métodos moleculares capazes de expor o perfil genético bacteriano, ou seja, genotipagem, são ferramentas úteis que auxiliam no rastreamento do patógeno, bem como na investigação da distribuição e da disseminação (BERCHIE-RI JÚNIOR; PENHA FILHO, 2016).

Métodos moleculares capazes de discriminar diferentes estirpes de *Salmonella* spp. estão disponíveis para auxiliar em investigações epidemiológicas. Técnicas como PFGE, “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus” (ERIC-PCR) e “Random amplified polymorphic DNA” (RAPD) são ferramentas que auxiliam na investigação de perfis genéticos decorrentes de diversos surtos. A partir disso, é possível obter respostas mais conclusivas a respeito da epidemiologia do patógeno (SEO et al., 2006; FARDSANEI et al., 2015).

O método de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE) é considerado o padrão-ouro para a comparação dos perfis genéticos de *Salmonella* spp. durante as investigações epidemiológicas. Essa técnica permite avaliar alterações ocorridas no genoma que possam ter sido ocasionadas por mutações, inserções e deleções de fragmentos de DNA (VAN-IMMERSEEL et al., 2013).

Em estudo conduzido por Seo et al. (2006), na Coreia, foram utilizadas as técnicas de PFGE e RAPD para avaliar a relação genética entre as 38 estirpes de SG isoladas de 29 regiões diferentes, no período de 1992 a 2001. Como resultado, verificou-se que o PFGE teve maior poder discriminatório que o RAPD, uma vez que os padrões do primeiro eram mais numerosos que os do segundo. Neste caso, o RAPD demonstrou ser menos confiável que o PFGE.

Leal (2010) relatou que, desde 1991, as sequências integrantes das unidades repetitivas intergênicas, ou seja, os elementos ERIC, têm sido amplamente estudadas em uma grande diversidade de organismos. A detecção dessas sequências, altamente conservadas obtidas pela técnica de ERIC-PCR, tem sido uma ótima ferramenta para caracterização de enterobactérias. Embora seja uma metodologia epidemiológica de baixo custo, a acurácia e a reprodutibilidade da técnica ainda são um limitante para que essa ferramenta seja utilizada em laboratórios.

Celis-Estupiñan et al. (2017) avaliaram os perfis genéticos de SG isolados no Brasil, por meio da utilização do PFGE. Os resultados demonstraram a presença de estirpes clonais, ou seja, que são 100% similares entre si, indicando que estas se encontram circulantes no País. Tais dados corroboram aqueles publicados por Souza et al. (2015), que também avaliaram os perfis genéticos dos mesmos isolados de SG, porém com a utilização do ERIC-PCR. Ambas as metodologias podem ser empregadas para estudos epidemiológicos; entretanto, o fato de o PFGE ser padronizado e ser a metodologia classificada como padrão-ouro, seu uso torna-se mais comum quando comparado ao ERIC-PCR, além de possuir melhor distinção de bandas via luz ultravioleta (UV).

6 Considerações finais

Os testes moleculares utilizados para diagnóstico e para avaliação genética de *Salmonella* spp. não devem delimitar o uso de uma ou de outra técnica, sejam elas microbiológicas, sorológicas ou moleculares e sim, fornecer confiabilidade e aplicabilidade, com adequação às necessidades observadas nos laboratórios e na produção animal.

Referências

BATISTA, D. F. A.; FREITAS NETO, O. C.; ALMEIDA, A. M.; BARROW, P. A.; BARBOSA, F. O.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Molecular identification of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum by a duplex PCR assay. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 28, n. 4, p. 419-422, 2016.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A. et al. (Eds.). **Doenças das Aves**. 2. ed. FACTA: Campinas, p. 435-453, 2009.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; PENHA FILHO, R. C. Encarte Especial: Os conhecimentos atuais sobre o Paratifo Aviário no Brasil. **AviSite**. n. 04, p. 7-9, 2016.

BRASIL. **Decreto n. 24.548, de 3 de julho de 1934**. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/programa_nacional_sanidade_avicola_000fyh51e9y02wx5ok0pvo4k3xecpyt9.pdf>.

BRASIL. Instrução Normativa n. 20, de 21 de outubro de 2016. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília-DF, 25 out. 2016, seção 1, p. 13-16.

BRASIL. Instrução Normativa n. 8, de 17 de fevereiro de 2017. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília-DF, 03 mar. 2017, seção 1, p. 32-33, 2017a.

BRASIL. Instrução Normativa n. 41, de 4 de dezembro de 2017. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília-DF, 26 dez. 2017, seção 1, p. 2-4, 2017b.

BUGAREL, M.; VIGNAUD, M.; MOURY, F.; FACH, P.; BRISABOIS, A. Molecular identification in monophasic and nonmotile variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, **Microbiology Open**, v. 1, n. 4, p. 481-488.

CELIS-ESTUPIÑAN, A. L. P.; BATISTA, D. F. A.; CARDOZO, M. V.; SOUZA, A. I. S.; ALVES, L. B. R.; ALMEIDA, A. M.; BARROW, P. A.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Further investigations on the epidemiology of fowl typhoid in Brazil. **Avian Pathology**, v. 46, p. 1-10, 2017.

CDC. **Centers For Disease Control and Prevention**. National Salmonella Surveillance Annual Report, 2013. Atlanta, 2016. 89p.

CHEN, J.; ZHANG, L.; PAOLI, G.C.; SHI, C.; TU, S.; SHI, X. A real-time PCR method for the detection of *Salmonella enterica* from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 168-174, 2010.

CHENG, J.; JIANG, Y.; RAO, P.; WU, H.; DONG, Q.; WU, Z.; DING, X.; GUO J. Development of a single-tube multiplex real-time PCR for detection and identification of five pathogenic targets by using melting-curve analysis with EvaGreen. **Archives of Virology**, v. 158, p. 379-386, 2013.

FARDSANEI, F.; NIKKHAHI, F.; BAKHSHI, B.; SALEHI, T. Z.; TAMAI, I. A.; DALLAL, M. S. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates from food and human samples by serotyping, antimicrobial resistance, plasmid profiling (GTG) 5-PCR and ERIC-PCR. **New microbes and new infections**, v. 14, p. 24-30, 2016.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. **WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella**, Institut Pasteur, Paris, France, 2007.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; DE PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P. I.; WEILL F. X. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 165, n. 7, p. 526-530, 2014.

LEAL, B. Uso da ERIC-PCR para caracterização de amostras de *Leishmania chagasi*. 2010. 77p. **Tese** (Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento) Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande-MS, 2010.

LEE, Y.; KIM, D.; LEE, K.; CHUN, J.; Single-channel multiplexing without melting curve analysis in real-time PCR. **Nature**, v. 4, p. 1-6, 2014.

LI, Y.; ZUANGH, S.; MUSTAPHA, A. Application of a multiplex PCR for the simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* in raw and ready-to-eat meat products. **Meat Science**, v. 71, n. 2, p. 402-406.

LI, R.; WANG, Y.; SHEN, J.; WU, C. Development of a novel hexa-plex PCR method for identification and serotyping of *Salmonella* species. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 1, p. 75-78, 2014.

LIN, L. H.; TSA, C. Y.; HUNG, M. H.; FANG, Y. T.; LING, Q. D. Rectal swab sampling followed by an enrichment culture-based real-time PCR assay to detect *Salmonella enterocolitis* in children. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1.421-1.425, 2011.

MA, K.; DENG, Y.; BAI, Y.; XU, D.; CHEN, E.; WU, H.; LI, B.; GAO, L. Rapid and simultaneous detection of *Salmonella*, *Shigella*, and *Staphylococcus aureus* in fresh pork using a multiplex real-time PCR assay based on immunomagnetic separation. **Food Control**, v. 42, p. 87-93, 2014.

MCQUISTON, J. R.; HERRERA-LEON, S.; WERTHEIM, B. C.; DOYLE, J.; FIELDS, P. I.; TAUXE, R. V.; LOGSDON JR., J. M. Molecular phylogeny of the *Salmonellae*: Relationship among *Salmonella* species and subspecies determined from four housekeeping genes and evidence of lateral gene transfer events. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 190, n. 21, p. 7.060-7.067, 2008.

OLIVEIRA, S. D.; RODENBUSCH, C. R.; CÉ, M. C.; ROCHA, S. L. S.; CANAL, C. W. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 217-221, 2003.

O'REGAN, E.; MCCABE, E.; BURGESS, C.; MCGUINNESS, S.; BARRY, T.; DUFFY, G.; WHYTE, P.; FANNING, S. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. **BMC Microbiology**, v. 8, p. 1-11, 2008.

PAIVA, J. B.; CAVALLINI, J. S.; SILVA, M. D.; ALMEIDA, M. A.; ÂNGELA, H. L.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Molecular differentiation of *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Pullorum by RFLP of *fliC* gene from Brazilian isolates. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 11, n. 4, p. 271-276, 2009.

POPPE, C. *Salmonella* Infections in the Domestic Fowl. In: WRAY, C.; WRAY, A. ***Salmonella in domestic animals***. 1. ed. CABI Publishing: New York, cap. 7, p. 107- 132, 2000.

RIBEIRO, S. A. M.; PAIVA, J. B.; ZOTESSO, F.; LEMOS, M. V. F.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Molecular differentiation between *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Pullorum and *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Gallinarum. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 184-188, 2009.

RÚBIO, M. D. S.; PENHA FILHO, R. A. C.; ALMEIDA, A. M.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Development of a multiplex qPCR in real time for quantification and differential diagnosis of *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Pullorum. **Avian Pathology**, v. 46, n. 6, p. 644-651.

SAMANTA, B.; GHOSH, P. R.; BISWAS, A.; DAS, S. K. The effects of copper supplementation on the performance and hematological parameters of broiler chickens. **Journal of Animal Science**, Asian-Aust., v. 24, n. 7, p. 1.001-1.006, 2011.

SEO, Y. S.; LEE, S. H.; SHIN, E. K.; KIM, S. J.; JUNG, R.; HAHN, T. W. Pulsed-field gel electrophoresis of *Salmonella gallinarum* and comparison with random amplified polymorphic DNA. **Veterinary Microbiology**, v. 115, n. 4, p. 349-357, 2006.

SOUZA, A. I. S.; FREITAS NETO, O. C.; BATISTA, D. F. A.; ESTUPINAN, A. L. P. C.; ALMEIDA, A. M.; BARROW, P. A.; BERCHIERI JÚNIOR, A. ERIC-PCR genotyping of field isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum. **Avian Pathology**, v. 44, p. 1-20, 2015.

VAN IMMERSEEL, F.; STUDHOLME, D. J.; EECKHAUT, V.; HEYNDRIKX, M.; DEWULF, J.; DEWAELE, I.; VAN HOOREBEKE, S.; HAESEBROUCK, F.; VAN MEIRHAEGHE, H.; DUCATELLE, R.; PASZKIEWICZ, K.; TITBALL, R. W. *Salmonella* Gallinarum field isolates from laying hens are related to the vaccine strain SG9R. **Vaccine**, Amsterdam, v. 31, n. 43, p. 4.940-4.945, 2013.

Capítulo 10



Enzimas recombinantes utilizadas na indústria: foco para a produção de etanol de 2ª geração

Elisângela Soares Gomes Pepe

Pâmela A. Maldaner Pereira

Natália Sarmanho Monteiro Lima

Bárbara Bonfá Buzzo

Bruna Fernanda Silva de Sousa

Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

1 Introdução

Enzimas fazem parte de um grupo particular de biomoléculas biocatalisadoras que trabalham para facilitar as reações complexas que englobam a vida de todos os organismos, inclusive nós mesmos. São produzidas por diversos organismos, porém a maioria das enzimas utilizadas em escala industrial provém de microrganismos, os quais são de fácil disponibilidade e capazes de produzir diversas enzimas em inúmeros tipos de substratos, em período de tempo relativamente curto, quando comparada com enzimas de outras fontes. Como vantagens, as enzimas microbianas são de rápida produção, maior desempenho, maior especificidade, de fácil manipulação e otimização. A indústria biotecnológica busca a produção em larga escala destas substâncias de origem biológica, sendo uma delas o uso crescente de enzimas recombinantes. Dada sua importância biotecnológica, a prospecção e a caracterização de

enzimas isoladas de várias fontes é feita através de estratégias fundamentadas em sequência “sequence-driven” ou através de estudos funcionais, pautados em estudos de hidrólise de substrato “functional-driven”, visando à triagem de biomoléculas de alto rendimento para processos industriais. Em algumas abordagens, o material genético (DNA) de todos os microrganismos de um determinado ambiente é extraído em um “pool” de moléculas obtidas diretamente da amostra de uma forma independente de cultivo, o que é nomeado como abordagem metagenômica. A partir deste conjunto de DNAs, também chamado de Metagenoma, os pesquisadores obtêm novos genes para enzimas previamente desconhecidas. O homem utiliza o poder enzimático microbiano há milênios, desde a fabricação de pães, bebidas e produtos lácteos. Hoje em dia, os processos industriais são cada vez mais dependentes do uso de enzimas, apresentando diversas oportunidades para alavancar as pesquisas em enzimologia.

O mercado de enzimas é um ponto estratégico no desenvolvimento global, sendo extremamente importante para o avanço de novas tecnologias nos setores de bioenergia, têxtil, de biorremediação e alimentício, e tem provado ser uma excelente alternativa para substituir muitos métodos altamente poluidores do meio ambiente, como a utilização de derivados de petróleo e o branqueamento químico de polpa de celulose. Entretanto, a despeito de sua importância, as enzimas também são os principais insumos de alto custo que encarecem estes processos, retardando a acessibilidade de produtos que poderiam elevar a qualidade de vida humana e ambiental, e carecem de iniciativas que viabilizem sua ampla utilização.

No Brasil, um componente importante deste custo vem da necessidade de importação de enzimas a partir de grandes multinacionais, o que poderia ser reduzido com maior investimento na pesquisa interna, uma vez que o País é detentor de vasta biodiversidade microbiana, rica em bioativos e enzimas.

Um dos setores que mais poderiam beneficiar-se com a diminuição do custo enzimático seria o de biocombustíveis, sobretudo no Brasil, que é o segundo maior produtor de etanol mundial, podendo expandir sua produção em 40%, sem necessidade de ampliação da área de cultivo através do etanol de segunda geração (2G). O processo de produção do etanol 2G visa a utilizar a combinação de diferentes enzimas para obter os açúcares fermentescíveis a partir de biomassa lignocelulósica. Entretanto, de forma similar ao que ocorre em outros setores industriais brasileiros, o avanço desta tecnologia esbarra no alto custo de importação de enzimas, e demanda fortemente que pesquisas sejam empreendidas para viabilizar formulações enzimáticas nacionais que possam atender às necessidades do setor.

2 Obtenção de enzimas recombinantes e necessidade de coquetéis enzimáticos

Buscando diminuir o custo efetivo enzimático na indústria, muitas pesquisas estão sendo empreendidas mundialmente para a prospecção de novas enzimas mais eficientes e melhorias no processo de sua produção. No entanto, na maioria dos projetos, o foco de trabalho está sobre uma única enzima e suas particularidades cinéticas, o que é insuficiente, uma vez que várias enzimas serão necessárias na formulação final para que toda a matéria-prima seja processada, requerendo um equilíbrio balanceado de condições catalíticas para atingir um efeito sinérgico e eficaz.

O uso de estratégias de clonagem e obtenção de enzimas por vias recombinantes torna-se um importante passo para melhor compreensão do efeito sinérgico destes coquetéis, uma vez que estas enzimas podem ser expressas e purificadas por vias relativamente simples, com alto rendimento e podem ser combinadas em diferentes proporções para a avaliação conjunta da capacidade hidrolítica, ao mesmo tempo em que é obtido material suficiente para a caracterização cinética individual para determinados parâmetros de interesse, como pH, temperatura e tolerância a inibidores. Dentre as estratégias de clonagem, as principais usadas são as em hospedeiros procariotos, como é o caso de *Escherichia coli* BL21 e as que utilizam algumas leveduras, como o *Pichia pastoris*. Os vetores utilizados são dos mais diversos tipos, sendo um exemplo comum o uso de sistemas como o pET28a que permitem a fácil recuperação de enzimas através da adição de uma cauda de seis histidinas (his-tag) com alta afinidade a resinas carregadas com íons de níquel, permitindo a recuperação de proteínas concentradas em elevado grau de pureza em etapas simples de cromatografia por afinidade.

3 Perspectivas do uso de enzimas em processos industriais: exemplo da produção do etanol de segunda geração

A microbiota representa um imenso reservatório de enzimas e metabólitos bioativos para utilização industrial, com grande potencial de expansão nos mais diversos setores. Enzimas microbianas apresentam vantagens, pois possuem atividade nas mais diversas condições, principalmente nas que envolvem mudanças de temperatura e pH; ainda, deve-se ter em vista que a alta diversidade de microrganismos no meio ambiente aumenta a possibilidade de maior diversidade de enzimas existentes para as mais diversas aplicações (NIGAM, 2013).

Neste contexto, o mercado mundial de enzimas está em constante expansão, representando o segundo maior gerador de divisas mundiais no tocante a insumos para a fermentação (BCC RESEARCH, 2013; LING et al., 2015). Metade do mercado mundial de enzimas é destinada para aplicações técnicas, como bioenergia e setor têxtil, enquanto 37% estão envolvidas com a produção de alimentos.

Considerando a demanda industrial para enzimas, um dos setores mais promissores é o de produção de biocombustíveis de segunda geração, a partir de biomassa lignocelulósica, o que propicia o aumento da produção sem necessidade de expansão da fronteira agrícola (CASTRO; CASTRO, 2012). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol e o terceiro maior produtor de biodiesel (DE SOUZA et al., 2015), detentor de uma vasta experiência na escala de produção, o que faz com que assuma papel de referência para o desenvolvimento do setor (MORAES, 2011). A produção anual de etanol no País já atinge a capacidade de 30 bilhões de litros e possui dentre os principais subprodutos o bagaço, que gira em torno de 162 milhões de toneladas (BRAZILIAN ENERGY RESEARCH COMPANY (EPE), 2016). Essa biomassa lignocelulósica (atualmente utilizada principalmente na geração de energia térmica para a própria usina) possui um grande potencial no aumento da produção de combustíveis, de forma que seu uso pode incrementar a produção de etanol brasileiro em 40% (BIOFUELS JOURNAL, 2010). Entretanto, como já salientado, um dos grandes entraves para esta metodologia é justamente o alto custo das enzimas utilizadas no processo de liberação de açúcares fermentescíveis a partir da celulose.

Algumas enzimas utilizadas no processo de degradação da biomassa lignocelulósica estão apresentadas abaixo, bem como outros exemplos de suas aplicações industriais.

4 Celulases

A celulose constitui-se na fonte renovável de energia mais abundante produzida na biosfera, com uma produção anual de 100 bilhões de toneladas de matéria seca. A degradação da celulose por celulases e celossomas representa o maior fluxo dos reservatórios de carbono fixado até carbono atmosférico, o que lhe confere extrema importância nos processos agrícolas e de tratamento de resíduos, bem como no potencial de utilização para produção de fontes alternativas aos combustíveis fósseis (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006).

Considerando a importância das enzimas envolvidas na produção de biocombustíveis, as maiores projeções de crescimento no mercado mundial

são para a classe das celulases (termo geral que engloba as enzimas endo e exocelulases e β -glicosidases): as perspectivas eram de duplicação de divisas até o final de 2017 (Fig. 1), alcançando um rendimento de 400 milhões de dólares no mercado enzimático mundial (BCC RESEARCH, 2013). O principal uso das celulases está relacionado com a expansão de novas tecnologias para a produção de combustíveis de segunda geração, a partir de resíduos industriais (MORAES, 2011; NIGAM; SINGH, 2011).

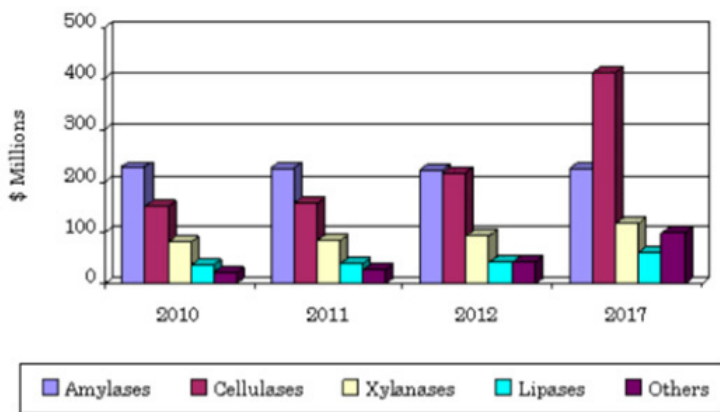


Figura 1. Projeções para o Mercado Global de enzimas. Fonte BCC Research (2013).

O Brasil tem um potencial imenso em produzir várias enzimas que são utilizadas nos setores de biocombustíveis, sobretudo considerando o uso de matéria-prima barata advinda dos próprios resíduos industriais. Estimativas apontam que a capacidade nacional de produção de preparações concentradas de amilases, celulases e xilanases seriam, respectivamente, de 3.1×10^7 , 3.2×10^7 , 3.1×10^8 , e 2.9×10^9 toneladas (CASTRO; CASTRO, 2012).

Diante do exposto, o maior desafio para a produção de etanol 2G reside na dificuldade em gerar uma formulação comercial efetiva e econômica para aplicação industrial. Isso porque a eficiência desta dependerá não apenas da determinação das condições ideais para a cinética enzimática individual, mas também em um ajuste de condições que favorecerão todas as enzimas que serão utilizadas em uma mesma etapa do processo. Essa adaptação de condições é possível em função da plasticidade de determinadas enzimas em trabalhar em amplas faixas de pH, temperatura, concentração de substrato e salinidade, sendo que esta versatilidade é uma condição desejada na prospecção de novas enzimas (LORENZ; ECK, 2005).

5 Lacases

Há uma grande gama de enzimas sendo utilizadas para fins industriais e dentre elas vale destacar as lacases, que apresentam alto potencial nas indústrias farmacêutica, têxtil, papel e celulose (DWIVEDI et al., 2011). Estas enzimas pertencem ao grupo das multicopper oxidases, o qual possui diversas funções, como o metabolismo de cobre e ferro, oxidação de substratos fenólicos e não fenólicos, que geram como subprodutos radicais arilos que serão convertidos em quinonas (BALDRIAN, 2006).

As lacases são enzimas muito estáveis, apresentam de 15% a 30% de carboidratos, massa molecular entre 60 e 90 kDa (GIANFREDI; RAO, 2004; BALDRIAN, 2006), são classificadas como glicoproteínas diméricas ou tetraméricas e possuem 4 átomos de cobre por monômero, o que é essencial para o desempenho catalítico da enzima (BENTO; CARRONDO; LINDLEY, 2006).

Estas proteínas são encontradas em plantas vasculares, fungos e em bactérias, sendo que nos dois primeiros se localizam extracelularmente e, na segunda intracelularmente (DIAMANTIDIS et al., 2000), e no caso da aplicação industrial, as lacases bacterianas são mais visadas, pois, quando comparadas com lacases fúngicas, as bacterianas são mais estáveis em altas temperaturas, possuem um pH elevado em altas concentrações de cobre e cloreto, e são mais compatíveis com quase todos os processos industriais (HELD et al., 2005; MCMAHON et al., 2007).

Tanto no sistema biológico como na indústria, as lacases bacterianas possuem papel importante. No biológico, elas participam da morfogênese, da pigmentação, da oxidação de compostos tóxicos e da proteção do microrganismo contra radiação ultravioleta. Já na indústria, são bastante utilizadas para desintoxicação de efluentes de destilaria pós-metanizada e de resíduos de polpa de papel contendo, por exemplo, clorolignina (YADAV; CHANDRA, 2012) e também podem ser aplicadas como biosensores para detecção de fenóis em águas residuais, aplicações na industrial alimentícia, produção de etanol, branqueamento de papel, deslignificação e biorremediação.

6 Hemicelulases

Xilanases (E.C. 3.2.1.8) estão envolvidas na hidrólise randômica de ligações glicosídicas β -1,4 entre resíduos de xilose na cadeia principal da xilana. Estas enzimas são agrupadas nas famílias 5; 8; 10; 11; 30; 43; 51 e 98 de Glicosil Hidrolases (GH) (CAZy, <http://www.cazy.org/>). As xilanases mais estudadas pertencem às famílias GH10 e GH11, com mais de 300 sequências

gênicas conhecidas (SHALLOM; SHOHAM, 2003). Os membros da família GH10 possuem alto peso molecular (>30kDa), ponto isoelétrico (pI) ácido, enquanto os membros da família GH11 possuem baixo peso molecular (<30 kDa) e pI básico (POLIZELI et al., 2005; KOCABAS; GÜDER; ÖZBEN, 2015).

As β -xilosidases (E.C. 3.2.1.37), ou somente xilosidases, estão envolvidas na hidrólise de ligações β - 1,4 de xilo-oligossacarídeos e xilobiose, liberando unidades de xilose e estão distribuídas em diversas famílias de GHs (KNOB; TERRASAN; CARMONA, 2010; JUTURU; WU, 2012) among them endo-xylanases (EC 3.2.1.8. Os membros pertencentes à família 43 catalisam a hidrólise por meio da inversão do carbono anomérico, enquanto as demais utilizam o mecanismo de retenção.

Algumas xilosidases da família GH43 apresentam atividade bifuncional de arabinofuranosidase e β -xilosidase, principalmente em substratos de arilglicosídeo (FALCK et al., 2016). Isso pode ser explicado pelas semelhanças espaciais das ligações glicosídicas e grupos hidroxilas entre os resíduos de D-xilopirano e L-arabinofuranose (SHALLOM; SHOHAM, 2003; HUY et al., 2013).

A ação sinérgica das β -xilosidases (E.C.3.2.1.37) e endoxilanases (E.C. 3.2.1.8) aumenta a eficiência da hidrólise da xilana e, conseqüentemente, eleva a produção de açúcares fermentescíveis. Isto é possível graças à ação catalítica das β -xilosidases que remove os xilo-oligossacarídeos que inibem as endoxilanases e limitam a hidrólise da xilana (POLIZELI et al., 2005; KNOB; TERRASAN; CARMONA, 2010; CANILHA et al., 2012; JUTURU; WU, 2012). Em vista disso, as xilosidases são consideradas essenciais para o complexo xilanólítico e têm-se tornado alvo de pesquisas acadêmicas e industriais, principalmente para o desenvolvimento de bioprocessos e produtos.

As Feruloil esterases (EC 3.1.1.73) são enzimas lipolíticas que pertencem a uma subclasse de esterases carboxílicas, também conhecidas como ácido ferúlico esterases, FAE e cianamoil esterases, e são enzimas capazes de degradar o ácido ferúlico presente na parede celular vegetal (ABOKITSE et al., 2010; BORKAR, 2015). Podem ser utilizadas na indústria de papel e celulose, além de processos de produção de bioetanol, alimentos e cosméticos (BENOIT et al., 2008). As feruloil esterases (FAE) são de grande importância na biodegradação de lignocelulose, pois hidrolisam as ligações éster entre hidroxí-cinamato e arabino-xilanos e certas pectinas em hemicelulose (ZHANG et al., 2013).

7 Xantana Liase

Os polímeros podem ser degradados por hidrólise de polissacarídeos ou por enzimas da família das Polissacarídeo Liases (EC 4.2.2.-) (MICHAUD et al., 2003). As polissacarídeo liases são uma classe de enzimas responsáveis pela clivagem através do mecanismo de β -eliminação, liberando grupos laterais da cadeia de carbono em polissacarídeos (LOMBARD et al., 2010, 2014). No banco de dados Cazy, estão distribuídas em vinte e oito subfamílias (MICHAUD et al., 2003). Dentre as PLs, a subfamília 8 é formada pelas enzimas: hialuronato liase (EC 4.2.2.1), condroitina AC liase (EC 4.2.2.5), xantana liase (EC 4.2.2.12) e condroitina ABC liase (EC 4.2.2.20).

Dentre as enzimas da via de despolimerização de polissacarídeos, a xantana liase destaca-se, pois até o momento são as únicas bem caracterizadas que usam como substrato o biopolímero xantano (KOOL, 2014), e sua identidade de sequência com outras liases é menor do que 30% (HASHIMOTO et al., 2001).

Atuam modificando as cadeias laterais do biopolímero, liberando manose piruvato, reduzindo a viscosidade e, assim, aumentando a aplicação industrial (HASHIMOTO et al., 1998; MUNAWAR KHALIL, 2012). A enzima xantana liase, até o presente momento a única comercializada, foi isolada de *Bacillus* sp. GL1, um monômero com massa molecular de 75 kDa, e mais ativa em pH 5,5 a 50 °C (HASHIMOTO et al., 1998).

Foi isolada e purificada também uma xantana liase de *Microbacterium* sp. XT11, que possui massa molecular de 110 kD e ativa em pH 6,0 e 6,5 a 40 °C (YANG et al., 2014b), enquanto a mesma enzima isolada de *Paenibacillus alginolyticus* XL-1 possui aproximadamente 86 kDa, é otimamente ativa a um pH 6,0 a 55 °C (RUIJSSENAARS; HARTMANS; VERDOES, 2000). Em estudos de reconhecimento de substrato por xantana liase, a afinidade pelo substrato manose piruvada (PyrMan) foi 400 vezes mais forte do que apenas manose (Man) (MARUYAMA et al., 2007).

8 Considerações Finais

A tecnologia enzimática é inovadora, economicamente aceitável e ambientalmente correta, em virtude da redução na utilização de produtos químicos em diversos setores. Deste modo, a descoberta e a caracterização de novas enzimas podem auxiliar na economia do País, pois são diretamente aplicadas à biotecnologia.

Referências

ABOKITSE, K.; WU, M.; BERGERON, H.; GROSSE, S.; LAU, P. C. K. Thermostable feruloyl esterase for the bioproduction of ferulic acid from triticale bran. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 195–203, jun. 2010.

BALDRIAN, P. Fungal Laccases – Occurrence and Properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 215–242, mar. 2006.

BCC RESEARCH. **Global Markets and Technologies for Biofuel Enzymes-BCC Research**. [s.l.: s.n.].

BENOIT, I.; DANCHIN, E. G. J.; BLEICHRODT, R.-J.; DE VRIES, R. P. Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 3, p. 387–396, mar. 2008.

BENTO, I.; CARRONDO, M. A.; LINDLEY, P. F. Reduction of Dioxygen by Enzymes Containing Copper. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 11, n. 5, p. 539–547, jul. 2006.

BIOFUELS JOURNAL. Novozymes (Denmark) and Petrobras (Brazil) Partner to Produce Advanced Biofuels From Sugarcane Bagasse. **Biofuels Journal**, 2010.

BLUMER-SCHUETTE, S. E.; BROWN, S. D.; SANDER, K. B.; BAYER, E. A.; KATAEVA, I.; ZURAWSKI, J. V.; CONWAY, J. M.; ADAMS, M. W. W.; KELLY, R. M. Thermophilic lignocellulose deconstruction. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 3, p. 393–448, 2014.

BORKAR, S. Alkaliphilic bacteria: Diversity, physiology and industrial applications. In: **Bioprospects of Coastal Eubacteria: Ecosystems of Goa**. [s.l.: s.n.]p. 59–84.

BRANCO, P. W. N. S. L. **Utfpr.Edu.Br**, 2016. Disponível em: <http://www.utfpr.edu.br/patobranco/estrutura-universitaria/diretorias/dirppg/pos-graduacao/mestrados/ppgtp/discentes/PB_PPGTP_M_SanchezWilliam_2016.pdf>.

BRAZILIAN ENERGY RESEARCH COMPANY (EPE). **Brazilian Energy Balance** 2016. p. 14 – 18, 2016.

CANILHA, L.; KUMAR CHANDEL, A.; DOS SANTOS MILESSI, T. S.; FERNANDES ANTUNES, F. A.; DA COSTA FREITAS, W. L.; DAS GRAÇAS ALMEIDA FELIPE, M.; DA SILVA, S. S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2012, p. 1–15, 2012.

CASTRO, S. M.; CASTRO, A. M. Assessment of the Brazilian potential for the production of enzymes for biofuels from agroindustrial materials. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 2, n. 1, p. 87–107, 2012.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3–23, 2005.

DE SOUZA, L. G. A.; DE MORAES, M. A. F. D.; DAL POZ, M. E. S.; DA SILVEIRA, J. M. F. J. Collaborative Networks as a measure of the Innovation Systems in second-generation ethanol. **Scientometrics**, p. 355–372, 2015.

DIAMANTIDIS, G.; EFFOSSE, A.; POTIER, P.; BALLY, R. Purification and Characterization of the First Bacterial Laccase in the Rhizospheric Bacterium *Azospirillum Lipoferum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 7, p. 919–927, jul. 2000.

DWIVEDI, U. N.; SINGH, P.; PANDEY, V. P.; KUMAR, A. Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 2, p. 117–128, 2011.

FALCK, P.; LINARES-PASTÉN, J. A.; ADLERCREUTZ, P.; KARLSSON, E. N. Characterization of a family 43 β -xylosidase from the xylooligosaccharide utilizing putative probiotic *Weissella* sp. strain 92. **Microbial Biology**, v. 26, n. 2, p. 193–202, 2016.

GARRON, M. L.; CYGLER, M. Uronic polysaccharide degrading enzymes. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 28, n. 1, p. 87–95, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2014.07.012>>.

GIANFREDA, L.; RAO, M. A. Potential of Extra Cellular Enzymes in Remediation of Polluted Soils: A Review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 4, p. 339–354, set. 2004.

HASHIMOTO, W.; MIKI, H.; TSUCHIYA, N.; NANKAI, H. **Polysaccharide Lyase** : Molecular Cloning , Sequencing , and Overexpression of the Xanthan Lyase Gene of *Bacillus* sp . Strain Polysaccharide Lyase : Molecular Cloning , Sequencing , and Overexpression of the Xanthan Lyase Gene of *Bacillus* sp . Strain GL1. v. 67, n. 2, p. 713–720, 2001.

HASHIMOTO, W.; MIKI, H.; TSUCHIYA, N.; NANKAI, H.; MURATA, K. Xanthan lyase of *Bacillus* sp. strain GL1 liberates pyruvylated mannose from xanthan side chains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3.765–3.768, 1998.

HELD, C.; KANDELBAUER, A.; SCHROEDER, M.; CAVACO-PAULO, A.; GUEBITZ, G. M. Biotransformation of Phenolics with Laccase Containing Bacterial Spores. **Environmental Chemistry Letters**, v. 3, n. 2, p. 74–77, nov. 2005.

HERVÉ, C.; ROGOWSKI, A.; BLAKE, A. W.; MARCUS, S. E.; GILBERT, H. J.; KNOX, J. P. Carbohydrate-binding modules promote the enzymatic deconstruction of intact plant cell walls by targeting and proximity effects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 34, p. 15.293–15.298, 2010.

HUY, N. D.; THAYUMANAVAN, P.; KWON, T. H.; PARK, S. M. Characterization of a recombinant bifunctional xylosidase/arabinofuranosidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 2, p. 152–159, 2013.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1.219–1.227, 2012.

KNOB, A.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. β -Xylosidases from filamentous fungi: An overview. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 389–407, 2010.

KOCABAS, D. S.; GÜDER, S.; ÖZBEN, N. Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase and its application in agricultural waste biomass hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 66–75, 2015.

KOOL, M. M. **Enzymatic modification and characterization of xanthan**. 2014.

LING, L. L.; SCHNEIDER, T.; PEOPLES, A. J.; SPOERING, A. L.; ENGELS, I.; CONLON, B. P.; MUELLER, A.; HUGHES, D. E.; EPSTEIN, S.; JONES, M.; LAZARIDES, L.; STEADMAN, V. a; COHEN, D. R.; FELIX, C. R.; FETTERMAN, K. A.; MILLETT, W. P.; NITTI, A. G.; ZULLO, A. M.; CHEN, C.; LEWIS, K. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature**, v. 517, n. 7535, p. 455–459, 2015.

LOMBARD, V.; BERNARD, T.; RANCUREL, C.; BRUMER, H.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. A hierarchical classification of polysaccharide lyases for glycogenomics. **Biochemical Journal**, v. 432, n. 3, p. 437–444, 2010. Disponível em: <<http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20101185>>.

LOMBARD, V.; GOLACONDA RAMULU, H.; DRULA, E.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, 2014.

LORENZ, P.; ECK, J. Outlook: Metagenomics and industrial applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 510–516, 2005.

MARUYAMA, Y.; MIKAMI, B.; HASHIMOTO, W.; MURATA, K. A structural factor responsible for substrate recognition by *Bacillus* sp. GL1 xanthan lyase that acts specifically on pyruvated side chains of xanthan. **Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 781–791, 2007.

MCMAHON, A. M.; DOYLE, E. M.; BROOKS, S.; O'CONNOR, K. E. Biochemical characterisation of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium *Pseudomonas putida* F6. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1435–1441, abr. 2007.

MICHAUD, P.; DA COSTA, A.; COURTOIS, B.; COURTOIS, J. Polysaccharide lyases: Recent developments as biotechnological tools. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 233–266, 2003.

MORAES, M. A. F. D. Perspective: Lessons from Brazil. **Nature**, v. 474, p. S25, 2011.

MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. Insights into the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1–10, 2016.

MUNAWAR KHALIL, B. M. J. Herschel-Bulkley Rheological Parameters of a Novel Environmentally Friendly Lightweight Biopolymer Drilling Fluid from Xanthan Gum and Starch Munawar. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, p. 595–606, 2012.

NANKAI, H.; HASHIMOTO, W.; MIKI, H.; KAWAI, S.; MURATA, K. Microbial system for polysaccharide depolymerisation: enzymatic route for xanthan depolymerisation by *Bacillus* sp. strain GL1. **Appl Environ Microbiol**, v. 65, n. 6, p. 2.520–2.526, 1999.

NIGAM, P. S. Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications. **Biomolecules**, v. 3, p. 597–611, 2013.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 1, p. 52–68, fev. 2011.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZ, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–591, 2005.

PRADELLA, C.; NACIONAL, C. Biopolímeros e Intermediários Químicos. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos**, n. October, p. 120, 2015.

RUIJSSENAARS, H. J.; HARTMANS, S.; VERDOES, J. C. A novel gene encoding xanthan lyase of *Paenibacillus alginolyticus* strain XL-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 9, p. 3.945–3.950, 2000.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 219–228, 2003.

WANG, G.; HUANG, X.; NG, T. B.; LIN, J.; YE, X. Y. High phylogenetic diversity of glycosyl hydrolase family 10 and 11 xylanases in the sediment of Lake Dabusu in China. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

YADAV, S.; CHANDRA, R. Biodegradation of Organic Compounds of Molasses Melanoidin (MM) from Biomethanated Distillery Spent Wash (BMDS) during the Decolourisation by a Potential Bacterial Consortium. **Biodegradation**, v. 23, n. 4, p. 609–620, jul. 2012.

YANG, B.; DAI, Z.; DING, S.-Y.; WYMAN, C. E. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, v. 2, p. 421–449, 2014a.

YANG, F.; YANG, L.; GUO, X.; WANG, X.; LI, L.; LIU, Z.; WANG, W.; LI, X. Production and purification of a novel xanthan lyase from a xanthan-degrading microbacterium sp. Strain XT11. **Scientific World Journal**, v. 2014, 2014b.

ZHANG, S.-B.; ZHAI, H.-C.; WANG, L.; YU, G.-H. Expression, purification and characterization of a feruloyl esterase A from *Aspergillus flavus*. **Protein Expression and Purification**, v. 92, p. 36–40, 2013.

ZHANG, Y.-H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 5, p. 452–481, 2006.

Capítulo 11



Princípios da citometria de fluxo

*Nathan da Rocha Neves Cruz
Helena Cristina Delgado Britto
Lívia Maria Semolin
Michelly Fernandes de Macedo
Áureo Evangelista Santana*

1 Introdução

A Citometria de fluxo é uma tecnologia que permite analisar, simultaneamente, várias características de uma célula ou partícula conduzida em meio fluido e interceptada por um feixe de luz (conjunto de lasers).

A análise deste conjunto de características pode estar relacionada tanto com constituintes citoplasmático, quanto com constituintes nucleares, tais como, proteínas, cromossomos, organelas, citocinas, interleucinas, dentre outros. Dependendo da configuração do citômetro aplicado ao estudo, muitas características podem ser processadas simultaneamente, conferindo aos dados analisados um caráter multiparamétrico.

A metodologia de citometria de fluxo pode também ser denominada FACS (*fluorescent activated cell sorter*), pois permite a separação de células de uma população heterogênea, através da marcação com um corante fluorocromo. A separação da população celular de interesse pode ser uma separação gráfica, onde aparecerá marcada em gráficos, denominando os *gates*, ou pode ser física, onde as células marcadas são direcionadas a tubos

específicos por meio de um citômetro Sorter.

A maioria dos citômetros não possui a capacidade de separar as células fisicamente em tubos, e assim são denominados citômetros analíticos, os quais possuem apenas a capacidade de detectar e de mensurar características de espectro de luz (*light scatter*) e fluorescência emitida (*mean fluorescence intensity*).

Tanto citômetros analíticos como *sorters* (também denominados *Cell Sorters*) possuem uma combinação de sistemas que podem ser divididos em: fluídico, óptico e eletrônico. O sistema fluídico obedece ao princípio da focalização hidrodinâmica, que é quando uma amostra é posicionada no centro de coluna de solução salina, sem misturar-se por meio de um suporte cilíndrico pressurizado, denominado célula de fluxo (Figura 1). Conforme há aumento da pressão desse ambiente pressurizado, o conjunto das amostras (*core*) é alinhado em uma coluna fixa e sistemática, onde cada célula é enfileirada e pode ser interceptada de forma única pelo feixe de lasers do aparelho, produzindo refração de luz em todas as direções.

O sistema óptico é composto pelos lasers, lentes e tubos fotométricos (*PD - photodiode* e *PMTs- photomultiplier tubes*). O primeiro laser a ser utilizado em citometria foi o azul (488 nm); entretanto, atualmente, a maioria dos citômetros possui uma configuração básica, combinando o laser azul ao laser vermelho (630 nm). Nesta configuração, é possível detectar 8 cores diferentes e, conforme se aumenta a configuração de lasers do aparelho, mais fluorescências podem ser distinguidas pelo aparelho, podendo-se chegar a até 20 cores, quando se associam os lasers violeta (405 nm), amarelo (561 nm) e UV, por exemplo.

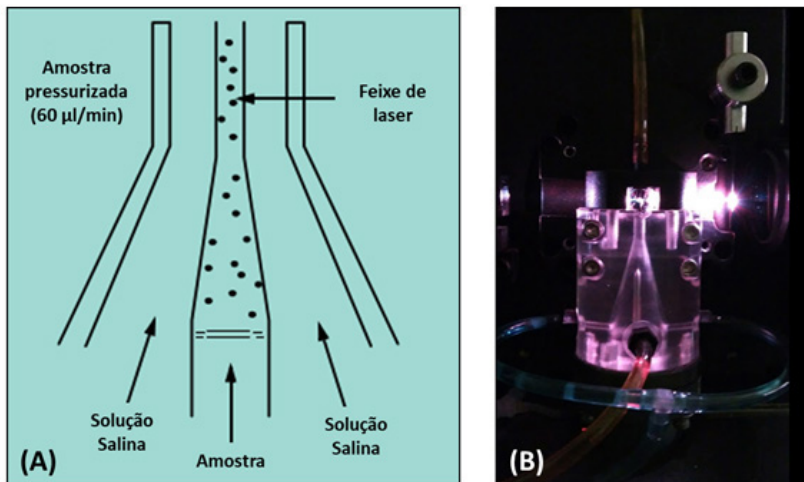


Figura 1. (A) Esquematização da célula de fluxo em um citômetro onde a amostra é enfileirada em fluxo contínuo por uma coluna de solução salina. (B) Célula de fluxo de citômetro BD FACS Canto II.

A metodologia citométrica é fundamentada pela luz, que nos fornece dois parâmetros: espectro de luz (*light scatter*) e fluorescência. Os citômetros são capazes de detectar dois tipos de espectro de luz: *forward angle scatter light* – FSC (leitura de frente), que é a difração luminosa do laser ao redor da célula, sendo esta captada pelo fotodiodo frontal (PD ou FSC diode) e proporcional ao tamanho ou ao volume celular. Outro espectro de luz é o *light scatter 90°* (*Side Angle Scatter* – SSC), que é o conjunto de comprimentos de ondas refletidas (refração) devido ao conteúdo intracelular (complexidade / granulosidade), ou seja, quando mais material ou granulosidade intracelular, mais alta, será a leitura de SSC, proporcionalmente, sendo este detectado em fotodiodo de SSC (Figura 2).

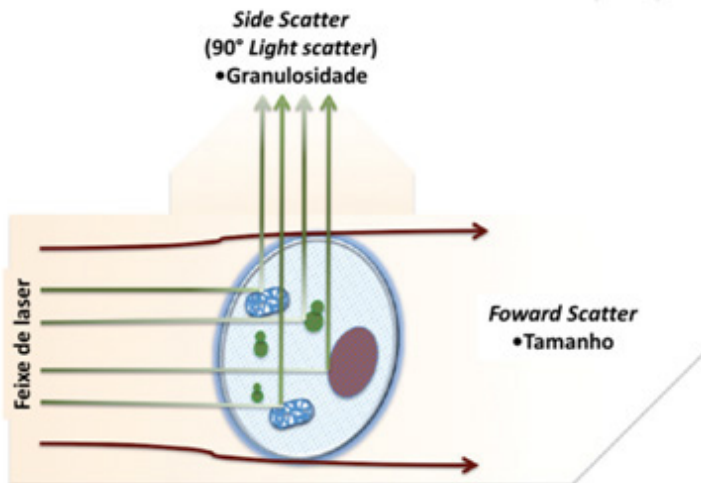


Figura 2. Propriedade de light scattering. FSC é proporcional ao tamanho, enquanto SSC é proporcional à granulosidade ou à complexidade interna celular (ADAN et al., 2016).

Além do FSC e do SSC, os citômetros possuem conjuntos ópticos que permitem detectar inúmeros comprimentos de luz (fluorescências), quando as células são marcadas com corantes fluorocromos. Esses conjuntos de lentes filtram e direcionam a luz para os fotomultiplicadores (*PMT: photomultiplier tubes*), compostos por catodos de alta sensibilidade que captam fracas emissões de luz, sendo assim eficientes na detecção e na distinção de vários graus de fluorescência e sinais fracos ou inespecíficos de SSC (Figura 3).

Os componentes eletrônicos são detectores que convertem os sinais luminosos em pulsos de voltagem que são destinados a um computador, onde serão analisados e interpretados por softwares destinados à citometria de fluxo. A representação gráfica das análises de citometria de fluxo podem ser na forma de gráficos de pontos (dotplot) ou histogramas de frequências (Figura 4).

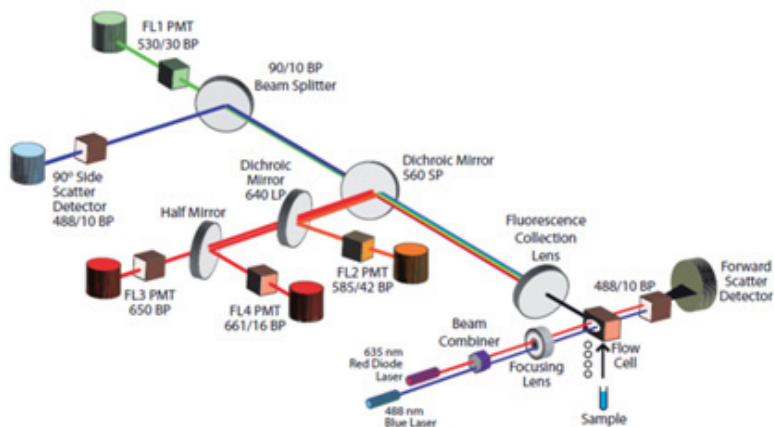


Figura 3. Esquema do sistema óptico de citômetro de fluxo (WEISS; WILKERSON, 2012).

A partir de uma amostra heterogênea, pode-se separar uma determinada população utilizando dois ou mais corantes fluorocromos que são detectados simultaneamente. Essa possibilidade de determinação é denominada citometria policromática ou painel multicolor, onde cada fluorocromo se excita em um laser específico (fase de absorção) e emite uma luz com comprimentos de ondas distintos (fase de emissão) que são capturados nos PMTs correspondentes.

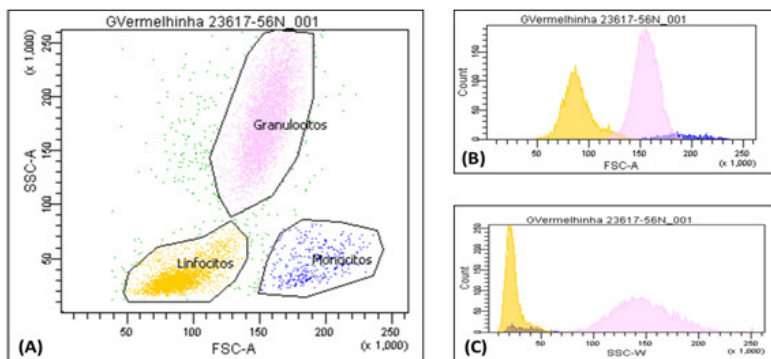


Figura 4. Citogramas de leucócitos de suíno em representação gráfica de dotplots (A) e histogramas (B e C). Na Figura A, é possível visualizar três populações de leucócitos distintas apenas considerando as propriedades citométricas de tamanho (FSC) e de complexidade (SSC).

O painel multicolor pode ser aplicado para identificar uma linhagem celular específica (i.e. pesquisa de Linfócitos T reguladores), determinar ativação ou produção celular (macrófagos produzindo IL-10), quantificar viabilidade (células mortas em meio de cultura), determinar do ciclo celular (cultura de células ou pesquisa de células neoplásicas) ou quantificar o ácido desoxirribonucleico (ensaio de haploidia em melhoramento genético).

Os corantes fluorescentes podem estar em uma solução ou estar conjugados a anticorpos monoclonais específicos para determinada população de interesse; neste caso, a associação de anticorpos com corantes fluorocromos é denominada imunofenotipagem. A imunofenotipagem consiste no isolamento de populações de células distintas com a possibilidade de utilização de diferentes antígenos de superfície marcados com anticorpos fluorescentes de alta especificidade e ausência de reação cruzada com outros antígenos de não interesse. Na medicina humana, os anticorpos monoclonais utilizados para diferenciação celular recebem a denominação de *CD* (*cluster designation* - denominação de grupamento), que padroniza a nomenclatura dos anticorpos monoclonais fabricados em diferentes laboratórios, sendo esta classificação abrangente para animais e plantas.

Os fluorocromos podem ser moléculas únicas, como o Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), R-phycoeritrina (R-PE ou PE), Allophycocyanin (APC), grupo Alexa (350, 488, 647), dentre outros.

Outro tipo de fluorocromos são aqueles em tandem, que são fluorocromos conjugados e seguem o princípio da ressonância energética da fluorescência (FRET), que é quando um fluorocromo principal excita e transfere de forma direcionada sua emissão a outro fluorocromo ligado a ele, produzindo um intenso brilho, e em um canal (comprimento de onda) diferente do fluorocromo principal; exemplo disso são PE-Cy5, PerCP-Cy5.5, APC-Cy7.

O uso difundido de uma ampla gama de corantes ligados a anticorpos monoclonais é imprescindível para identificação, caracterização e determinação de uma população normal ou até mesmo anormal, como em casos de neoplasias. Entretanto, nem sempre um fluorocromo necessita estar ligado a um anticorpo para identificar uma característica celular. Um bom exemplo disso são os corantes fluorescentes utilizados para quantificar DNA celular ou determinar a viabilidade (morte) celular; dentre os mais utilizados, estão o iodeto de propídio (PI) e o 7-aminoactinomycin D (7-AAD), que intercalam moléculas de DNA, permitindo sua quantificação pelo citômetro ou para análise de viabilidade celular, uma vez que estes corantes não são permeáveis em relação à membrana celular, sendo possível detectar quais células já estão mortas.

Corantes fluorescentes como Laranja de Acridina, Laranja de Thiazole e 3,3-dihexyloxacarbocyanine (DiOC₆(3)) podem ser úteis para marcar células sanguíneas e permitir a diferenciação de leucócitos, hemácias jovens (reticulócitos) e trombócitos, sendo utilizados em estudos de distúrbios proliferativos e em resposta a doenças.

Com a tecnologia de citometria de fluxo, é possível classificar e quantificar uma determinada população celular, seja ela animal, seja vegetal, além de avaliar sua interação, ativação ou produção frente a um processo patológico ou a um tratamento específico por intermédio da mensuração de proteínas, marcadores ou citocinas, sendo uma metodologia de alto valor científico.

Referências

ADAN, A.; ALIZADA, G.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y.; NALBANT, A. Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, p. 1-14, 2016. DOI: 10.3109/07388551.2015.1128876.

HENEL, G.; SCHMITZ, J. L. Basic theory and clinical applications of flow cytometry. **Labmedicine**, v. 38, n. 7, p. 428-436, 2007.

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E.; CÁPUA, M. L. B.; COELHO, P. S. et al. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 966-973, 2005.

WEISS, D.J.; WILKERSON, M. J. Flow cytometry. *In*: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's: Veterinary hematology**. 6. ed. Iowa: Willey-Blackwell, 2010. p. 1.074-1.081.

Capítulo 12



Transformação genética de plantas e suas aplicações

Élcio Hissagy Samecima Júnior

Renan Gonçalves da Silva

Renato Farinácio

Janete Aparecida Desidério

Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Sônia Marli Zingaretti

1 Introdução

Plantas transgênicas são aquelas que foram geneticamente modificadas em relação à sua espécie original, por intermédio de técnicas da engenharia genética. Dentre as principais características que são objetivadas com a obtenção de plantas transgênicas, encontram-se a produção de plantas com resistência a insetos e patógenos (fungos, bactérias ou vírus), aos herbicidas ou plantas tolerantes a diversos fatores ambientais, como a seca (CORDEIRO, 2014).

A transformação consiste na introdução de um gene de interesse nas células vegetais por diferentes métodos, como a inoculação com bactérias do gênero *Agrobacterium* ou por biobalística (BRASILEIRO; ARAGÃO, 2014). O gene a ser inserido é identificado e selecionado com base em estudos de biologia molecular e bioensaios que fornecem informações acerca da expressão deste gene em determinadas situações (estresses bióticos e/ou abióticos). São muitas as aplicações dos métodos de transformação genética de plantas,

e várias espécies de grande importância para o setor agroeconômico foram geneticamente melhoradas por esse processo.

2 Identificação de genes de interesse

Existem várias ferramentas e softwares da bioinformática que são aplicáveis no estudo de uma determinada sequência gênica. As análises vão desde o conhecimento dos aminoácidos, que constituem uma proteína codificada a partir do RNA mensageiro (mRNA), aos processos biológicos e a localização subcelular de que essa proteína participa. Esse tipo de pesquisa normalmente é caracterizado como análise *in silico*, e pode ser utilizada em estudos de funcionalidade computacional de um gene ou de um conjunto gênico.

A identificação de genes de interesse é mediada por técnicas que basicamente envolvem o isolamento do cDNA, através da reação pela enzima transcriptase reversa, que utiliza o mRNA como molde, ou por estudos do transcriptoma, que indicam o número de genes expressos e as alterações de expressão gênica em determinadas condições, como verificado por Belesini et al. (2017), que, analisando cultivares contrastantes de cana-de-açúcar submetida ao déficit hídrico, obtiveram informações sobre o cabedal gênico que é induzido na cultivar SP81-3250 (tolerante à seca) e RB855453 (suscetível), através da técnica de RNA-seq.

A identificação de genes expressos em cana-de-açúcar submetida à seca também foi relatada por Rodrigues et al. (2009). Nesse trabalho, os autores utilizaram outra técnica da biologia molecular, que consiste na síntese de cDNA a partir do mRNA e hibridização em membranas para macroarranjo. Verificou-se que alguns genes são diferencialmente expressos (por exemplo, *Lipid Transfer Protein* e *DNAj*) nas duas cultivares utilizadas (SP83-5073 – tolerante; SP90-1638 – suscetível).

Essas informações sobre a expressão diferencial de alguns genes podem demonstrar uma possível relação entre os níveis dos produtos gênicos e os mecanismos ou a capacidade de tolerância de uma espécie a estresses bióticos ou abióticos. A partir desses trabalhos de identificação de um ou mais genes em determinada espécie vegetal, seja por técnicas mais avançadas, como o RNA-seq, seja por micro e macroarranjo, as pesquisas são direcionadas para a análise da funcionalidade deste gene via transformação genética de plantas-modelo ou da própria espécie (Figura 1).

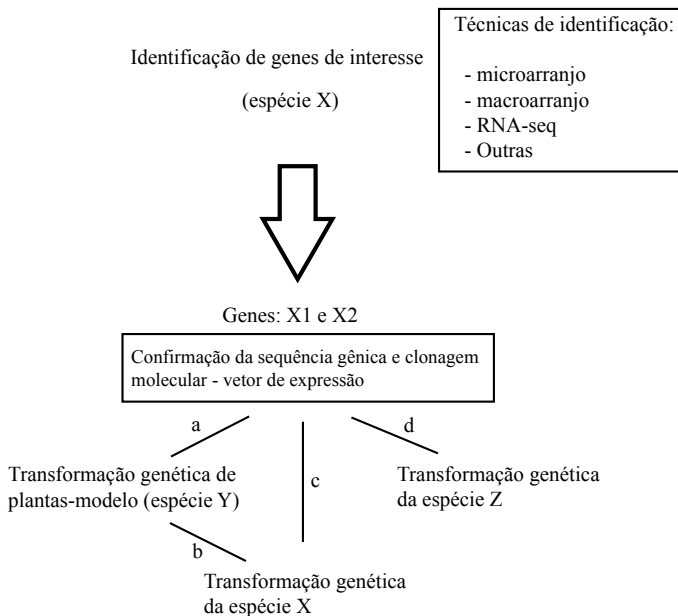


Figura 1. Resumo das principais etapas para obtenção de plantas geneticamente modificadas. Fonte: autores.

De acordo com a Figura 1, os genes X1 e X2 podem ser identificados por diferentes técnicas moleculares e utilizados no processo de clonagem molecular, que envolve a obtenção de um vetor (cassete) de expressão. Esse vetor, que carrega ambos os genes ou somente um destes, será utilizado pelos métodos de transformação direta ou indireta de tecidos vegetais (tópico abordado a seguir). A transformação pode ser realizada, por exemplo, com o objetivo de estudar e de confirmar a funcionalidade do gene X1 e/ou X2. Nesse caso, pode-se realizar a transformação genética da espécie-modelo Y (por exemplo, *Nicotiana* sp. e *Arabidopsis* sp.) – etapa “a”. Averiguada a função dos genes, estudos de superexpressão podem ser feitos mediante o aumento do número de cópias dos genes (inserção via transformação genética) na espécie X (etapas “b” e “c”).

Além disso, é possível utilizar os genes X1 e X2 como transgenes para a transformação genética da espécie Z, seja para o conhecimento da função gênica seja para o melhoramento genético da espécie de interesse (etapa “d”).

3 Métodos de transformação genética de plantas

Para se obter sucesso no processo de expressão de uma nova proteína, o gene introduzido deve ser transcrito, processado e traduzido, e todo este processo é realizado pela maquinaria da célula hospedeira, nos órgãos e estágios de desenvolvimento desejados da planta (BHATIA et al., 1986).

A transformação de plantas engloba dois passos consecutivos: no primeiro, ocorre a introdução do DNA nas células da planta; e no segundo, o DNA inserido no interior da célula é integrado ao seu genoma, com isso se obtêm plantas transgênicas com característica de interesse herdáveis por seus descendentes (ALTPETER et al., 2016).

O principal obstáculo na transformação genética de plantas é dado pelo fato de o DNA ser uma macromolécula que não se difunde através da membrana celular, pois esta funciona como uma barreira, que controla a entrada de nutrientes, íons e a saída de resíduos do interior da célula (RIVERA et al., 2012).

Diante de todas as particularidades envolvidas na transformação genética de plantas, alguns requisitos devem ser observados para a escolha do método a ser empregado, dentre os quais se destacam (TWYMAN; CHRISTOU; STOGER, 2002):

- Alta eficiência de transferência de DNA para tecido-alvo;
- Disponibilidade de células/tecidos competentes para a regeneração;
- Adequado sistema de seleção de células transformadas;
- Eficiência de transformação alta (número de plantas transgênicas recuperadas de células/explantos originalmente transformadas);
- Reduzido tempo de cultura de tecidos, para evitar variações somaclonais;
- Alta frequência de recuperação de fenótipo normal, ou seja, fenótipo idêntico ao da planta não transformada, exceto pela característica de interesse;
- Procedimentos técnicos simples;
- De baixo custo;
- Versátil (aplicável a muitas espécies);
- Independente de genótipos (aplicável a todas as cultivares e variedades, incluindo os genótipos-elite).

Neste sentido, duas técnicas são amplamente utilizadas na transformação genética de plantas: a baseada no sistema *Agrobacterium*, e no biobalístico (BRASILEIRO; CARNEIRO, 2015).

A *Agrobacterium* é uma bactéria fitopatogênica que naturalmente realiza a transformação genética em suas plantas-alvo, nesse processo, transfere

ao hospedeiro parte de seu genoma, causando o sintoma conhecido como galha-da-coroa, efeito que ocorre devido à introdução de genes indutores de tumor, fazendo com que haja a divisão anormal das células (BRASILEIRO; ARAGÃO, 2014; BRASILEIRO; CARNEIRO, 2015). Com a descoberta deste mecanismo, é possível de se realizar a remoção destes genes responsáveis pela indução do tumor e promover a inserção de um ou de mais genes de interesse (GELVIN, 2003).

A biobalística foi desenvolvida originalmente para a transformação de monocotiledôneas: já que, neste tipo de plantas, a transformação mediada por *Agrobacterium* apresentava inicialmente baixa eficiência (RIVERA et al., 2012). No método de biobalística, o material genético de interesse é precipitado em microprojéteis de metal (ouro ou tungstênio) com cerca de um micron de diâmetro, que são então acelerados em direção ao tecido-alvo a uma velocidade capaz de cruzar a parede e as membranas das células, liberando em seu interior o material genético precipitado sob as partículas e facilitando a integração deste gene (MEDINA; SIMPSON; HERRERA-ESTRELLA, 1998).

Atualmente, o método mais utilizado para a aceleração das partículas em direção ao tecido-alvo baseia-se na utilização de gás hélio de alta pressão, e sua preferência ocorre por permitir o controle de algumas variáveis que afetam a eficiência da transformação. Vale ressaltar que há outros métodos utilizados para impulsionar as partículas, como o processo de rápida evaporação de uma gotícula de água, gerada pela passagem de uma corrente elétrica (MEDINA; SIMPSON; HERRERA-ESTRELLA, 1998).

3.1 Vantagens e desvantagens dos principais métodos de transformação

Diante da complexidade na escolha do método de transformação, Rivera et al. (2012) apontam as principais vantagens e desvantagens do sistema via *Agrobacterium* e biobalístico:

i) *Agrobacterium*

Vantagens - A inserção no genoma é precisa e simples, com extremidades definidas e baixo número de cópias; integração e herança estáveis; expressão consistente ao longo das gerações; utilizado para diferentes tipos de células; protocolos já estabelecidos e alta eficiência.

Desvantagens - Dificuldade em manipular alguns parâmetros

relacionados à eficiência de transformação e de regeneração de plantas; processo lento; requer protocolos estéreis.

ii) Biobalística

Vantagens – Facilidade; desnecessária a remoção da parede celular; independe das propriedades fisiológicas da célula; possibilidade de transformação com múltiplos transgenes.

Desvantagens - Alto custo; requer fornecimento contínuo de consumíveis; possibilidade de danos ao DNA no processo; insere múltiplas cópias no genoma; baixa eficiência de transformação.

4 Aplicações: plantas utilizadas, eventos e características de interesse

A Comissão Nacional de Biossegurança (CTNBio) é formada por pessoas de diversas áreas, cuja finalidade é prestar apoio técnico ao Governo Federal na formulação, atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança relativa aos Organismos Geneticamente Modificados - OGMs. No ano de 1998, a CTNBio aprovou seu primeiro evento transgênico, sendo o mesmo foi suspenso em decorrência de uma liminar obtida pelas organizações não governamentais Greenpeace e o Instituto de Defesa do Consumidor. O evento aprovado, em 1998, é o MON-4032-6 da Monsanto, referindo-se à resistência ao glifosato em soja (CTNBio, 2018; ISAAA, 2018). A CTNBio começou a aprovar efetivamente os eventos transgênicos no ano de 2008 e, atualmente, já aprovou eventos em diversas culturas de “alta expressão” dentro do mercado brasileiro, tais como: milho, algodão, soja, feijão, eucalipto e, atualmente, cana-de-açúcar (CTNBio, 2018; ISAAA, 2018).

Em se tratando de algumas grandes culturas (soja, milho e algodão), 93,4% da área total cultivada com estas referem-se ao cultivo de transgênicos, representando 49,1 milhões de hectares (CELERES, 2018). A CTNBio libera eventos simples, compostos somente por um gene ou por conjuntos gênicos, conhecidos como “piramidação”. A piramidação (conjunto de genes dentro do mesmo vetor) visa a tentar diminuir os efeitos de quebra de resistência dos insetos.

Na agricultura contemporânea, a CTNBio já aprovou eventos referentes a diversas tecnologias. Temos 69 eventos aprovados para comercialização, dos quais 21 representam eventos para obtenção de plantas geneticamente modificadas para conferir tolerância a herbicidas, 31 com genes combinados;

12 para resistência a insetos; 1 para resistência a doenças; 1 visando ao aumento da produtividade, entre outras características (CELERES, 2018).

Destacam-se a seguir, alguns eventos transgênicos para tolerância a herbicidas e a insetos.

4.1 Eventos de transformação para plantas resistentes a insetos

Com o aumento da resistência de insetos a algumas proteínas tóxicas, o incentivo no desenvolvimento de pesquisa, visando a novos eventos de plantas transgênicas resistentes a insetos, é grande. Com isso, para as culturas de grande valor comercial, existem vários eventos referentes à resistência de insetos-praga. Plantas transgênicas resistentes ao ataque de insetos-praga possuem em seu genoma (DNA) os genes *cry*, *vip* ou os dois juntos, ambos extraídos da bactéria *Bacillus thuringiensis* e inseridos na planta por meio de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* ou através da técnica de biobalística. A expressão dos genes *cry* e *vip* tem amplo aspecto de ação, e conjuntamente afetam quase todas as ordens de insetos. As proteínas codificadas atuam de maneira tóxica, promovendo um colapso no intestino dos insetos por intermédio de uma reação específica (cada proteína tem seu próprio sítio receptor) e provocando-lhes a morte (MARUCCI et al., 2015; CTNBio, 2018).

4.2 Eventos de transformação para plantas resistentes a herbicidas

Alguns eventos de plantas geneticamente modificadas para conferir tolerância a herbicidas:

i) GTS-40-3-2 (Soja - *Glycine max*)

Evento produzido pela Monsanto Ltda., no ano de 1990. Possui resistência ao herbicida glifosato através da produção da proteína CP4-EPSPS. Para obtenção deste evento, utilizou-se um gene do organismo doador, a bactéria *Agrobacterium tumefaciens*.

ii) T25 (milho - *Zea mays*)

Evento produzido pela Bayer S.A., no ano de 2007. Possui resistência ao herbicida glufosinato de amônio. Foi inserido na planta o gene *pat*, responsável

pela síntese da enzima fosfinotricina-N-acetiltransferase (PAT), que catalisa a conversão de L-fosfinotricina (glufosinato de amônio) a produtos não tóxicos, inativando o ingrediente ativo e, deste modo, conferindo à planta a característica de resistência ao herbicida. Tem como organismo doador do gene a bactéria *Streptomyces viridochromogenes*, estirpe Tü 494.

iii) DAS-68416-4 (*Glycine max*)

Evento produzido pela Dow Agrosiences Ltda., no ano de 2015. Possui resistência ao herbicida 2,4 D, sendo inserido na planta o gene *aad 12*, e tendo como doador o organismo *Delftia acidovorans*.

iv) MON 87708 (*Glycine max*)

Evento produzido pela Monsanto do Brasil Ltda., no ano de 2016. Possui resistência ao herbicida Dicamba. A soja MON 88708 expressa o gene *dmo* (*dicamba mono-oxigenase*) oriundo da bactéria *Stenotrophomonas maltophilia* cepa DI-6 (gram-negativa e aeróbica).

Referências

ALTPETER, F. et al. Advancing crop transformation in the era of genome editing. **The Plant Cell**, v. 28, p. 1.510–1.520, 2016.

BELESINI, A. A. et al. De novo transcriptome assembly of sugarcane leaves submitted to prolonged water-deficit stress. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n.2, gmr16028845, 2017.

BHATIA, C. R. et al. Genetic transformation of plants. **Proceedings: Plants Sciences**, v. 96, n. 2, p. 79–112, 1986.

BRASILEIRO, A. C. M.; ARAGÃO, F. J. L. O sistema Agrobacterium: do solo para o laboratório. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. 3. ed. Brasília: Embrapa, 2014.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. DE C. Introdução à transformação genética de plantas. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. DE C. (Eds.). **Manual de transformação genética de plantas**. 2. ed. Brasília: Embrapa, 2015.

CÉLERES. **3º levantamento de adoção da biotecnologia agrícola no Brasil, safra 2016/2017**, 2018. Disponível em: <<http://www.celeres.com.br/3o-levantamento-de-adocao-da-biotecnologia-agricola-no-brasil-safra-201617/>>. Acesso em: 09 mar. 2018.

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). **Liberação comercial - Plantas**, 2018. Disponível em: <http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial/-/document_library_display/SqhWdohU4BvU/view/614405?_110_INSTANCE_SqhWdohU4BvU_redirect=http%3A%2F%2Fctnbio.mcti.gov.br%2Fliberacao-comercial%3Fp_p_id%3D110_INSTANCE_SqhWdohU4BvU%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-2%26p_p_col_count%3D3#/liberacao-comercial/consultar-processo>. Acesso em: 09 mar. 2018.

CORDEIRO, M. C. R. O diagnóstico molecular aplicado à cultura de tecidos vegetais. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. 3. ed. Brasília: Embrapa, 2014.

GELVIN, S. B. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “Gene-Jockeying” tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 1, p. 16–37, 2003.

International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications - ISAAA. **GM Approval Database**, 2018. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>>. Acesso em: 09 mar. 2018.

MARUCCI, S.C. et al. Relação entre toxicidade de proteínas Vip3Aa e sua capacidade de ligação a receptores intestinais de lepidópteros-praga. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 8, p. 637-648, 2015.

MEDINA, C.; SIMPSON, J.; HERRERA-ESTRELLA, L. Methods for plant genetic transformation. In: GALINDO, E.; RAMÍREZ, O. R. (Eds.). **Advances in Bioprocess Engineering II**. Springer Netherlands, p. 67–82, 1998.

RIVERA, A. L. et al. Physical methods for genetic plant transformation. **Physics of Life Reviews**, v. 9, n. 3, p. 308–345, 2012.

RODRIGUES, F. A.; LAIA, M. L.; ZINGARETTI, S. M. Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. **Plant Science**, v. 176, n. 2, p. 286-302, 2009.

TWYMAN, R. M.; CHRISTOU, P.; STOGER, E. Genetic transformation of plants and their cells. In: OKSMAN-CALDENTY K. M.; BARZ, W. (Eds.). **Plant Biotechnology and Transgenic Plants**. New York: Marcel Dekker, p. 111–141, 2002.

Capítulo 13



Ferramenta de edição genômica CRISPR/Cas9 aplicada ao melhoramento genético de Soja

*Guilherme Henrique Bevilacqua
Lígia de Oliveira Amaral
Lucas Berger Munaro
Paloma Helena da Silva Libório
Wallace de Sousa Leite
Sandra Helena Unêda-Trevisoli*

1 A cultura da soja e o melhoramento genético

A cultura da soja constitui-se na mais importante oleaginosa cultivada em todo o mundo. A produção mundial desta *commodity*, no último ano agrícola, foi de aproximadamente 350 milhões de toneladas, produzidas em mais de 120 milhões de hectares (USDA, 2017). Sua grande expressão também é devida aos inúmeros fins para os quais pode ser utilizada, desde matéria-prima para diversos produtos, principalmente ração animal e óleo para consumo humano, até o consumo do grão como fonte de proteína em substituição a outros alimentos.

Assim, da mesma forma que o manejo eficiente e o avanço tecnológico na área agrícola, o melhoramento genético fornece o suporte necessário para que a agroindústria se mantenha em atividade, pois tem permitido, ao longo dos anos, a obtenção de genótipos que atendam às crescentes exigências do mercado. A disponibilização de genótipos mais resistentes, adaptados e desenvolvidos para melhor atender a estes fins, contribui de forma relevante para a produção e o desenvolvimento das regiões de cultivo.

No cenário atual, são inúmeras as técnicas de melhoramento que po-

demos aplicar às espécies vegetais. Os marcadores moleculares, bem como a manipulação do DNA, dentre outras ferramentas, surgiram como meios de auxiliar as técnicas convencionais de campo e de laboratório, bem como torná-las mais eficientes, rápidas e precisas. Tudo isto se torna ainda mais promissor quando percebemos que a utilização destes recursos possibilita a aproximação entre genótipo e fenótipo e, conseqüentemente, a obtenção de cultivares que realmente possuam as características que se deseja, tornando mais eficiente o processo seletivo de genótipos superiores.

Neste contexto, uma técnica recente, que tem sido utilizada de forma crescente consiste no CRISPR – CAS9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) ou grupos de repetições palindrômicas curtas, regularmente espaçadas, baseadas no sistema imune adaptativo encontrado na natureza em bactérias que as protegem de DNAs invasores (BORTESI; FISCHER, 2015). Trata-se de uma molécula de RNA complementar ao DNA original, associada a uma proteína, a Cas9 que, juntas, exploram o DNA em busca de sequências-alvos que se deseja modificar (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014). A técnica pode ser usada de várias maneiras, desde a degradação de genes inteiros e a introdução de segmentos no genoma em um ponto específico, até a correção de genes modificados para que recuperem suas funções. Esta técnica tem sido adotada principalmente nas áreas de medicina, biologia e tecnologia. Na área vegetal, tem sido enfatizada a obtenção de plantas de várias espécies portando genes completamente diferentes de sua estrutura original, como genes visando à resistência a doenças, entre outros (BORTESI & FISCHER, 2015). Restrições ao uso dessa ferramenta estão, atualmente, mais relacionadas ao uso em animais e em embriões humanos. Quando se trata de espécies vegetais, não foram levantadas questões particulares; no entanto, tem-se a consciência de que as conseqüências são imprevisíveis ao se modificar um organismo vivo.

2 Edição Genômica CRISPR/Cas9

Conforme mencionado, entre as técnicas atuais para edição de genoma, o CRISPR tem ganhado destaque nas diversas esferas da ciência. Um dos motivos está relacionado à facilidade no uso da técnica e da precisão na modificação genética, além de permitir reforçar ou inibir determinada característica de um organismo, sem necessariamente incluir genes de outras espécies. Desta forma, modificações que levariam anos para ocorrer, por meio das mutações naturais, podem ser feitas com apenas uma mutação induzida (EMBRAPA, 2017). A tecnologia CRISPR/Cas9 pode ser empregada para a edição do genoma de várias culturas, pois sua utilização pode viabilizar o processo de desenvolvimento de novas cultivares com características especiais.

Por definição, CRISPR são pequenos fragmentos de RNA que se associam a proteínas específicas, denominadas CRISPR associated proteins ou

Cas, formando um complexo capaz de degradar o material genético invasor (HSU et al., 2014; RICHTER et al., 2012). A degradação ocorre caso a porção de material genético invasor já tenha entrado em contato com a bactéria e integrado seu genoma, estando presente na forma de RNA no complexo CRISPR/Cas que agora irá destruir a nova invasão (SANDER; JOUNG, 2014).

A edição genômica através do CRISPR funciona por meio de mecanismos moleculares do sistema imunológico bacteriano, as quais realizam a edição genômica por meio da clivagem do DNA por uma endonuclease (Cas9), guiada a partir de uma sequência de RNA, que é capaz de se parear com as bases de uma sequência-alvo. Desta forma, o sistema pode ser utilizado, tanto para reparo de mutações (restaurando a função gênica), quanto para introdução de mutações (“nocaute” gênico). Com a união de refinadas técnicas moleculares e biotecnológicas, o CRISPR/Cas9 foi proposto para aplicação em edição genômica e já se encontra comercialmente disponível para inúmeras áreas (RICHTER et al., 2013). O sistema CRISPR faz uso de RNA antissenso, como memória de invasões anteriores, e é composto basicamente por três fases: aquisição, expressão e interferência. O primeiro estágio é a aquisição, que ocorre logo após a entrada de um DNA invasor, onde novas sequências de fagos e plasmídeos são obtidas e integradas ao locus CRISPR. Na fase de expressão, o locus CRISPR é transcrito, produzindo assim um RNA precursor (precrRNA), que será processado liberando pequenos fragmentos (crRNAs). Os crRNAs maduros levarão a clivagem do DNA exógeno, em uma próxima tentativa de invasão, por meio da formação de complexos com proteínas Cas durante a fase de interferência (BHAYA et al., 2011).

Na prática, o modelo mais simples do sistema CRISPR está relacionado à modificação de uma ou poucas bases em genes com relação alélica bem definida. É importante salientar que esta relação de dominância mendeliana deve ser considerada para que se atinja a função gênica, tanto para ativá-la, quanto para inibi-la. Entretanto, modificações em mais de um alelo também têm sido obtidas com sucesso (JAO et al., 2013).

Os dois componentes para o sistema são a proteína Cas9 e um RNA-guia (gRNA). A nuclease Cas9 é direcionada por uma pequena sequência de RNA que reconhece o DNA-alvo por complementaridade, tornando-o acessível à ação da Cas9 (MAGGIO e GONÇALVES, 2015). O gRNA é uma molécula sintética com 100 nucleotídeos, dos quais, aproximadamente, os 20 primeiros compõem o sítio de segmentação. A extremidade 3' forma uma estrutura que interage com a proteína Cas9 (JINEK et al., 2012). Sendo assim, ambos atuam na identificação de sequências de DNA complementares ao gRNA, de forma a gerar uma ruptura de DNA de duas vertentes (DSB). Quando um DSB de DNA ocorre em células eucarióticas, o mecanismo de reparo

impreciso, pode resultar na inserção e/ou na deleção de sequências no local de quebra, o que implica tipicamente mutações de deslocamento de quadros (MLADENOV, 2011). Nas plantas, tais DSBs direcionados podem ser usados para eliminar genes (CURTIN, 2011; OSAKABE 2010), modificar a expressão gênica ao interromper as sequências do promotor (LI, 2012), ou inserir genes em um local específico por meio de recombinação homóloga (ZHANG, 2013; D'HALLUIN, 2013).

3 Aplicação da técnica na cultura da soja

Diversas culturas de interesse agrícola têm sido estudadas, empregando-se esta técnica, dentre as quais: milho, sorgo, trigo, tomate, laranja, arroz e soja. Na cultura da soja, um dos empregos do CRISPR/Cas9 está voltado para a inativação de proteínas antinutricionais, como as inibidoras de tripsina, que dificultam a digestão. Outras pesquisas têm sido direcionadas para a obtenção de variedades ricas em ácido oleico, que possui melhores características nutricionais, além de conter propriedades emolientes que são de interesse para as indústrias de cosméticos e de biocombustíveis.

A tecnologia CRISPR poderá ainda ser utilizada na cultura de soja, em diversas aplicações, como no incremento de fatores visando à tolerância à seca, na melhoria da composição do óleo, na semente e na tolerância a herbicidas. Associada aos avanços recentes na cultura de tecidos vegetais, as perspectivas são de modificações em genótipos comercialmente relevantes. Assim, esta poderosa combinação de tecnologias possibilita evolução nas técnicas de melhoramento, minimizando o tempo de obtenção dos genótipos e aumentando a qualidade dos mesmos. A variação gerada através dessas abordagens de melhoramento avançadas pode ser indistinguível da variação natural; sendo assim, deve ser facilmente acessível e detectável na comercialização dos genótipos. A precisão, o alcance e a flexibilidade oferecidos pelo CRISPR/Cas9 prometem uma atuação importante para a edição do genoma em futuros programas de melhoramento genético de plantas (CHILCOAT et al., 2017).

Referências

BHAYA, D.; DAVISON, M.; BARRANGOU, R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. **Annual review of genetics**, v. 45, p. 273-297, 2011.

BORTESI, L.; FISCHER, R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 1, p. 41-52, 2015.

CHILCOAT, D.; LIU, Z.; SANDER, J. Use of CRISPR/Cas9 for Crop Improvement in Maize and Soybean. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. 2017.

CURTIN, S.J.; ZHANG, F.; SANDER, J.D.; HAUN, W.J.; STARKER, C.; BALTES, N.J. et al. Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases. **Plant Physiology**. 2011.

D'HALLUIN, K.; CHANTAL, V.; JOLIEN, V.H.; JOANNA, R.; ILSE, V.D.B.; ANOUK, P. et al. Targeted molecular trait stacking in cotton through targeted double-strand break induction. **Plant Biotechnology**. 2013.

Departamento de Agricultura dos Estados Unidos – USDA <<https://www.fas.usda.gov/commodities/soybeans>> Acesso em: 9 mar. 2018.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6.213, p. 1.258.096, 2014.

EMBRAPA, 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/xxi-ciencia-para-a-vida/busca-de-noticias/-/noticia/24428648/editor-de-genes>. Acesso em: 25 fev. 2018.

GILLMAN, J.D.; KIM, W.S.; KRISHNAN, H.B. Identification of a New Soybean Kunitz Trypsin Inhibitor Mutation and Its Effect on Bowman–Birk Protease Inhibitor Content in Soybean Seed. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 63, n. 5, p. 1.352-1.359, 2015.

HSU, P.D.; LANDER, E.S.; ZHANG, F. **Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering**. 2014.

JAO L.E.; WENTE, S.R.; CHEN, W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 2013.

JINEK, M.; CHYLINSKI, K.; FONFARA, I.; HAUER, M.; DOUDNA, J.A.; CHARPENTIER, E. Aprogrammable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**. 2012.

LI, T.; LIU, B.; SPALDING, M.H.; WEEKS, D.P.; YANG, B. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. **Nature Biotechnology**. 2012.

MAGGIO, I.; GONÇALVES, M. A. F. V - Genome editing at the crossroads of delivery, specificity, and fidelity. **Trends in Biotechnology**. 2015.

MLADENOV, E.; ILIAKIS, G. Induction and repair of DNA double strand breaks: The increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. 2011.

OSAKABE, K.; OSAKABE, Y.; TOKI, S. Site-directed mutagenesis in Arabidopsis using custom-designed zinc finger nucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 2010.

RICHTER, C.; CHANG, J.T.; FINERAN, P.C. Function and regulation of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / CRISPR associated (Cas) systems. **Viruses**. 2012.

RICHTER, H.; RANDAU, L.; PLAGENS, A. Exploiting CRISPR/Cas: interference mechanisms and applications. **International Journal Molecular Science**. 2013.

SANDER, J.D.; JOUNG, J.K. - CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting. **Nature Biotechnology**. 2014.

ZHANG, Y.; ZHANG, F.; LI, X.H.; BALLER, J.A.; QI, Y.P.; STARKER, C.G. et al. Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. **Plant Physiology** 2013.