

TÓPICOS ESPECIAIS EM GENÉTICA APLICADA

Volume 6

Coordenadores:

Amanda Cristina Baldassi

Carlos Henrique Caprio

Janete Aparecida Desidério

Nestor Darío Franco Marulanda

ISBN: 978-85-7805-186-0



9 788578 051860



Coordenação

Amanda Cristina Baldassi

Carlos Henrique Caprio

Janete Aparecida Desidério

Nestor Darío Franco Marulanda

TÓPICOS ESPECIAIS EM GENÉTICA APLICADA

Volume 6

Funep

Jaboticabal - SP

2019

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

ISBN 978-85-7805-186-0

T674 Tópicos especiais em genética aplicada / Editores Amanda Cristina Baldassi ... [et al.]. -- Jaboticabal : Funep, 2019
v. 6, iv, 132 p. : il.

Inclui bibliografia
ISBN 978-85-7805-186-0

1. Genética. 2. Melhoramento. 3. Genômica. 4. Biologia molecular. 5. Genética Quantitativa. I. Baldassi, Amanda Cristina. II. Título.

CDU 575

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Jaboticabal/SP - Karina Gimenes Fernandes - CRB 8/7418

2019

**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>



abdr
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE
DIREITOS REPROGRÁFICOS

PREFÁCIO

O Curso de Inverno de Genética chega a sua 15^a edição para celebrar uma história de muitas conquistas e sucesso. Tradicionalmente, o curso é ofertado pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/UNESP), sendo reconhecido e prestigiado por participantes de diversas partes do País. Ele é organizado e dirigido 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 objetivo do evento é discutir, debater e difundir o conhecimento científico através dos temas mais diversos e atuais relacionados à área da genética, tais como biologia molecular, melhoramento, inovações e técnicas aplicadas a todos os organismos, a diversas "ômicas" e à bioinformática. O evento ainda apresenta, desde sua 10^a edição, o livro "Tópicos Especiais em Genética", que é composto por capítulos elaborados pelas equipes responsáveis por ministrar os minicursos oferecidos ao longo do evento, com o intuito de aprimorar o conhecimento técnico-científico discutido durante o curso.

A obra, que é elaborada desde 2014, já está em seu 6^o volume e dá continuidade ao trabalho realizado nas edições anteriores, cujos tópicos abordados tiveram grande receptividade dos participantes. Dessa forma, o livro busca abordar temas significativos e atuais em uma linguagem objetiva e de fácil compreensão para a disseminação do conhecimento científico acerca de pesquisas recentes na área da genética. O conteúdo apresentado nesta edição está relacionado à genética quantitativa, filogenia, marcadores moleculares, fitopatologia e defesa antioxidante, engenharia genética, além de diferentes tipos de PCR, resistência e melhoramento genético.

O Curso de Inverno de Genética é fruto da união, apoio e 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, desde a 1^a edição, não medem esforços para sua realização. Ficamos imensamente gratos pela colaboração de todos. Também não podemos deixar de agradecer à direção da FCAV/UNESP, à FUNEP, pelo apoio ao evento e, em especial, à Comissão Organizadora do 15^o Curso de Inverno de Genética, pelo empenho, parceria e comprometimento no desenvolvimento de mais um trabalho admirável.

Coordenação do Curso de Inverno de Genética 2019

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

SUMÁRIO

Capítulo I. Introdução à Genética Quantitativa	5
Capítulo II. Filogenia molecular: aplicações e possibilidades....	16
Capítulo III. Marcadores moleculares aplicados no melhoramento de plantas.....	27
Capítulo IV. Ferramentas de análise molecular e sua aplicação na fitopatologia	39
Capítulo V. Princípios e Aplicações da PCR em Tempo Real Quantitativa Absoluta, HRM (<i>High Resolution Melting</i>) e LAMP (<i>Loop Mediated Isothermal Amplification</i>).....	51
Capítulo VI. Resposta antioxidante de defesa na interação planta-patógeno.....	63
Capítulo VII. Novas Moléculas Bacterianas para o manejo de resistência de Pragas Agrícolas.....	77
Capítulo VIII. Práticas de manejo, resistência genética e identificação molecular de fitonematoides.....	89
Capítulo IX. <i>Bremia lactucae</i> : o míldio da alface e seus impactos no melhoramento genético da cultura	102
Capítulo X. <i>Lambda-Red</i> : Engenharia genética sítio-dirigida para <i>knockout</i> gênico em <i>Salmonella</i> spp.	114
Capítulo XI. Biotecnologias genéticas aplicadas ao melhoramento de peixes	122

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO À GENÉTICA QUANTITATIVA

Baltasar Fernandes Garcia Neto

Ivan Carvalho Filho

Maurício Gatti

Rafael Nakamura Watanabe

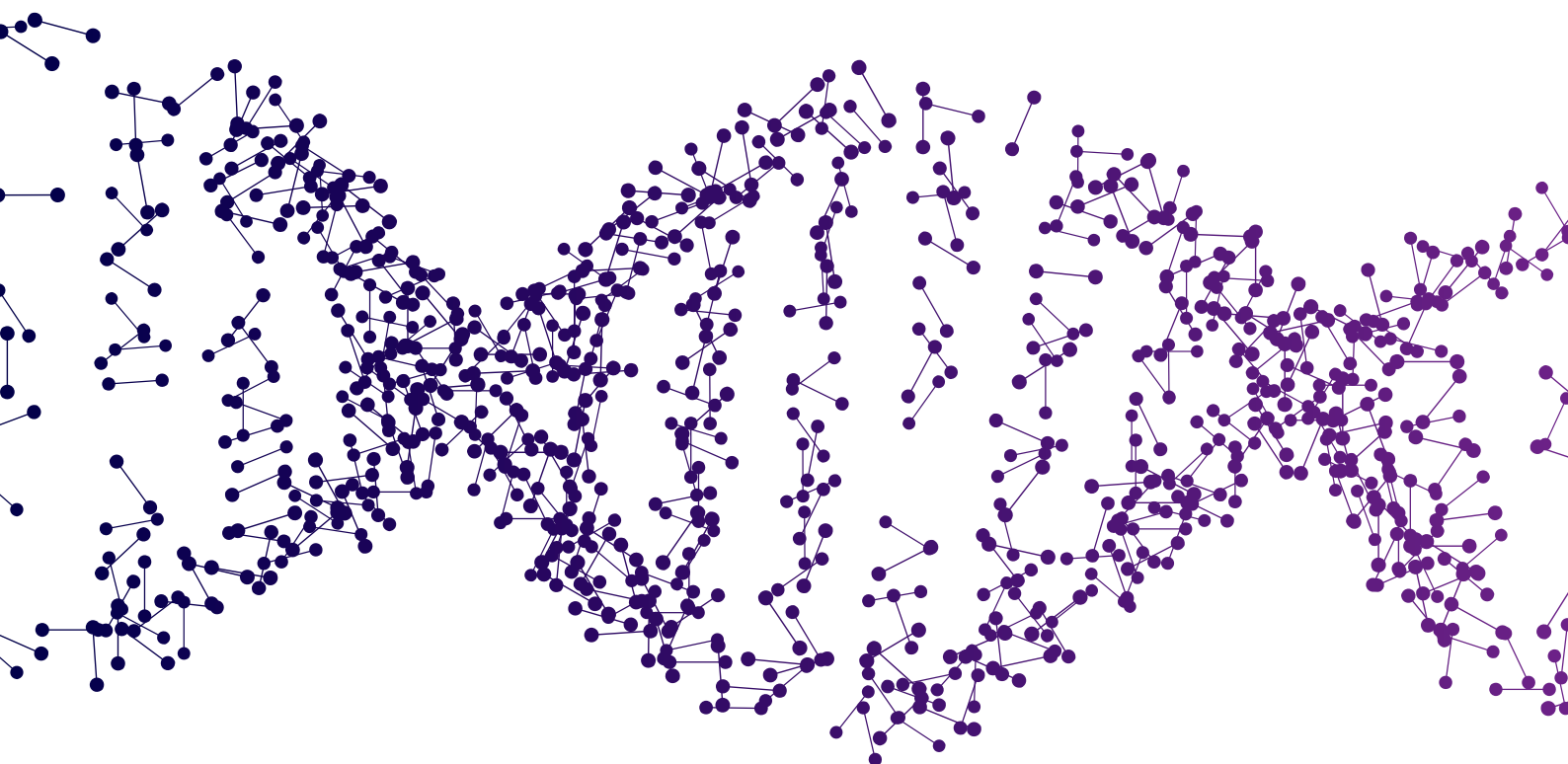
Samla Marques Freire Cunha

Danísio Prado Munari



CONTEÚDO

1	Introdução	7
2	Frequências Alélicas e Genotípicas	7
3	Teorema do Equilíbrio Hardy-Weinberg (HW)	7
3.1	Mudanças no Equilíbrio de HW	8
4	Variância Contínua	8
5	Valores e médias	9
6	Variância.....	10
6.1	Componentes Genéticos de Variância.....	10
6.2	Componente ambiental de variância.....	11
7	Repetibilidade.....	11
8	Herdabilidade	11
9	Seleção	13
9.1	Resposta à seleção	13
9.2	Diferencial de seleção e intensidade de seleção.....	13
9.3	Intervalo de gerações	14
9.4	Métodos de seleção	14
	Referências	15



1 INTRODUÇÃO

Este capítulo abordará de forma breve alguns conceitos importantes na genética quantitativa. A genética quantitativa tem por objetivo entender os mecanismos de herança entre indivíduos que são fundamentais para estudos de evolução e melhoramento genético. As características quantitativas, geralmente, são controladas por vários pares genes, são estudadas a um nível representativo de população e descritas por parâmetros tais como média, variância e covariância. As características quantitativas são as que possuem variação contínua e parcialmente de origem não genética, ou seja, influenciadas também pelo ambiente.

2 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS

Para descrever a constituição genética de um grupo de indivíduos, devemos especificar as proporções dos alelos de determinado gene e suas combinações. Em um organismo diploide, um locus autossômico, com dois alelos, temos: indivíduos homozigotos (A_1A_1 ou A_2A_2) e heterozigotos (A_1A_2). Com isso, podemos ter várias percentagens de frequência (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência alélica e genotípica em uma população.

População				
Genótipos	A_1A_1	A_1A_2	A_2A_2	Total
No. Animais	D	H	R	N
No. Alelos	2D	2H	2R	2N

$f(A_1A_1)$ = número de genótipos " A_1A_1 "/número total de genótipos (N)

No caso da frequência alélica, temos por exemplo a de A_1 , que é a proporção de todos os alelos A_1 :

$f(A_1)$ = número de alelos " A_1 "/número total de alelos (2N)

Neste caso, o número de alelos para A_1 é igual a $2D + H$.

3 TEOREMA DO EQUILÍBRIO HARDY-WEINBERG (HW)

Teorema básico da genética de populações, demonstrado em 1908 e tendo como ideia fundamental que os princípios mendelianos da herança podem ser facilmente observados se a população se reproduz ao acaso. Em uma grande população que se reproduz em acasalamento aleatório, as frequências alélicas e genotípica permanecem constantes, nas gerações seguintes, dado que não ocorra seleção, mutação e migração. Com isso, uma população é dita em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Suponha uma população grande, em que p é a proporção do alelo A e q é a proporção do alelo a dos pais, sendo a soma de $p + q = 1$, temos, depois de uma geração de acasalamento ao acaso, as seguintes frequências dos genótipos da progênie:

Tabela 2. Frequência genotípica de uma progênie oriunda de uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Genótipo	Frequência
AA	p^2
Aa	$2pq$
aa	q^2

3.1 Mudanças no Equilíbrio de HW

Alguns dos fatores podem causar mudanças no Equilíbrio de HW, tais como: tamanho da população, sistema de acasalamento, migração, mutação, diferença entre fertilidade e viabilidade e seleção. É necessário que o tamanho da população seja representativo, e pequenas populações podem ter a frequência dos alelos levada a zero ou a um. Uma vez obedecido esse aspecto, os demais fatores devem ser considerados.

O sistema de acasalamento aleatório (pan-mixia), que é explicado como um indivíduo ter a mesma chance de acasalar-se com outro indivíduo da mesma população, é um fator importante para o equilíbrio de HW. Na migração, pode haver alteração da frequência de um alelo, uma vez que se tem introdução ou exclusão de animais dentro de determinada população. A mutação irá levar à alteração no material genético de um indivíduo. Normalmente, quando um indivíduo tem seu material genético alterado, essa alteração leva à criação de novos alelos em uma população, e sendo esse animal um multiplicador, ele irá levar à disseminação desse novo alelo e com consequente alteração nas frequências p e q da população.

As diferenças entre a fertilidade dos reprodutores e entre a viabilidade das progênes podem influenciar na constituição genética das gerações seguintes. Pois os reprodutores vão contribuir de forma diferente nas taxas reprodutivas, e as progênes podem modificar o número de filhos por reprodutor, contribuindo de forma desigual para os gametas a partir dos quais a próxima geração será formada. Assim, as frequências alélicas na nova geração podem ser alteradas no momento em que os indivíduos são adultos e tornam-se pais.

Por fim, tem-se também a seleção, processo em que indivíduos são escolhidos para a formação da geração seguinte. Pode ser natural, em que indivíduos mais bem adaptados e com maior chance de sobrevivência ao meio se reproduzem; ou artificial, executada pelo homem, em que os animais são escolhidos devido a suas performances em características específicas e, posteriormente, são acasalados.

4 VARIÂNCIA CONTÍNUA

Variações contínuas são aquelas que acontecem de modo ininterrupto. Se, por exemplo, classificarmos uma classe de 20 alunos por suas alturas, o agrupamento de alunos em altos e baixos seria totalmente arbitrário e de modo

descontínuo. Características que apresentam este tipo de variação são chamadas de características contínuas e estão relacionadas a medidas e não a contagens.

A grande maioria das características de importância econômica, seja em plantas, seja em animais, apresenta variação contínua e, portanto, são estudadas pela genética quantitativa. Mas, se uma característica é influenciada por efeitos pontuais devido à segregação genética, como esta característica pode ser contínua? A segregação para estas características ocorre em muitos genes com efeitos bem pequenos. Dessa forma, torna-se impossível distinguir todas as classes, transformando a descontinuidade pontual em uma variação contínua. São exemplos de características contínuas: peso em quilogramas, altura em centímetros, produção de leite em litros, etc.

5 VALORES E MÉDIAS

Os valores das mensurações são expressos em unidades de medidas. Quando um valor é mensurado em um indivíduo, este valor é chamado de **valor fenotípico**. Para se identificar os componentes genéticos do valor fenotípico, este pode ser decomposto pela equação: $P = G + E$, em que **P** é o valor fenotípico, **G** o valor genotípico e **E** o valor ou desvio ambiental. Em sucessivas gerações e assumindo valor nulo para o desvio ambiental, podemos inferir que o valor fenotípico é igual ao valor genotípico, e a média da população é constante na ausência de mudanças genéticas. Concluímos, então, que a média da população para uma característica é ponderada pela frequência genotípica (Tabela 3).

Tabela 3. Assumindo as frequências dos alelos $p=0,6$ e $q=0,4$ e os valores $AA=10$, $Aa=5$ e $aa=2$. Temos que a média da população é **9,32**.

Genótipo	Valor Fenotípico	Frequência Genotípica	Frequência x Valor
AA	10	0,36	3,6
Aa	5	0,48	2,4
aa	2	0,16	0,32
Total		1,00	6,32

Vale ressaltar que os pais não transmitem seu valor genotípico para as próximas gerações. De fato, aqueles transmitem seus genes que irão compor o genótipo da progênie. Por isso, uma medida diferente deve ser aplicada para que possamos associar um valor aos genes portados pelos pais e que poderão ser transmitidos para os filhos. Esse valor é conhecido como **valor genético**. O valor genético consiste no mérito genético do indivíduo e espera-se que este valor seja a média do valor genético de seus pais. O valor genético é importante para a seleção artificial e pode ser calculado a partir de informações de diversas fontes, como do próprio animal, dos pais, filhos e dos outros ancestrais. Outro

conceito importante é a **diferença esperada na progênie (DEP)** que consiste na metade do valor genético do pai, sendo a diferença esperada entre o desempenho médio da progênie do pai e o desempenho médio de todas as progênies, assumindo que o acasalamento foi ao acaso. A DEP é utilizada para classificar os animais em uma população de acordo com seu potencial genético para determinada característica.

6 VARIÂNCIA

A quantidade de variação de uma característica é medida e expressa em termos de variância. O valor total da variância de uma característica é a variância fenotípica ou variância dos valores fenotípicos. Essa pode ser dividida em componentes genéticos e ambientais. O componente de variância genético é a soma dos componentes de variância aditiva (σ_A^2), dos desvios devido à dominância (σ_D^2) e dos desvios devido à interação epistática (σ_I^2). Os componentes de variância estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Componentes de variância.

Componente de variância	Símbolo	Valor do qual a variância é medida
Fenotípica	σ_P^2	Valor fenotípico
Genotípico	σ_G^2	Valor genotípico
Aditivo	σ_A^2	Valor genético aditivo
Dominância	σ_D^2	Desvios devido à dominância
Interação	σ_I^2	Desvios devido à interação epistática
Ambiental	σ_E^2	Desvios devido ao ambiente

6.1 Componentes Genéticos de Variância

O principal componente genético de variância, a aditiva (σ_A^2), é a variância referente aos valores genéticos, é a causa principal da semelhança entre parentes, o maior determinante das propriedades genéticas observadas em uma população e é o que responde à seleção em uma população. Além disso, é o único componente que pode ser estimado a partir de observações feitas em uma população. Sendo assim, a variância fenotípica pode ser dividida em variância genética aditiva (σ_A^2), variância genética não aditiva (σ_D^2 e σ_I^2) e variância ambiental (σ_E^2).

A variância causada pelos desvios de dominância refere-se às interações *intra locus*, ou seja, às interações que ocorrem entre os alelos do mesmo gene. A variância total, devido aos desvios de dominância, é a soma das variâncias dos desvios de dominância de cada *locus*, separadamente.

A variância devido aos desvios de interação epistática refere-se às interações epistáticas entre os alelos de diferentes genes, ou seja, as interações *inter loci*. A ocorrência de interações epistáticas controlando características quanti-

tativas é comum, porém estimar essa variância não é fácil, e interações como essa, envolvendo um grande número de genes, contribuem muito pouco para a variância e, por isso, podem ser ignoradas.

6.2 Componente ambiental de variância

A variância devido ao ambiente está relacionada a toda variância não genética. Podem ser considerados não genéticos os fatores climáticos e nutricionais, efeito materno principalmente em mamíferos, erro de medida principalmente para características que são divididas em classes, em suas avaliações. Além desses fatores, temos os de variação intangível, os quais não conhecemos, mas podem afetar a expressão das características, como exemplo: circunstâncias do meio, ou seja, tudo aquilo que é exterior ao indivíduo e variação de desenvolvimento, relacionado a problemas com formação e desenvolvimento do animal.

7 REPETIBILIDADE

Características que podem ser medidas várias vezes em um mesmo animal, contribuem para explicar as causas da variância ambiental dentro de um mesmo indivíduo e entre indivíduos. O componente de variação dentro de indivíduos, refere-se a desempenhos sucessivos de um mesmo indivíduo, causado por diferenças temporárias de ambiente. O componente de variação entre indivíduos é parcialmente causado por variações genéticas e variações permanentes de ambiente.

A repetibilidade (r) de determinada característica mede a correlação entre medidas repetidas de determinado caráter no mesmo indivíduo, em que a variância de ambiente geral (σ_{Eg}^2), referente à variação de ambiente entre indivíduos, somada à variância genética (σ_G^2), é dividida pela variação fenotípica total (σ_P^2), conforme demonstrado a seguir:

$$r = \frac{\sigma_G^2 + \sigma_{EG}^2}{\sigma_P^2}$$

A repetibilidade pode variar devido ao tipo de característica avaliada, à composição genética da população e às condições de ambiente ao qual os indivíduos são submetidos.

8 HERDABILIDADE

A herdabilidade pode ser definida, em termos estatísticos, como a fração da variância fenotípica causada pela variação dos valores genéticos aditivos ou como a regressão dos valores genéticos em função dos valores fenotípicos:

$$h^2 = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_P^2} \quad \text{ou} \quad h^2 = b_{AP}$$

em que h^2 é a herdabilidade da característica; σ_A^2 é a variância genética aditiva da característica; σ_P^2 é a variância fenotípica da característica; b_{AP} é a regressão dos valores genéticos em função dos valores fenotípicos.

Para a predição do valor genético aditivo (soma dos efeitos médios dos genes que o indivíduo carrega), pode-se utilizar da multiplicação do valor fenotípico pela herdabilidade: $A_{(esperado)} = h^2P$, em que A é o valor genético e P é expresso como desvio da média da população e acurácia, que é a estimativa do coeficiente de correlação entre o valor genético, e o valor fenotípico pode ser obtido por meio de:

$$r_{A,P} = \sqrt{h^2}$$

As estimativas de herdabilidade podem ser obtidas de diferentes maneiras: pela regressão do valor fenotípico da progênie sobre a média dos pais, pela regressão do valor fenotípico da progênie sobre um progenitor, pela semelhança entre irmãos e por estimativas combinadas.

Já a precisão das estimativas de herdabilidade é afetada pelo erro padrão da regressão ou da correlação pela qual a herdabilidade foi estimada. Geralmente, este erro padrão é alto, e para tentar reduzi-lo, aumenta-se o número de informações para o cálculo da herdabilidade. Porém, é necessário levar em consideração o espaço disponível, o custo para coleta dos dados e o valor da mão de obra utilizada. Nota-se que, quanto maior o número de indivíduos por família e menor o número de famílias na população, maior será a precisão da herdabilidade.

As estimativas de herdabilidades podem variar de 0,0 a 1,0. Estimativas baixas significam que grande parte da variação da característica é devido às diferenças ambientais ou não aditivas entre os indivíduos. Estimativas altas significam que as diferenças genéticas aditivas que ocorrem entre os indivíduos é que são responsáveis pela variação da característica estudada. Sendo alta, pode significar também que a correlação entre o valor genético e o valor fenotípico também é alta; portanto, o valor fenotípico constitui boa indicação do valor genético do indivíduo.

É importante observar que a herdabilidade não é apenas a propriedade de uma característica, mas também de uma população, das circunstâncias ambientais a que os indivíduos estão submetidos e do modo como o fenótipo é medido. Uma vez que a estimação da herdabilidade depende da magnitude de todos os componentes de variância, uma mudança em qualquer deles poderá afetá-la. Toda vez que um valor for estimado para a herdabilidade, é necessário entender que esse se refere a uma população particular sob condições específicas.

Em um programa de seleção, a estimação da herdabilidade é fundamental, pois maiores estimativas podem indicar a possibilidade de maior ganho genético, por meio da seleção, para as características desejadas.

9 SELEÇÃO

A seleção artificial consiste na escolha dos animais que serão pais da próxima geração. Ao se selecionar animais superiores, esta faz com que ocorra mudanças na frequência alélica da população. A escolha destes animais depende do objetivo de seleção, ou seja, o que se deseja alcançar em termos de produtividade em determinada população. A genética quantitativa auxilia a seleção destes animais, quantificando o valor genético de cada animal, assim como outros parâmetros genéticos para que a seleção seja feita de maneira mais acurada possível, além de prever resultados de maneira que diferentes esquemas reprodutivos possam ser comparados.

9.1 RESPOSTA À SELEÇÃO

As mudanças decorrentes da seleção são denominadas de resposta à seleção, e essas mudanças são observadas na média da população e simbolizadas por R , sendo a diferença da média fenotípica entre os filhos dos pais selecionados e da população total pertencente à geração destes pais. A medida de seleção aplicada é a superioridade média dos pais selecionados, denominada de diferencial de seleção e simbolizada por S , sendo esta a média fenotípica dos indivíduos pais selecionados expressa como desvio da média de toda a população. A equação geral para o cálculo da resposta à seleção é dada por:

$$R = h^2 S$$

sendo, h^2 a herdabilidade da característica.

9.2 DIFERENCIAL DE SELEÇÃO E INTENSIDADE DE SELEÇÃO

O diferencial de seleção pode ser predito se duas condições forem atendidas. A característica selecionada deve apresentar distribuição normal, e a seleção dos indivíduos deve ser seguida em ordem de mérito pelos seus valores fenotípicos. O desvio-padrão é uma propriedade da característica e da população, e sua unidade é expressa pela unidade da característica, a resposta à seleção pode ser generalizada se o diferencial de seleção é expresso em termos de desvio-padrão fenotípico, sendo denominado de intensidade de seleção (i). Portanto, a equação de resposta à seleção pode ser escrita como:

$$R = i h \sigma_p$$

em que σ_p , é o desvio-padrão fenotípico.

Os fatores que limitam o aumento da intensidade de seleção são: (a) a taxa reprodutiva dos animais, pois a proporção selecionada para reprodução não pode ser menor do que a taxa de reposição e (b) tamanho da população e endogamia.

9.3 INTERVALO DE GERAÇÕES

O intervalo de gerações (i.g) é definido pela média da idade dos pais quando nascem os filhos selecionados. Portanto, o cálculo da resposta à seleção por ano expressa-se como:

$$\frac{R}{ano} = \frac{i\sigma_p h^2}{i.g}$$

9.4 MÉTODOS DE SELEÇÃO

O interesse usual do melhorista é a seleção simultânea de várias características e não apenas uma característica como critério de seleção, portanto a seleção deve ser direcionada para características de importância econômica. Na literatura, a seleção para várias características, é comumente citada de dois métodos: (a) níveis independentes de descarte e (b) índice de seleção.

a) Níveis independentes de descarte

Neste método, o animal deve atingir níveis mínimos preestabelecidos pelo melhorista para cada característica selecionada. Caso o animal não atinja o nível mínimo estabelecido para cada uma das características selecionadas, este não será considerado na seleção. Este método provoca decréscimo na intensidade de seleção em cada característica individual. Enquanto a quantidade de característica na seleção aumenta, há uma redução na intensidade de seleção, na razão $\frac{1}{\sqrt{n}}$.

b) Índice de seleção

Nesse método, as características de interesse recebem um peso que depende de sua importância econômica, então essas são agrupadas em um índice. Cada animal possuirá um índice, posteriormente esses animais são ranqueados, e os que alcançarem as primeiras posições no ranking serão os mais utilizados na reprodução.

REFERÊNCIAS

ELER, J. P. **Teorias e métodos em melhoramento genético animal: I bases do melhoramento genético animal**. Pirassununga, 2014.

FALCONER, D.S. **Introduction to Quantitative Genetics**: 3. ed. London: Longman Group Corp. 1981.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**: 4. ed. Harlow: Longman, 1996.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**: 1 ed. Sunderland: Sinauer, 1998.

LOPES, P. S. **Teoria do melhoramento animal**. 1. ed. Belo Horizonte: FEPM-VZ, 2005.

PEREIRA, J. C. C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**: 4. ed. Belo Horizonte: FEPMZ Editora, 2004.

CAPÍTULO II

FILOGENIA MOLECULAR: APLICAÇÕES E POSSIBILIDADES

Fernanda Gomes Rodrigues

Guilherme Camara Seber

Hugo Dolsan de Freitas

Nestor Darío Franco Marulanda

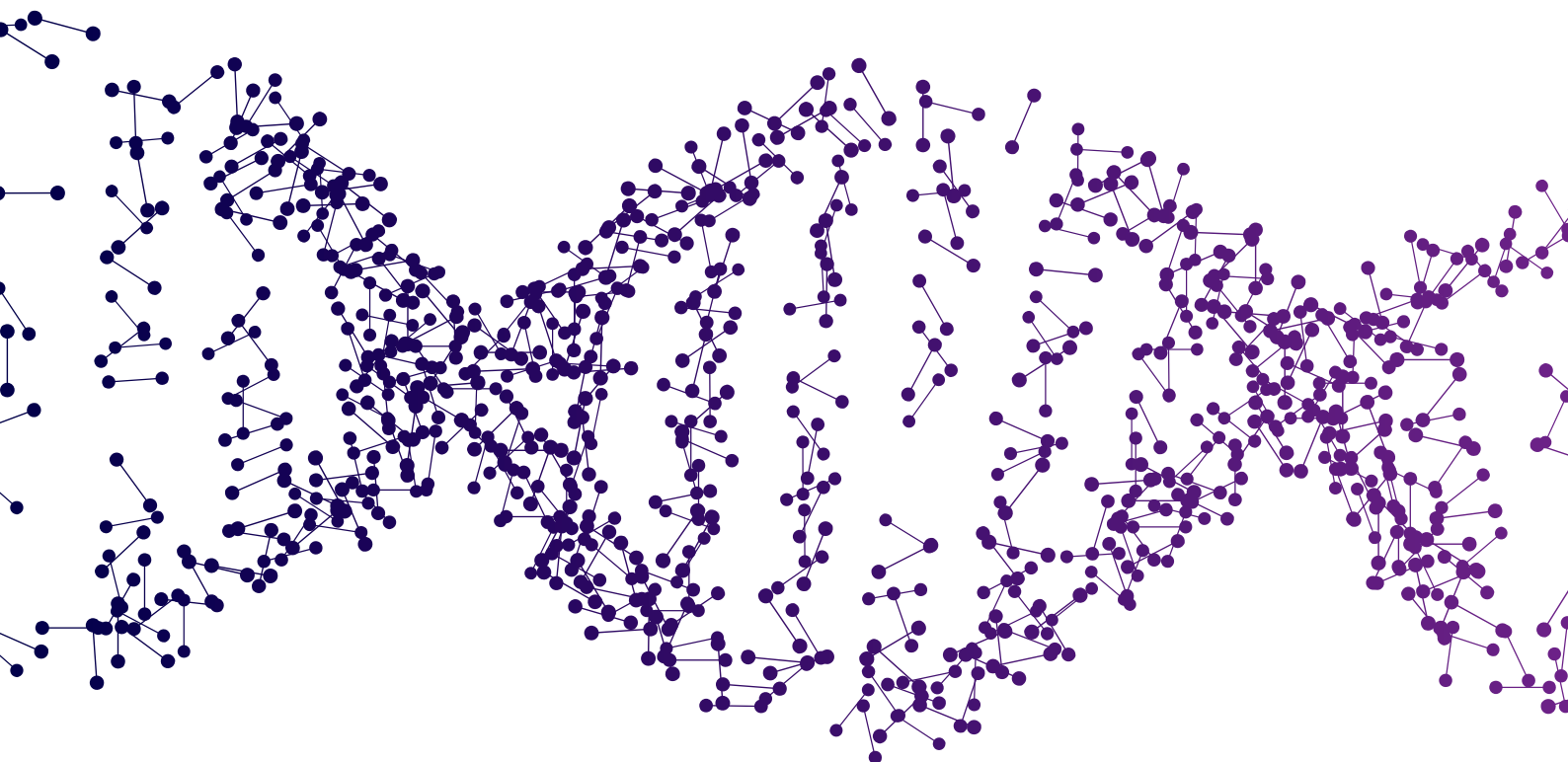
Saura Rodrigues da Silva

Vitor Fernandes Oliveira Miranda



CONTEÚDO

1	Introdução	18
2	Filogenia de táxons	18
3	Filogenia de genes	19
4	Árvores de coespeciação.....	20
5	Filogenia na ecologia.....	21
6	Considerações finais.....	22
	Referências	23



1 INTRODUÇÃO

A sistemática filogenética, como proposta por Willi Hennig (HENNIG, 1950; 1966), surgiu com a necessidade de se incorporarem relações evolutivas numa proposta metodológica explícita à taxonomia. Com essa proposta, as relações genealógicas são obtidas a partir da análise dos caracteres homólogos entre os grupos taxonômicos. Entretanto, com a difusão do sequenciamento de dados moleculares em meio aos anos de 1970, em razão dos avanços tecnológicos e de menores custos, vemos atualmente uma explosão de dados genômicos (*big data*; PAPAGEORGIOU, 2018; WONG, 2019) que nos possibilita inferir sobre as relações filogenéticas que podem ser compiladas e confrontadas com um grande conjunto de dados.

Desta forma, a filogenia molecular pode ser incorporada a outras áreas do conhecimento, refinando hipóteses que podem levar em conta informações multidisciplinares. Assim, a filogenia de táxons estabelece as relações de parentesco e pode conectar informações das espécies, com base em caracteres morfológicos, às informações moleculares (DNA, RNA ou proteínas, por exemplo), o que pode ter implicações em sua taxonomia. Por outro lado, a filogenia de genes pode contar histórias não somente de eventos de especiação dos táxons, mas também dos próprios genes ao longo do tempo. Indo além, árvores filogenéticas podem trazer informações de coespeciação, com as quais é possível inferir se espécies diferentes coevoluíram ao longo de suas histórias. Recentemente, ferramentas de filogenia molecular têm sido empregadas em estudos relacionados à diversidade ecológica e à conservação de espécies. Assim, a filogenia molecular alcança, hoje, dimensões que extrapolam seu emprego inicialmente proposto como uma ferramenta dentro da sistemática.

2 FILOGENIA DE TÁXONS

Etimologicamente, espécie (do latim *species* [*specere*], "vista, olhar") significa "parecer diferente", sendo que, principalmente após a influência do evolucionismo, começamos a entender que as espécies não são entidades propriamente concretas. Dentre os conceitos propostos para definir espécie, o conceito biológico como definido por Mayr (1963), em que espécies seriam grupos de populações naturais que se relacionam entre si e são reprodutivamente isoladas de outros grupos similares, apesar de amplamente utilizado, nem sempre pode ser aplicado para diversos grupos taxonômicos, principalmente em situações de espécies que se inter cruzam e que podem gerar espécies de origem híbrida. Neste contexto, as árvores filogenéticas podem auxiliar-nos a enxergar as relações de parentesco, identificar diferentes táxons e propor hipóteses de reticulação.

Atualmente aportada de diversas ferramentas computacionais, graças à bioinformática, a filogenia molecular de táxons ajuda-nos a tomar decisões imparciais e mais robustas quanto à análise de dados, sejam eles genéticos ou fenotípicos. Ao fornecer dados aos programas de filogenia, diferentes abordagens

podem gerar diferentes árvores filogenéticas, sendo importante escolher a mais apropriada de acordo com o objetivo do trabalho. Nesse aspecto, considerando os desafios inerentes ao *big data*, é possível aplicarmos métodos como o de supermatrizes e o de superárvores.

O método de supermatriz tem como protocolo unir todos os dados fornecidos em uma única matriz de dados e, a partir dela, gerar a árvore mais provável. Por outro lado, o método de superárvore consiste em analisar separadamente os diferentes conjuntos de caracteres (matrizes), gerar árvores para cada conjunto e, a partir dessas árvores, gerar uma árvore final com as características que levam sempre ao menor número de mudanças evolutivas, usando o princípio da parcimônia (QUEIROZ, 2006).

Ao escolher o modelo de supermatriz ou superárvore, devemos adotar uma abordagem para avaliar a(s) hipótese(s) filogenética(s). As mais comuns são: (1) máxima verossimilhança - que permite escolher dentre as árvores obtidas, aquela mais provável, dado o alinhamento (sequências de DNA ou proteínas) e o modelo evolutivo, e (2) inferência bayesiana - que emprega a abordagem bayesiana para analisar a probabilidade de cada árvore gerada ser verdadeira, analisando as probabilidades posteriores de cada clado, baseando-se na matriz de dados (alinhamento), dado o modelo evolutivo (QUEIROZ, 2006).

Além disso, a filogenia molecular de táxons permite inferir hipóteses que vão além do parentesco entre espécies: espécies novas podem ser reveladas e identificadas, por exemplo, com o uso da abordagem do DNA *barcoding*, na qual são empregadas sequências de DNA previamente estabelecidas como padrão (HEBERT et al., 2003).

3 FILOGENIA DE GENES

As análises filogenéticas são ferramentas úteis, não apenas para inferir relações genealógicas entre as espécies, mas também em pesquisas nas quais o objetivo é estudar genes de forma isolada e inferir sua história evolutiva no genoma de um organismo, em organismos diferentes ou até em diferentes populações (HILLIS, 1996). Estudos filogenéticos de famílias multigênicas permitem aumentar a compreensão dos processos evolutivos e o surgimento (e/ou perda) de genes em diferentes linhagens de organismos ao longo do tempo.

Genes parálogos, que são originados por processo de duplicação em pequena ou grande escala dentro do genoma (CONANT et al., 2014), podem adquirir novas funções e originar novos genes (CONANT; WOLFE, 2008), como no caso do grupo de proteínas globinas, que são proteínas globulares que fazem parte da hemoglobina. Estudos filogenéticos das cópias gênicas, baseados na estrutura conservada da proteína e sua presença em diferentes linhagens de seres vivos, permitiram sugerir que os diferentes genes evoluíram de um ancestral comum, sendo que após diversos processos de duplicação e de especiação deram origem aos genes da superfamília (HARDISON, 1998; MOLEIRINHO, 2015).

Nos genomas de plantas, algumas famílias multigênicas têm sofrido ex-

pansão do número de genes, enquanto outras mantiveram um número conservado devido à pressão de seleção (ARMISEN et al., 2008). Em *Eucalyptus grandis*, por exemplo, Li et al. (2015) estudaram famílias gênicas relacionadas a respostas aos estresses bióticos e abióticos, descrevendo o surgimento de cópias novas de genes espécie-específicos, que são importantes no processo adaptativo da espécie. Em vertebrados, o estudo de genes que codificam receptores de dopamina e modulam o sistema nervoso ajudou na compreensão da origem destes genes, ocorrida por eventos de duplicação genômica em ancestrais dos vertebrados (HAUG-BALTZELL et al., 2015). Além disso, em invertebrados, famílias multigênicas podem apresentar diferentes funções e perfis de expressão, permitindo explorar a diversidade e a história evolutiva de proteínas (BARON et al., 2016).

Um caso muito interessante de estudo dentro da filogenia de genes é a transferência horizontal, na qual há transmissão de genes de uma espécie para outra sem que haja reprodução sexuada, principalmente quando estas possuem alguma relação ecológica (KEELING; PALMER, 2008). Em plantas, foi verificado transferência horizontal de genes mitocondriais entre gêneros distantes de angiospermas, gerando novas cópias e ganhando genes perdidos pela transferência ao núcleo, além da formação de combinações quiméricas. Esse processo revela a importância da interação entre diferentes organismos e o impacto que podem ter os genes transferidos no acervo genético da espécie receptora (BERGTHORSSON et al., 2003).

4 ÁRVORES DE COESPECIAÇÃO

A coespeciação pode ser definida como especiação conjunta, entre duas ou mais linhagens de organismos, que são ecologicamente associadas, como, por exemplo por relações mutualísticas, parasíticas, simbióticas, entre outras (PAGE, 2003). Exemplos muito comuns desse processo são os de parasitas e seus hospedeiros (ex. HUGHES et al., 2007; MARTINU et al., 2018).

Uma das maneiras de determinarmos se há coespeciação entre organismos consiste na reconstrução de árvores filogenéticas robustas para os grupos e, após isso, na determinação da extensão da história evolutiva compartilhada entre os táxons. Porém, para isto, precisamos comparar as árvores geradas e empregar estatística para determinar se existe correlação entre as histórias filogenéticas (PAGE, 2003; HUGHES et al., 2007; MARTINU et al., 2018). É importante enfatizarmos que as inferências de coespeciação de organismos são primariamente desenvolvidas a partir de hipóteses de árvores filogenéticas; portanto, devem ser levadas em conta as limitações do método, como, por exemplo, a possibilidade de hibridização, transferência horizontal, taxas evolutivas diferentes entre genes, entre outros (para mais detalhes, ver SOM, 2014).

5 FILOGENIA NA ECOLOGIA

A diversidade - cerne da ecologia - é observada há muito tempo, dada a importância em se saber onde encontrar plantas e animais consumíveis para a sobrevivência. Com o passar do tempo, o conhecimento avançou na compreensão dos padrões de diversidade biológica e, hoje, sabemos que questões de importância social e política, como a extinção de espécies e de impactos ambientais, podem ser respondidas pela ecologia de comunidades (CIANCIA-RUSO, 2009). No entanto, o conceito ecológico de diversidade, além de não ter definição consensual formulada (RICOTTA, 2005), apresenta em seus índices tradicionais perda de informação quando se resume um grande conjunto de dados de uma comunidade.

Desta forma, medidas de diversidade que incorporem as relações filogenéticas, como a diversidade filogenética, têm-se mostrado mais sensíveis que as tradicionais. Nesse contexto, a medida de diversidade filogenética tem como premissa que a diversidade é maior em uma comunidade em que as espécies são filogeneticamente mais distantes, mesmo que haja traços ecológicos dominantes entre as linhagens (MAGURRAN, 2004; SRIVASTAVA et al., 2012). Por exemplo, se uma mudança ambiental substitui uma comunidade com espécies de diferentes gêneros por outra, em que a maioria pertença ao mesmo gênero, mantendo o mesmo número de espécies e distribuição de abundâncias, as análises tradicionais de diversidade não revelarão nenhum efeito da mudança sobre a comunidade. Da mesma forma, pode acontecer na substituição de uma comunidade na qual há diferentes vetores de polinização por outra que possua apenas um vetor para todas as espécies, entre outros casos (CIANCIA-RUSO, 2009). Nesses cenários, dentre outros, a estimativa da diversidade filogenética pode ser mais vantajosa.

Uma das medidas de diversidade filogenética mais usada é a idade do evento de especiação do ancestral comum mais recente, estimada pela diferença nos pares de bases de um gene neutro entre duas espécies (HARVEY; PAGEL, 1991). Proposta por Faith (1992), a primeira medida de diversidade filogenética, baseada na especiação, ficou conhecida como índice PD (*phylogenetic diversity*) e é obtida pela soma dos comprimentos dos ramos da árvore filogenética das espécies de uma comunidade. Há ainda métodos que consideram a topologia de uma filogenia pelo número de nós ou ligações em uma árvore filogenética (CLARKE; WARWICK, 1998).

Com base nessas premissas, Webb et al. (2002) propuseram um esquema para inferir mecanismos de coexistência contemporânea, no qual são levados em conta os traços funcionais na evolução da linhagem das espécies e os filtros ambientais dominantes, resultando em atração ou dispersão filogenética. Assim, podemos detectar, por exemplo, mudanças na estrutura da comunidade de plantas, interações evolutivas entre hospedeiros e parasitas, e análises de processos ecológicos que organizam a comunidade - como a competição entre as espécies e os filtros ambientais. Deste modo, estamos frente a uma nova fusão entre a Ecologia e a Evolução, uma unificação que tem dois objetivos: explicar os caminhos evolutivos que levaram à existência das espécies atuais e descrever

a história evolutiva que conduziu à ecologia dos dias de hoje (WESTOBY, 2006).

Além disso, estudos filogenéticos também possuem grande importância quando se trata da conservação dos ecossistemas. Para se inferir a importância de uma área e sua conservação, são levadas em conta, principalmente, a riqueza (número de espécies) e a taxa de endemismo (número de espécies que ocorrem apenas naquela região) (HERNÁNDEZ-QUIROZ et al., 2018). No entanto, a diversidade filogenética ainda é um parâmetro pouco utilizado, apesar de sua grande importância (FOREST et al., 2015).

Um fator que pode levar à especiação é a ocorrência de nichos vagos em determinado ecossistema (BURBRINK; PYRON, 2010), e levando em conta que espécies próximas tendem a ocupar nichos parecidos (FUTUYMA, 2010), a ocorrência de grupos taxonomicamente distantes tende a levar os ecossistemas a maior estabilidade, daí a importância da diversidade filogenética (CADOTTE et al., 2012). As análises filogenéticas são um instrumento indispensável para a compreensão da história evolutiva dos organismos, e levando em conta a importância de se priorizar áreas onde exista maior distância evolutiva entre as espécies para fins de conservação (VÁZQUEZ; GITTLEMAN, 1998), podemos dizer que filogenia e conservação são áreas intrinsecamente relacionadas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A necessidade de conhecermos a história evolutiva dos seres vivos e seus processos evolutivos tem sido beneficiada pelo desenvolvimento de ferramentas tecnológicas – tanto laboratoriais quanto computacionais. Assim, com o uso de caracteres moleculares, é possível a inclusão da perspectiva da filogenia molecular em análises taxonômicas, evolutivas e ecológicas com o potencial de aperfeiçoar ou sugerir hipóteses, além de testar problemas redefinidos.

Como consequência, vemos o avanço em diferentes áreas de estudo, como visto, no esclarecimento dos relacionamentos genealógicos de espécies, na evolução de genes, em estudos de coespeciação, interações ecológicas e até mesmo ao tomarmos decisões para a conservação de espécies, dentre outras possibilidades de aplicação. Dessa forma, as inferências obtidas podem refletir com maior precisão os processos evolutivos dos genes ou dos organismos, e os resultados podem ser incorporados ou comparados com outros tipos de análises e abordagens, com o objetivo de agregar mais informações biológicas para uma proposta mais defensável e robusta.

REFERÊNCIAS

ARMISEN, D.; LECHARNY, A.; AUBOURG, S. Unique genes in plants: specificities and conserved features throughout evolution. **BMC Evol Biol.** v. 8, p. 280, 2008.

BARON, O. L. et al. The LBP/BPI multigenic family in invertebrates: evolutionary history and evidences of specialization in mollusks. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 57, p. 20-30, 2016.

BERGTHORSSON, U. et al. Widespread horizontal transfer of mitochondrial genes in flowering plants. **Nature**, v. 424, n. 6.945, p. 197, 2003.

BURBRINK, F. T.; PYRON, R. A. How does ecological opportunity influence rates of speciation, extinction, and morphological diversification in New World ratsnakes (tribe Lampropeltini) **Evolution: International Journal of Organic Evolution**, v. 64, n. 4, p. 934-943, 2010.

CADOTTE, M. W.; DINNAGE, R.; TILMAN, D. Phylogenetic diversity promotes ecosystem stability. **Ecology**, v. 93, sp. 8, p. S223-S233, 2012.

CIANCIARUSO, M. V.; SILVA, I. A.; BATALHA, M. A. Diversidades filogenética e funcional: novas abordagens para a ecologia de comunidades. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 3, 2009.

CLARKE, K. R.; WARWICK, R. M. A taxonomic distinctness index and its statistical properties. **Journal of Applied Ecology**, v. 35, n. 4, p. 523-531, 1998.

CONANT, G. C.; BIRCHLER, J. A.; PIRES, J. C. Dosage, duplication, and diploidization: clarifying the interplay of multiple models for duplicate gene evolution over time. **Current Opinion in Plant Biology**, n. 19, p. 91-98, 2014.

CONANT, G. C.; WOLFE, K. H. Turning a hobby into a job: how duplicated genes find new functions. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n.12, p. 938, 2008.

FAITH, D. P. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. **Biological conservation**, v. 61, n. 1, p. 1-10, 1992.

FOREST, F.; CRANDALL, K. A.; CHASE, M. W.; FAITH, D. P. Phylogeny, extinction and conservation: embracing uncertainties in a time of urgency. **Philosophical Transactions**, v. 370, 2015.

FUTUYMA, D. J. Evolutionary constraint and ecological consequences. **Evolution: International Journal of Organic Evolution**, v. 64, n. 7, p. 1.865-1.884, 2010.

HARDISON, R. Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression. **Journal of Experimental Biology**. v. 201, n. 8, p. 1.099-1.117, 1998.

HARVEY, P. H.; PAGEL, M. D. **The comparative method in evolutionary biology**. Oxford: Oxford University, p. 239, 1991.

HAUG-BALTZELL, A.; JARVIS, E. D.; MCCARTHY, F. M.; LYONS, E. Identification of dopamine receptors across the extant avian family tree and analysis with other clades uncovers a polyploid expansion among vertebrates. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, p. 361, 2015.

HEBERT, P. D.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1.512, p. 313-321, 2003.

HENNIG, W. **Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematik**. Berlin: Deutscher Zentralverlag, 1950.

_____. **Phylogenetic Systematics**. Urbana: University of Illinois Press, 1966.

HERNÁNDEZ-QUIROZ, N. S.; BADANO, E. I.; BARRAGÁN-TORRES, F.; FLORES, J.; PINEDO-ÁLVAREZ, C. Habitat suitability models to make conservation decisions based on areas of high species richness and endemism. **Biodiversity and Conservation**, v. 27, n. 12, p. 3.185-3.200, 2018.

HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K. (eds) **Molecular Systematics**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1996.

HUGHES, J.; KENNEDY, M.; JOHNSON, K. P.; PALMA, R. L.; PAGE, R. D. M. Multiple Cophylogenetic Analyses Reveal Frequent Cospeciation between Pelecaniform Birds and *Pectinopygus* Lice. **Systematic Biology**, v. 56, n. 2, p. 232-251, 2007.

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

LI, Q. et al. Explosive tandem and segmental duplications of multigenic families in *Eucalyptus grandis*. **Genome biology and evolution**, v. 7, n. 4, p. 1.068-1.081, 2015.

MAGURRAN, A. E. **Measuring Biological Diversity**. Oxford: Blackwell, p. 256. 2004.

MARTINU, J.; HYPŠA, V.; ŠTEFKA, J. Host specificity driving genetic structure and diversity in ectoparasite populations: Coevolutionary patterns in *Apodemus* mice and their lice. **Ecology and Evolution**. n. 8, p. 10.008–10.022, 2018.

MAYR, E. **Animal species and evolution**. Harvard University Press; London: Oxford University Press, 1963.

MOLEIRINHO, A. et al. Distinctive patterns of evolution of the δ -globin gene (HBD) in primates. **PLoS ONE**, v. 10, n 4, p. e0123.365, 2015.

PAGE, R. D. M. **Tangled Trees. Phylogeny, Cospeciation and Coevolution**. Chicago: The University of Chicago Press, p. 350, 2003.

PAPAGEORGIOU, L. et al. Genomic big data hitting the storage bottleneck. **EMBnet. Jornal**, v. 24, 2018.

QUEIROZ, A.; GATESY, J. The supermatrix approach to systematics. **Elsevier-Trends in Ecology and Evolution**, v. 22, n. 1, p. 34-41, 2006.

RICOTTA, C. Through the jungle of biological diversity. **Acta Biotheoretica**, v. 53, n. 1, p. 29-38, 2005.

SOM, A. Causes, consequences and solutions of phylogenetic incongruence. **Briefings in Bioinformatics**, v. 16, n. 3, p. 536–548, 2015.

SRIVASTAVA, D. S.; CADOTTE, M. W.; MACDONALD, A. A. M.; MARUSHIA, R. G.; MIROTNICK, N. Phylogenetic diversity and the functioning of eco-systems. **Ecology Letters**, v. 15, n. 7, p. 637-648, 2012.

VÁZQUEZ, D. P.; GITTLEMAN, J. L. Biodiversity conservation: does phylogeny matter? **Current Biology**, v. 8, n. 11, p. R379-R381, 1998.

WEBB, C. O. et al. Phylogenies and community ecology. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 33, n. 1, p. 475-505, 2002.

WESTOBY, M. Phylogenetic ecology at world scale, a new fusion between ecology and evolution. **Ecology**, v. 87, sp7, p. S163-S165, 2006.

WONG, K. Big data challenges in genome informatics. **Biophysical reviews**, v. 11, n. 1, p. 51-54, 2019.

CAPÍTULO III

MARCADORES MOLECULARES APLICADOS NO MELHORAMENTO DE PLANTAS

Antonio Pizolato Neto

Júlia Godoy Alexandrino

Lígia de Oliveira Amaral

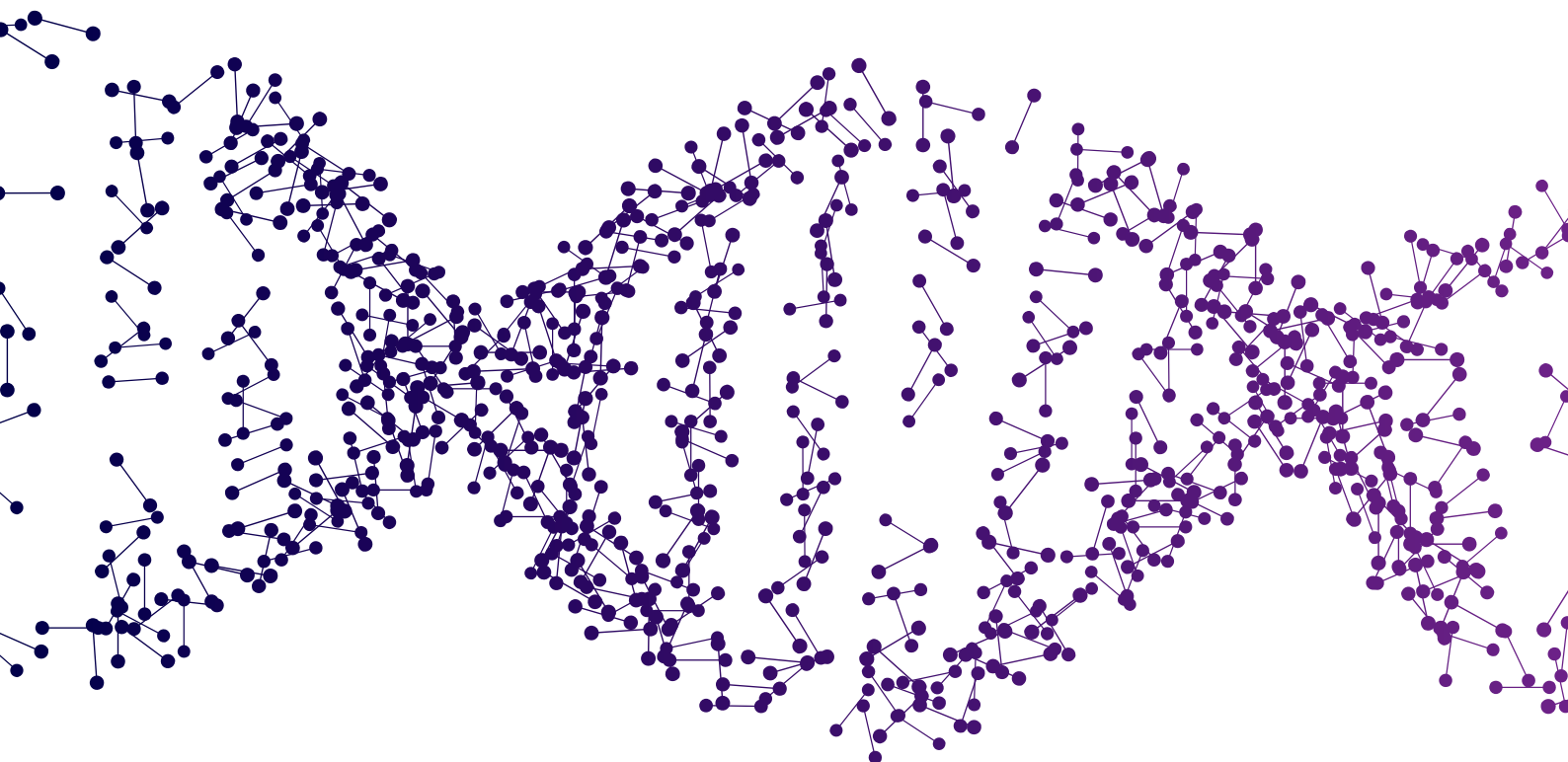
Lucas Berger Munaro

Sandra Helena Unêda-Trevisoli



CONTEÚDO

1	Introdução	29
2	RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>)	29
3	RAPD (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)	30
4	DArT (<i>Diversity Arrays Technology</i>)	31
5	SSR (<i>Simple Sequence Repeats</i>)	31
6	SNP (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)	32
7	Considerações Finais	33
	Referências	34



1 INTRODUÇÃO

Desde o início do século XX, grandes foram os esforços para desenvolver metodologias e implementar tecnologias que auxiliassem o melhoramento genético convencional e aumentassem sua precisão. Estes esforços culminaram na descoberta dos marcadores moleculares na década de 1980 (GUIMARÃES et al., 2009). Dentre as vantagens deste tipo de marcador, quando comparados aos marcadores fisiológicos, podemos mencionar, principalmente, a eficiência na seleção, pois possibilita a aproximação fenótipo/genótipo (RAMALHO; FURTINI, 2009) e a detecção de polimorfismos em todo o genoma. Esta técnica tem sido utilizada para vários fins, como a avaliação da diversidade genética e a escolha de genitores, caracterização (DNA *Fingerprinting*) e proteção de cultivares, análise de pureza genética em sementes, mapeamento de genes de características complexas, seleção assistida, entre outras. Algumas limitações do uso da técnica foram, em grande parte, sanadas pelo sequenciamento em alta escala e desenvolvimento de plataformas pelas quais é possível analisar milhares de marcadores (GUIMARÃES et al., 2009).

Com o intuito de apresentar uma breve síntese de alguns marcadores de importância para programas de melhoramento genético de plantas, serão discutidos os marcadores moleculares RFLP, RAPD, DArT, SSR e SNP.

2 RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*)

O RFLP, ou polimorfismos do comprimento dos fragmentos de restrição, foi uma das primeiras técnicas propostas com o intuito de detecção de polimorfismos entre diferentes genótipos. Essa técnica foi possível pelo desenvolvimento do *Southern Blot*, em 1975, por Edward Southern, possibilitando a transferência de fragmentos de DNA do gel de agarose para uma membrana de nitrocelulose, hibridizado com uma fita simples de ácido nucleico marcado radioativamente, que possibilitava a visualização por autorradiografia ou fluorografia (SOUTHERN, 1975). Com isso, Bolstein et al. (1980) propuseram essa primeira técnica de marcadores moleculares, capaz de detectar polimorfismos na sequência de DNA através da hibridização de uma sonda, a qual possui uma sequência de DNA conhecida, com fragmentos de DNA, digeridos por uma ou mais enzimas de restrição. É um marcador molecular baseado em hibridização, ou seja, a sequência de DNA de interesse é encontrada pelo pareamento da mesma com um fragmento de DNA de fita simples (sonda), marcado radioativamente.

A técnica RFLP pode ser resumida basicamente nos seguintes passos: 1) Isolamento do DNA de cada indivíduo; 2) Corte do DNA de cada indivíduo com uma ou mais enzimas de restrição; 3) Separação dos fragmentos de DNA por meio de eletroforese; 4) Transferência dos fragmentos de DNA para uma membrana de náilon ou de nitrocelulose (*Southern blot*); 5) Hibridização de um ou mais fragmentos desnaturados de DNA comum a sonda, que corresponde a um fragmento de DNA de cadeia simples complementar; 6) Fotografia do fragmento identificado pela sonda (BOLSTEIN et al., 1980; BORÉM; FRITSCHÉ-NETO,

2014).

Como vantagem desse marcador, pode-se mencionar sua robustez para análises genéticas, possui natureza codominante, fácil reprodutibilidade e alta especificidade da sonda com a sequência de interesse. Suas limitações estão no alto custo, na necessidade da utilização de sondas radioativas, pequenas quantidade de dados gerados comparado a outros marcadores, as dificuldades técnicas e operacionais, necessitando de muita habilidade e de conhecimento laboratorial para seu desenvolvimento (BORÉM; FRITSCHÉ-NETO, 2014).

3 RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

O RAPD é um marcador baseado na técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), tendo esta última revolucionado o uso dos marcadores, bem como sua aplicação. Baseia-se na utilização de *primers* de sequência aleatória, composto por 10 pares de bases, dispensando-se, assim, a necessidade de informação de sequência para a síntese do mesmo. Essa técnica consiste em extrair o DNA dos indivíduos a serem analisados e submetê-los às reações de amplificação, utilizando um iniciador de polimerização do DNA (*primer*) diferente, de cada vez. Um produto de amplificação é gerado para cada região cromossômica flanqueada por um par de sítios de iniciação, distanciada, no máximo, em 5kb uma da outra e na orientação apropriada. Indivíduos geneticamente distintos produzem diferentes padrões de fragmentos amplificados (BINNECK et al., 2002).

O processo de amplificação de fragmentos consiste na desnaturação do DNA-molde, na hibridização do iniciador com a fita simples do DNA, com base na homologia de sequência e na polimerização da sequência complementar ao DNA-molde. Esse ciclo de separação das fitas da hélice dupla, hibridização e polimerização, é repetido inúmeras vezes com o objetivo de amplificar a sequência reconhecida pelos iniciadores no genoma. Após a amplificação, os fragmentos são separados por eletroforese em gel de agarose. Para a visualização dos fragmentos sob luz ultravioleta, o gel é corado com brometo de etídeo. Os marcadores RAPD podem ser utilizados para: obtenção de impressões digitais genômicas de indivíduos, variedades ou populações; análise da estrutura e diversidade genética em populações; estabelecimento de relações filogenéticas interespecíficas; construção de mapas genéticos para localização de genes de interesse econômico (GONÇALVES et al., 2008).

Os marcadores RAPD possuem natureza dominante, ou seja, os alelos de um mesmo loco são identificados pela presença ou ausência da banda, resultante da amplificação de um fragmento. Todavia, não é possível determinar se este loco está em homozigose ou heterozigose, apenas que há presença de um alelo dominante naquele loco (LOPEZ et al., 2003). Esse marcador possui baixa reprodutibilidade, sendo sua principal limitação (BORÉM; FRITSCHÉ-NETO, 2014). A vantagem desta técnica consiste no baixo custo e na simplicidade do uso da PCR; não existe necessidade de grande quantidade de material genético e não é necessário conhecimento prévio da estrutura genética da espécie (LACERDA et al., 2002).

4 DArT (*Diversity Arrays Technology*)

O marcador DArT, proposto por Jaccoud et al. (2001), é uma adaptação das técnicas de microarranjos de DNA e é utilizado para a identificação de polimorfismos em DNA, que oferece baixo custo e rapidez, além da necessidade de uma mínima amostra do DNA de interesse, capaz de fornecer uma abrangente análise do genoma mesmo em organismos sem qualquer informação de sequenciamento do DNA (JACCOUD et al., 2001).

A adaptação consiste em utilizar os fragmentos do DNA representantes de um genoma de um organismo ou população, digeridos por enzimas de restrição. Na sequência, são clonados e impressos em lâminas de microarranjo, sendo a detecção dos polimorfismos feita a partir da presença ou da ausência do fragmento representante após a hibridização com o genoma de cada indivíduo digerido e marcado com fluoróforos (GUIMARÃES et al., 2009; JACCOUD et al., 2001).

O procedimento desenvolvido oferece a oportunidade de amostrar, de forma automatizada, milhares de marcadores moleculares aleatórios e sem a necessidade de prévio conhecimento da sequência do DNA-alvo (GUIMARÃES et al., 2009).

Suas utilizações envolvem a genotipagem em larga escala e possível aplicação em caracterização de bancos de germoplasma, mapeamento genético e seleção assistida por marcadores moleculares, além de proporcionar a descoberta de novos marcadores moleculares, mostrando ser uma técnica altamente competitiva com relação às outras (GUIMARÃES et al., 2009; JACCOUD et al., 2001; MACE et al., 2008).

5 SSR (*Simple Sequence Repeats*)

Os SSRs ou Microssatélites (LITT; LUTY, 1989), também conhecidos como sequências simples repetidas (JACOB et al., 1991), são pequenas sequências de 1 a 6 nucleotídeos, repetidas na mesma ordem e que ocorrem em abundância no genoma (ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002), mas que também aparecem no cloroplasto (PROVAN; POWELL; HOLLINGSWORTH, 2001), na mitocôndria (RAJENDRAKUMAR et al., 2007), em genes codificadores de proteínas e nos marcadores ESTs (*Expressed Sequence Tags*) (MORGANTE; HANAFEY; POWELL, 2002). Os microssatélites representam a menor repetição por loco com maior nível de polimorfismo (ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002). Sua classificação tem sido feita de acordo com seu tamanho, tipo de repetição e localização (KALIA et al., 2011).

Esses marcadores são compatíveis com genotipagem de alto rendimento e provaram ser uma ferramenta extremamente valiosa para a construção de mapas genômicos de alta densidade, seleção assistida por marcadores moleculares, mapeamento de genes úteis, estabelecimento de relações genéticas e evolutivas, além de análise de paternidade (PARIDA et al., 2009). Apesar de sua ampla aplicabilidade, seu desenvolvimento consiste na etapa de maior dificuldade para a maioria das espécies, principalmente para as culturas de menor importância

(KALIA et al., 2011). Para as espécies de maior importância econômica, ou que tiveram seu genoma sequenciado, atualmente há um grande número de marcadores microssatélites disponíveis, como, por exemplo, soja - <https://www.soybase.org/> (GRANT et al., 2010), milho - <https://www.maizegdb.org/> (PORTWOOD et al., 2019), arroz - <http://rgp.dna.affrc.go.jp/IRGSP/> (SASAKI; PROJECT, 2005), trigo - <https://www.wheatgenome.org/> (BRENCHLEY et al., 2012) e *Arabidopsis thaliana* - <http://www.arabidopsis.org/> (INITIATIVE, 2000).

Para estes marcadores, comumente, existe uma frequência relativamente baixa de microssatélites em genomas de plantas, quando comparado ao genoma animal, consistindo em certa desvantagem (POWELL; MACHRAY; PROVAN, 1996). Diante disso, diversas estratégias foram desenvolvidas para reduzir o tempo de desenvolvimento e o aumento da frequência de locos microssatélites. Esses métodos envolvem a identificação de sequências SSR em RAPD amplicons, triagem de bases de dados EST disponíveis e transferibilidade de marcadores de espécies relacionadas (KALIA et al., 2011).

Esses marcadores são uma valiosa fonte de marcadores genéticos devido às suas características e vantagens, como a abundância, alta taxa de polimorfismo, distribuição em todo o genoma, natureza codominante, alta extensão da diversidade alélica, possível transferibilidade entre espécies, facilidade de visualização, boa estabilidade e facilidade de ensaio por PCR (CASTILLO et al., 2008; GUPTA et al., 1999; KULEUNG; BAENZIGER; DWEIKAT, 2004), sendo dessa forma amplamente utilizados como marcadores moleculares e dentro dos programas de melhoramento genético (YUAN et al., 2015).

6 SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*)

Os marcadores SNP, ou polimorfismo em uma base nucleotídica única, entre duas sequências de DNA, podem ser categorizados quanto à substituição na base, podendo ser transições (C/T ou G/A) ou transversões (C/G, A/T, C/A, ou T/G), por exemplo, e nas sequências AAGCCTA e AAGCTTA, elas contêm um SNP do tipo transição (XU, 2010). Transições do tipo C/T representam a maior proporção dos SNPs observados em animais e plantas (EDWARDS et al., 2007). A frequência de SNP em plantas é de aproximadamente 1 a cada 100-300 pb (NADEEM et al., 2018) e, portanto, encontram-se amplamente distribuídos no genoma, tanto em regiões codificadoras de genes quanto em não codificadoras (XU, 2010).

Um grande número de métodos para genotipagem com SNPs foi desenvolvido com base em diferentes técnicas de discriminação alélica e de plataformas de detecção. Dentre eles, o RLFP (SNP – RFLP), que é o método mais simples e fácil, e a técnica do marcador CAPS, também aplicada na detecção de SNP.

Se os sítios de ligação para as enzimas de restrição estiverem presentes em um alelo, enquanto outros alelos não têm sítios de ligação, sua digestão resultará em fragmentos de vários comprimentos. A identificação de SNPs é obtida através da análise de dados sequenciais armazenados em bancos de

dados (XU, 2010). Diferentes tipos de ensaio de genotipagem de SNPs foram desenvolvidos com base em diferentes mecanismos moleculares. Entre elas, a extensão do iniciador, a clivagem invasiva, a ligação oligonucleotídica e a hibridização específica do alelo são as mais importantes (SOBRINO; BRIÓN; CAR-RACEDO, 2005). Vários métodos recentes de genotipagem de alto rendimento, como NGS, GBS e NGS baseados em chip, PCR específico de alelo, tornam os SNPs os marcadores mais atraentes para a genotipagem (AGARWAL; SHRIVAS-TAVA; PADH, 2008).

Baseado na informação obtida do sequenciamento parcial do genoma, os SNPs têm sido disponibilizados para diversas culturas e encontram-se amplamente utilizados em pesquisas genômicas. Se utilizarmos a soja como um exemplo, que possui um grande número de SNPs disponíveis no banco de dados SoyBase - <https://www.soybase.org/> (GRANT et al., 2010), diversos trabalhos recentes têm utilizado SNPs e em diversos âmbitos, como evolução e domesticação (WANG et al., 2016), resistência a doenças, vírus e nematoides (CHANG et al., 2016; PASSIANOTTO et al., 2017; SHI et al., 2015; TRAN et al., 2019; WEN et al., 2019), afídeos (LAMANTIA; MIAN; REDINBAUGH, 2019), características agronômicas (CONTRERAS-SOTO et al., 2017; LEE et al., 2015; ZHANG et al., 2015), composição da semente (KULKARNI et al., 2018; PATIL et al., 2017), entre diversos outros.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a crescente disponibilidade de tecnologias, a existência de um objetivo bem definido, no projeto de pesquisa, facilita a escolha do marcador molecular a ser utilizado, visto que cada um possui suas particularidades, com respectivas vantagens e desvantagens. Sendo assim, as características de cada marcador, bem como sua viabilidade e aplicabilidade devem ser levadas em consideração.

De forma geral, os marcadores moleculares são ferramentas muito úteis na avaliação da variação genética e incrementaram de forma significativa o estudo de algumas espécies vegetais (VARSHNEY et al., 2005). Fatores como a necessidade de dados de sequenciamento preexistentes, nível de polimorfismo, dominância, transferibilidade interespecífica, utilização em seleção assistida por marcadores, custo e trabalho envolvidos na execução, afetam o funcionamento e a viabilidade da técnica (KALIA et al., 2010) e são fatores essenciais para a sua viabilidade. Essas características, associadas às ferramentas estatísticas, contribuem de forma importante e essencial para a aplicabilidade bem como para a utilidade prática dos programas de melhoramento de espécies vegetais, tornando-se ferramentas complementares e extremamente úteis no estudo de espécies superiores (GUIMARÃES et al., 2009).

REFERÊNCIAS

AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 4, p. 617-631, 2 abr. 2008.

BRENCHLEY, R. et al. Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. **Nature**, v. 491, p. 705, 28 nov. 2012.

BINNECK, E.; NEDEL, J. L.; DELLAGOSTIN, O. A. Análise de RAPD na identificação de cultivares: uma metodologia útil. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, p. 183-196, 2002.

BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (Ed.). **Biotechnology and plant breeding: applications and approaches for developing improved cultivars**. Elsevier, 2014.

BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal of human genetics**, v. 32, n. 3, p. 314, 1980.

CASTILLO, A. et al. Transferability and polymorphism of barley EST-SSR markers used for phylogenetic analysis in *Hordeum chilense*. **BMC Plant Biology**, v. 8, n. 1, p. 97, 2008.

CHANG, H.-X. et al. Genome-wide association and genomic prediction identifies associated loci and predicts the sensitivity of Tobacco ringspot virus in soybean plant introductions. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 153, 29 dez. 2016.

CONTRERAS-SOTO, R. I. et al. A Genome-Wide Association Study for Agronomic Traits in Soybean Using SNP Markers and SNP-Based Haplotype Analysis. **PLOS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0171.105, 2 fev. 2017.

EDWARDS, D. et al. What Are SNPs? In: ORAGUZIE, N. C. et al. (Eds.). . Association Mapping in Plants. New York, NY: **Springer New York**, 2007. p. 41-52.

GONÇALVES, L. S. et al. Genetic divergence among tomato accessions using RAPD markers and its comparison with multicategorical descriptors. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 364-370, 2008.

GRANT, D. et al. SoyBase, the USDA-ARS soybean genetics and genomics database. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. suppl_1, p. D843–D846, jan. 2010.

GUIMARÃES, C. T. et al. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe agropecuário**, v. 30, n. 253, p. 24 – 33, 2009.

GUPTA, P. K. et al. Molecular markers and their applications in wheat breeding. **Plant Breeding**, v. 118, n. 5, p. 369–390, out. 1999.

INITIATIVE, T. A. G. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v. 408, n. 6.814, p. 796–815, 2000.

JACCOUD, D. et al. Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 4, p. e25, 2001.

JACOB, H. J. et al. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell**, v. 67, n. 1, p. 213–224, 4 out. 1991.

KALIA, R. K. et al. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, n. 3, p. 309–334, 9 fev. 2011.

KULEUNG, C.; BAENZIGER, P. S.; DWEIKAT, I. Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, n. 6, p. 1.147–1.150, 5 abr. 2004.

KULKARNI, K. P. et al. Comparative genome analysis to identify SNPs associated with high oleic acid and elevated protein content in soybean. **Genome**, v. 61, n. 3, p. 217–222, mar. 2018.

LACERDA, D. R. et al. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**, v. 3, n. 2, p. 87-92, 2002.

LAMANTIA, J. M.; MIAN, M. A. R.; REDINBAUGH, M. G. Genetic mapping of soybean aphid biotype 3 and 4 resistance in PI 606390A. **Molecular Breeding**, v. 39, n. 4, p. 53, 16 abr. 2019.

LEE, S. et al. SNP markers linked to QTL conditioning plant height, lodging, and maturity in soybean. **Euphytica**, v. 203, n. 3, p. 521–532, 13 jun. 2015.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American journal of human genetics**, v. 44, n. 3, p. 397–401, mar. 1989.

LÓPEZ, C. E. et al. Identifying resistance gene analogs associated with resistances to different pathogens in common bean. **Phytopathology**, v. 93, n. 1, p. 88-95, 2003.

MACE, E. S. et al. DArT markers: diversity analyses and mapping in Sorghum bicolor. **BMC Genomics**, v. 6, p. 26, 2008.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, v. 30, n. 2, p. 194–200, 22 fev. 2002.

NADEEM, M. A. et al. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 32, n. 2, p. 261–285, 2018.

PARIDA, S. K. et al. Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 118, n. 2, p. 327–338, 23 jan. 2009.

PASSIANOTTO, A. L. DE L. et al. Genome-wide association study for resistance to the southern root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in soybean. **Molecular Breeding**, v. 37, n. 12, p. 148, 12 dez. 2017.

PATIL, G. et al. Development of SNP Genotyping Assays for Seed Composition Traits in Soybean. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2017, p. 1–12, 2017.

PORTWOOD, J. L. et al. MaizeGDB 2018: the maize multi-genome genetics and genomics database. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D1.146–D1.154, 8 jan. 2019.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 7, p. 215–222, jul. 1996.

PROVAN, J.; POWELL, W.; HOLLINGSWORTH, P. M. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 3, p. 142–147, mar. 2001.

RAJENDRAKUMAR, P. et al. Simple sequence repeats in organellar genomes of rice: frequency and distribution in genic and intergenic regions. **Bioinformatics**, v. 23, n. 1, p. 1–4, 1 jan. 2007.

RAMALHO, M. A. P.; FURTINI, I. V. Técnicas biotecnológicas aplicadas ao melhoramento vegetal: alcance e limites. **Ceres**, v. 56, n. 4, 2015.

SASAKI, T.; PROJECT, I. R. G. S. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v. 436, n. 7052, p. 793–800, 2005.

SHI, Z. et al. SNP identification and marker assay development for high-throughput selection of soybean cyst nematode resistance. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 314, 18 dez. 2015.

SOBRINO, B.; BRIÓN, M.; CARRACEDO, A. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. **Forensic Science International**, v. 154, n. 2–3, p. 181–194, nov. 2005.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. 1975. **Biotechnology (Reading, Mass.)**, v. 24, p. 122, 1992.

TRAN, D. T. et al. Genome-wide Association Analysis Pinpoints Additional Major Genomic Regions Conferring Resistance to Soybean Cyst Nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe). **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 401, 2019.

VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 48 – 55, 2005.

WANG, J. et al. Development and application of a novel genome-wide SNP array reveals domestication history in soybean. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 20.728, 9 ago. 2016.

WEN, L. et al. Genome-wide association and genomic prediction identifies soybean cyst nematode resistance in common bean including a syntenic region to soybean Rhg1 locus. **Horticulture Research**, v. 6, n. 1, p. 9, 1 dez. 2019.

XU, Y. Molecular Plant Breeding. Wallingford: **CABI**, 2010.

YUAN, Y. et al. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers based on a full-length cDNA library of *Scutellaria baicalensis*. **Genomics**, v. 105, n. 1, p. 61-67, jan. 2015.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular ecology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, jan. 2002.

ZHANG, J. et al. Genome-wide association study for flowering time, maturity dates and plant height in early maturing soybean (*Glycine max*) germplasm. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 217, 20 dez. 2015.

CAPÍTULO IV

FERRAMENTAS DE ANÁLISE MOLECULAR E SUA APLICAÇÃO NA FITOPATOLOGIA

Gabriel Henrique dos Santos Silva Salgado

Nadia Maria Poloni

Fernanda Dias Pereira

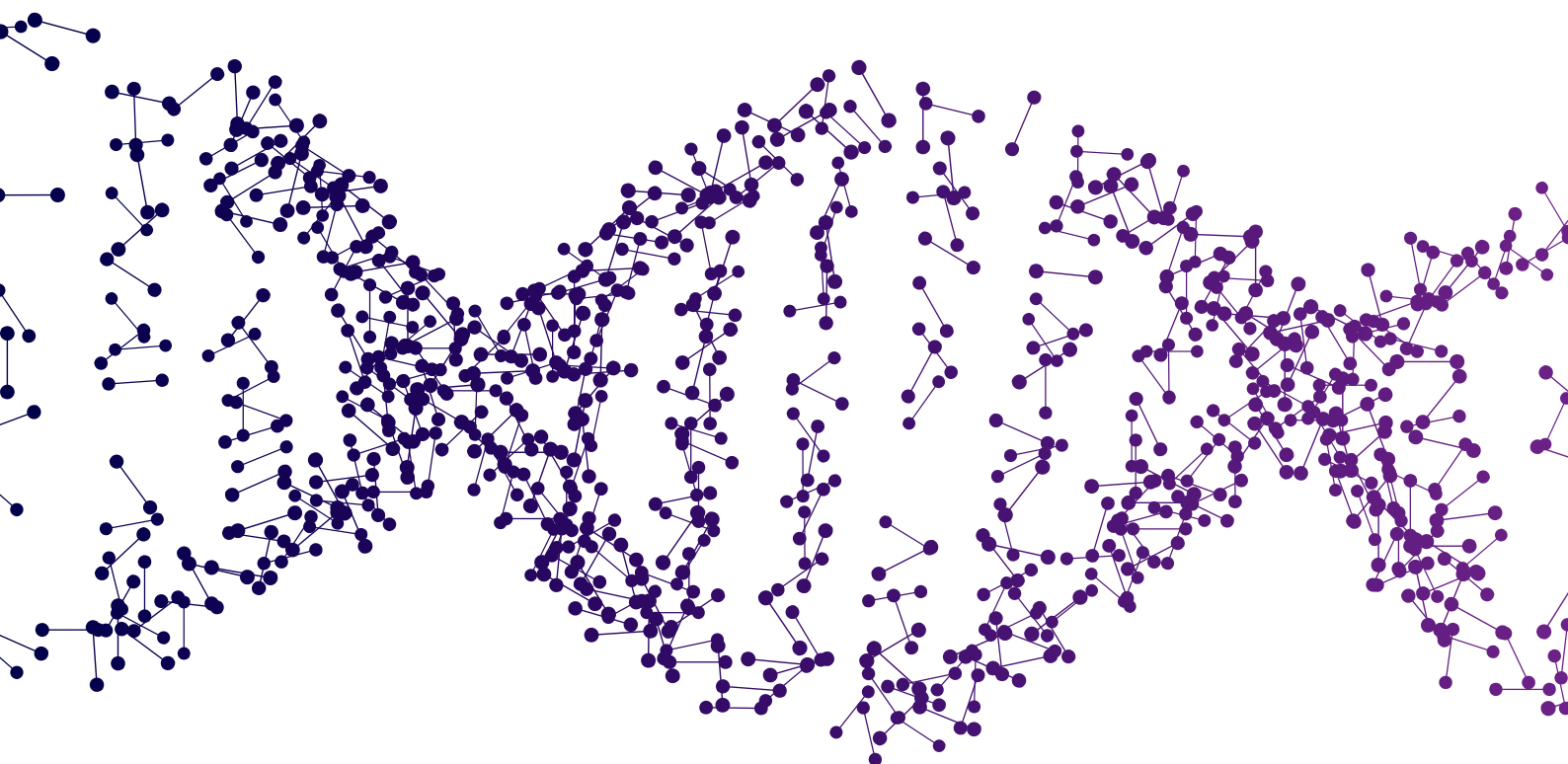
Samara Nunes Campos Vicentini

Antonio de Goes



CONTEÚDO

1	Introdução	41
2	Técnicas moleculares utilizadas	41
2.1	Diagnose molecular de doenças de plantas	41
2.2	Controle biológico de doença de plantas	42
2.3	Melhoramento genético de plantas	43
2.3.1	Transgênicos	45
2.4	Interações patógeno-hospedeiro	46
2.5	Interações patógeno-vetor	46
2.6	Resistência a fungicidas	47
	Referências	48



1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia é definida pela Organização das Nações Unidas (ONU) como qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica. A biotecnologia envolve a manipulação de sistemas biológicos, microrganismos e derivados, como biomoléculas, organelas e células para criar, alterar e melhorar métodos e ferramentas que serão utilizados para progresso na saúde humana e animal, na agricultura e na geração de energia (SALLES FILHO et al., 2001).

A biotecnologia pode ser aplicada à fitopatologia em diversos processos de interesse dessa ciência, atuando como uma grande impulsora do desenvolvimento agrícola, uma vez que disponibiliza, por exemplo, ferramentas que auxiliam na diagnose e na identificação de patógenos que apresentam dificuldades de controle por métodos tradicionais. Essas técnicas, por meio das diferenças existentes entre sequências do ácido desoxirribonucleico (DNA), permitem avanços no conhecimento de genomas de espécies, subespécies e até de raças diferentes, com alto grau de especificidade.

Na genética vegetal, a biotecnologia tem como efeito reduzir a dependência excessiva da agricultura das inovações mecânicas e químicas, que foram os pilares da revolução verde. Além do aumento da produtividade, a biotecnologia moderna pode contribuir para a redução dos custos de produção, para a produção de alimentos com melhor qualidade e para o desenvolvimento de práticas menos agressivas ao meio ambiente (SILVEIRA; BORGES; BUIANAIN, 2005).

2 TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADAS

2.1 Diagnose molecular de doenças de plantas

Uma das recomendações básicas na agricultura é iniciar um cultivo com um material livre de qualquer patógeno, inibindo dessa forma infecções da cultura na sua fase inicial. Estresses bióticos, e também os abióticos, advindo de problemas ambientais, ou a interação entre esses dois fatores, são as principais causas de redução da produtividade (ABRAHAMS; RENSBURG, 2017). Muitas vezes, os sintomas oriundos das duas causas são semelhantes entre si, dificultando o diagnóstico. Ambos os estresses, bióticos e abióticos, causam danos às plantas e perdas significativas na produção (BRIOSO; POZZER; MONTANO, 2002).

O diagnóstico precoce de doenças de plantas é fundamental para aplicar estratégias de manejo em seu início e, dessa forma, quebrar o ciclo do patógeno e evitar desperdícios na produção. Neste contexto, a biotecnologia sobressai-se como uma ferramenta de apoio, de forma muito acessível e assertiva, e com resultados mais rápidos.

Uma das etapas mais importantes no sistema de produção agrícola é a detecção de patógenos em sementes e outros materiais de propagação vegetal, e torna-se cada vez mais imprescindível pelos reflexos que produz em termos

de garantia de produções e de sustentabilidade dessas atividades. As sementes, por se tratar de um insumo básico para a maioria das espécies vegetais, têm sua qualidade fundamentada no processo produtivo. Além disso, em muitas situações, por exemplo em aeroportos, portos e postos de fiscalização de fronteiras, há a necessidade de diagnósticos rápidos e seguros, com real vantagens das técnicas biomoleculares. Há, ainda, situações cujos agentes de doenças são refratários ao isolamento, ou o seu desenvolvimento é muito lento, sobressaindo os benefícios das ferramentas biotecnológicas.

O maior problema no cultivo de manjeriço é *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici*. Considerável para a contaminação do solo e reinfestação através de sementes infectadas que fazem com que medidas de controle, como a desinfestação do solo, sejam apenas parcialmente efetivas, necessitando de técnicas rápidas e sensíveis para a detecção e diferenciação das formas saprofíticas e antagonísticas. Em várias situações, até recentemente, sementes contendo estruturas fúngicas eram descartadas pela suspeita de sua contaminação com patógenos, ainda que a presença de formas não patogênicas não pudessem ser excluídas das amostras. O uso de marcadores RAPD-PCR, por exemplo, permitem diferenciar de modo rápido e preciso o fungo *F. oxysporum* f. sp. *basilici* de outras estirpes não patogênicas de *Fusarium oxysporum* (CHIOCCETTI et al., 1999). Um ensaio baseado em PCR permitiu a detecção de *Rhynchosporium secalis* em sementes de cevada, em quantidade do patógeno tão pequenas como 1 a 10 pg. Este método requer apenas um dia para ser concluído, contra os 10 dias necessários para o método cultural (LEE et al., 2001). Pela técnica de PCR, seguido de RFLP, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (sin *X. campestris* pv. *vesicatoria*), associada a sementes de tomate e de pimentão, pode ser detectada, em concentração de 10^2 e 10^3 ufc/mL. Estes testes mostram-se cerca de, no mínimo, 1.000 vezes mais sensível que o método ELISA. Outros métodos que se destacam pela sua aplicabilidade e eficiência no diagnóstico e na identificação de patógenos, são os que envolvem a detecção rápida de proteínas ou DNA específicos, a amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) do DNA, sendo de detecção específica de DNA genômico, destacam-se dentre as técnicas que podem ser utilizadas com sucesso. A DNA polimerase de *Geobacillus stearothermophilus* é utilizada para a amplificação isotérmica do DNA. O método tem sido aplicado em vários ensaios para o diagnóstico de bactérias, vírus e fungos de amostras ambientais, onde se utiliza um aparelho portátil que pode ser usado em estufas, campo ou laboratório. Além disso, permite que o RNA de patógenos ou de pragas possa ser detectado (NOTOMI et al., 2000).

2.2 Controle biológico de doença de plantas

O mercado de produtos biológicos para controle de pragas e doenças, e o uso de métodos de controle alternativos têm sido empregados para impulsionar a produção de alimentos de maneira sustentável, e as técnicas moleculares mostram-se como importantes ferramentas para auxiliar, dentre outras funções, na distinção dos possíveis agentes fitopatogênicos (BRIOSIO; POZZER; MONTANO, 2002).

O controle biológico é caracterizado pela redução da densidade de inóculo dos agentes determinantes de doença mediante um ou mais organismos, resultando em uma interação entre patógeno, hospedeiro e antagonista(s), fortemente influenciados pelo ambiente (COOK; BACKER, 1983). As relações patógeno-antagonista podem ocorrer por diversos mecanismos, como parasitismo, antibiose, competição por nicho e/ou nutrientes, indução de resistência e predação (Almeida et al., 2018). Com a ajuda da biotecnologia, a técnica avançou muito e já é usada em dez milhões de hectares no Brasil. Em cinco anos, o número de biofábricas dobrou: já são 70 indústrias de produtos do tipo no País e o faturamento do setor chega a R\$ 500 milhões por ano.

Os marcadores moleculares podem ser usados na identificação de patógenos, em estudos de variabilidade genética e na caracterização de microrganismos com atividade antimicrobiana, possibilitando a criação de produtos biológicos capazes de controlar doenças (BERBARA; BRIOSO, 2011).

A utilização de isolados antagonistas de *Fusarium oxysporum* na proteção de materiais de propagação vegetal requer a identificação precisa desse agente de controle. Com o uso da técnica de RAPD-PCR (CHIOCCETTI et al., 1999), conseguiu-se a distinção de espécies patogênicas e não patogênicas em sementes de tomate e de pimentão. Da mesma forma, o uso de marcadores moleculares RAPD foi utilizado de forma promissora para distinguir espécies do gênero *Fusarium* que parasitavam ovos de nematoides, daqueles que causavam a podridão vermelha da raiz (PVR) (SILVA et al., 2000). As poucas características taxonômicas, como a morfologia e a fisiologia, tornam difícil a diferenciação entre isolados de uma mesma espécie de *Fusarium*.

2.3 Melhoramento genético de plantas

O melhoramento clássico de plantas envolve a seleção de genótipos considerando-se a variabilidade genética disponível ou a produção dela através de cruzamentos entre indivíduos selecionados, de forma a obter-se uma população com genótipos superiores. Nesses cruzamentos, as características fenotípicas de interesse, determinadas por genes, são transferidas à progênie através de cruzamentos.

Já há várias décadas os melhoristas vêm usando genes de resistência (genes *R*) para controlar doenças de plantas. Isto porque o controle de doenças através do uso de variedades resistentes é o mais barato e de fácil utilização. Em algumas espécies, o controle de importantes doenças só é feito através da utilização de variedades resistentes, como, por exemplo, as ferrugens e carvões em cereais e cana-de-açúcar; marchas vasculares em hortaliças; e viroses, na maioria das culturas (BESPALHOK; GUERRA; OLIVEIRA, 2007).

As tecnologias, como a técnica de transferência e de modificação genética direta, conhecida como engenharia genética ou tecnologia do DNA recombinante, fertilização in vitro, fusão de protoplastos, PCR e sequenciamento de DNA, são as principais técnicas utilizadas no melhoramento, visando à resistência a doenças (ALMEIDA et al., 2018).

A transformação de plantas com genes de defesa tem sido alvo de muitos estudos nos últimos anos. Diferentes genes que fazem parte do mecanismo de defesa foram clonados e introduzidos em plantas. Estratégias como a superexpressão ou supressão de um gene permitiram a obtenção, com sucesso, de plantas transgênicas resistentes a diferentes patógenos. O gene *N1M1* ("noninducible immunity") é requerido para a ativação biológica e química de resistência adquirida em *Arabidopsis*. A superexpressão de *N1M1* nessas plantas resultou em graus variados de resistência a diferentes patógenos. Além disso, foi observado aumento na eficiência de três fungicidas nas plantas transformadas, sugerindo que a combinação da pesquisa transgênica e da química pode levar a estratégias de controle mais efetivas e duráveis.

Os marcadores moleculares fornecem um número ilimitado de polimorfismos e são independentes dos efeitos ambientais e do estágio fisiológico da planta, permitindo a identificação precoce e precisa de indivíduos com melhor combinação de alelos favoráveis (LANZA et al., 2000). Um dos usos mais comuns dos marcadores moleculares em programas de melhoramento vegetal é para selecionar genótipos com genes *R* às doenças, os quais podem ser usados para desenvolver cultivares resistentes, bem como para monitorar a transferência de genes específicos de uma cultivar para outra. Por exemplo, o fungo causador da mancha angular do feijoeiro, *Phaseoisariopsis griseola*, é altamente variável. Desse modo, os programas de melhoramento dependem do estudo dessa variabilidade e da identificação de novos genes *R* que precisam ser transferidos às cultivares comerciais. Utilizando RAPD foi analisada a geração F2 do cruzamento entre uma cultivar resistente e uma cultivar suscetível a *P. griseola*. Foram observadas três bandas polimórficas em todas as plantas resistentes e ausentes nas suscetíveis (SARTORATO et al., 2000).

A seleção assistida por marcadores fornece uma conveniente e rápida avaliação para seleção durante os programas de melhoramento, permitindo a detecção molecular de genes *R*. Para acelerar o desenvolvimento de cultivares de trigo resistentes, *Fusarium graminearum*, agente causal da Giberela ou Fusariose da espiga do trigo, marcadores moleculares ligados aos genes *R* têm sido identificados pelo uso de linhagens recombinantes derivadas de cruzamento entre genótipos resistentes e suscetíveis. Onze marcadores AFLP apresentaram significativa associação com o gene de resistência a *F. graminearum* (BAI et al., 1999).

A tecnologia do RNA interferente (RNAi) é um mecanismo celular responsável pelo silenciamento gênico pós-transcricional (post transcription gene silencing, PTGS) que atua sobre o RNA mensageiro (mRNA). Esse mecanismo permite "desligar" a função de genes em qualquer organismo vivo. O mecanismo de silenciamento em plantas permite que, quando o dsRNA é absorvido pelas raízes, este acione o RNAi sistêmico e silencie o gene-alvo em toda a planta (COLEMAN et al., 2014). Esta tecnologia já foi utilizada no Brasil para a produção de plantas com resistência ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (BGMV).

2.3.1 Transgênicos

A transferência gênica é um passo fundamental no desenvolvimento de plantas transgênicas, pois permite a integração de novas características no genoma da planta hospedeira. Um transgênico é um organismo que recebeu um gene de outro organismo doador. Essa alteração em seu DNA permite que mostre uma característica geneticamente inédita.

Os transgênicos mais comuns são os tolerantes a herbicidas, isso porque essa característica permite mais flexibilidade no controle de plantas invasoras, possibilitando que a cultura desenvolva melhor seu potencial agrônomo. A transgenia também protegeu as plantas do ataque de insetos, por meio da inserção de um fragmento do DNA da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), e hoje já existem soja, milho, algodão, canola, berinjela e cana-de-açúcar transgênicos que apresentam resistência a insetos.

O padrão de cultivos agrícolas empregando plantas transgênicas no Brasil segue o do mundo, com a liderança da soja, milho e algodão. Em 2017, o Brasil cultivou 50,2 milhões de hectares com culturas transgênicas, sendo 33,7 milhões de hectares plantados com a soja, 15,6 milhões de ha com milho (safras de verão e inverno) e 940 mil ha com algodão (BATISTA, 2018). Plantas transgênicas são normalmente produzidas por meio da integração do gene ao acaso no genoma da planta, mas as técnicas mais modernas permitem um controle mais preciso do local de integração.

Inserções ou deleções em locais definidos, e com precisão em um genoma específico, podem ser obtidas por ferramentas como nucleases dirigidas ao local (SDN - site-directed nucleases), dos tipos dedos de zinco (ZFN - zinc finger nucleases), TALENs (Transcription activator-like effector nuclease) ou CRISPR/Cas9 (van de Wiel et al., 2017). Por exemplo, a tecnologia CRISPR/Cas9 foi utilizada para eliminar os três homólogos do gene MLO e assim conferir resistência do trigo a oídio (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) (WANG et al., 2014).

Outro tipo de planta transgênica que tem sido explorado, busca a resistência a diferentes fitopatógenos, e devido ao seu genoma menos complexo, os fitovírus são os organismos mais explorados com relação à aplicação dessa tecnologia. Plantas transgênicas de diferentes espécies, com resistência a vírus, têm sido desenvolvidas carregando, de modo geral, diferentes sequências genômicas ou genes virais (capsídeo viral, replicase viral, proteína de movimento, entre outros). Tais plantas têm sido produzidas com resistência aos vírus dos gêneros: *Alfavirus*, *Begomovirus*, *Bromovirus*, *Carlavirus*, *Caulimovirus*, *Caomovirus*, *Cucumovirus*, *Curtovirus*, *Ilarvirus*, *Polevirus*, *Potexvirus*, *Potyvirus*, *Tobamovirus*, *Tobravirus*, *Tombusvirus*, *Tospovirus* (RESENDE, 1994).

Pesquisadores brasileiros, em estudo de alto impacto, clonaram gene que confere resistência à principal doença da soja no País. Foi desenvolvida uma planta geneticamente modificada capaz de resistir a ferrugem asiática da soja, graças a um gene existente no feijão-guandu. Os pesquisadores identificaram e mapearam o gene de resistência no guandu, para depois realizar a clonagem e

a transferência para a soja por meio da transformação genética. A planta resistente obtida é transgênica e ainda precisa passar por testes de análise de biossegurança e de avaliação agrônômica, antes de seu uso comercial, mas acredita-se que tenha um futuro promissor (KAWASHIMA et al., 2016).

2.4 Interações patógeno-hospedeiro

Uma série de respostas decorre da interação entre fitopatógenos e de seus potenciais hospedeiros, e envolve a liberação de sinais moleculares, reconhecimento e transdução desses sinais, bem como a ativação de genes de defesa (LEITE et al., 1997). A interação entre uma planta e um patógeno pode ser dividida, basicamente, entre compatível (ocorre a doença) e incompatível (não ocorre a doença), sendo que a principal diferença entre ambas está relacionada à presença ou ausência de um gene *R* na planta e de um gene de avirulência (*Avr*) no patógeno (CORDEIRO; SÁ, 1999).

O primeiro gene *R* clonado de plantas, que está de acordo com a relação gene a gene, foi o *Pto*, em 1992, isolado de tomate e que confere resistência contra as estirpes de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, que carregam o gene de avirulência *avrPto* (STASKAWICZ, 1995). A partir daí, outros genes *R* têm sido caracterizados. O gene *I-2* confere resistência ao tomate contra a raça 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, a qual expressa, correspondentemente, gene de avirulência *avrI-2*. Para elucidar a base molecular desta interação gene a gene, foi gerado um mutante do fungo, que mostrou perda de avirulência.

A construção de mutantes é uma das tecnologias mais recorrentes no estudo das interações microrganismo-planta, principalmente nas patogênicas. Dentre os métodos de mutagênese mais utilizados atualmente, estão a inserção ao acaso de transposons e as mutações sítio-dirigidas com *Agrobacterium tumefaciens*, recombinação homóloga e CRISPR-Cas (Repetições Palindrômicas Curtas, Agrupadas e Regularmente Interespaçadas, associadas à endonuclease Cas) (NEJAT et al., 2016).

2.5 Interações patógeno-vetor

Para determinados patossistemas, é indispensável o sucesso da interação entre fitopatógeno e o vetor, sendo este o meio mais comum da dispersão de vírus, fitoplasmas e espiroplasmas. Nos últimos anos, muitas informações referentes a essa interação foram obtidas, muitas delas devido ao desenvolvimento e à adoção de técnicas moleculares, como a construção de vírus quiméricos, análises de sequência de nucleotídeos ou de aminoácidos, estudos mutacionais, hibridização *in situ* e análise de PCR (BRIOSIO; POZZER E MONTANO, 2002).

A análise de sequências de nucleotídeos ou de aminoácidos tem sido explorada para estudar a interação patógeno-vetor. Em trabalho conduzido por Kheyr-Pour et al. (2000), foi demonstrado que a troca em um único aminoácido da proteína da CP transformou o *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) em não transmissível pela mosca-branca; sendo que esta região também está envol-

vida na transmissão do TYLCV por *Bemisia tabaci*.

A interação entre *Spiroplasma citri*, patógeno causador do "Stubborn" dos citros, e seu inseto vetor, *Circulifer tenellus*, tem sido investigada quanto aos mecanismos de transmissão pelo vetor. A análise molecular da interação entre esse espiroplasma e células do inseto foi efetuada para linhas de uma estirpe isolada de *S. citri*. Observou-se que linhas derivadas desse isolado apresentavam diferentes graus de transmissibilidade pela cigarrinha vetora, e métodos moleculares permitiram verificar diferenças no cromossomo da linha deficiente quanto à transmissibilidade (FLETCHER et al., 1998).

2.6 Resistência a fungicidas

A ocorrência de resistência a fungicidas é uma das mais importantes consequências da agricultura moderna. A resistência a fungicidas é um caráter estável, herdável, resultando na redução da sensibilidade do fungo ao fungicida. O uso prolongado de uma mesma substância química para controlar doenças tem resultado no desenvolvimento de resistência em muitos fungos fitopatogênicos (BRENT; HOLLOMON, 1998).

O mecanismo de ação mais comum parece ser a alteração bioquímica do sítio-alvo do fungicida. A maioria dos fungicidas modernos parece agir primariamente em um único sítio-alvo, e são frequentemente denominados fungicidas de 'sítio-único' ou 'sítio específico'. Portanto, apenas uma mutação em um único gene pode causar uma alteração em um sítio-alvo de modo a se tornar bem menos vulnerável ao fungicida (BRENT; HOLLOMON, 1998).

No estudo conduzido por Schnabel e Jones (2001), a superexpressão do gene *CYP51A1* foi significativamente maior em nove de 11 isolados de *Venturia inaequalis*, resistentes ao fungicida miclobutanil, sugerindo que este seja um importante mecanismo de resistência ao fungicida, embora outros também pareçam existir. O gene *CYP51A1* foi completamente sequenciado de estirpes sensíveis e resistentes ao fungicida, mas nenhuma variação nucleotídica foi encontrada. A análise por PCR indicou que uma mutação em um par de bases que está correlacionada à resistência a fungicidas, em outros fungos filamentosos, foi ausente em dois isolados de *V. inaequalis* avaliadas neste estudo. Os resultados sugerem que a resistência nessas estirpes não foi devido à mutação, mas que a alta expressão foi correlacionada à presença de uma inserção de 553 pb localizada anteriormente ao gene. A superexpressão do gene também foi encontrada em oito isolados fúngicos resistentes, oriundos de viveiros comerciais, mas a inserção não foi detectada na maioria desses isolados.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMAS, A.; RENSBERG, B.J. 2017. **Procedures in the diagnosis of plant diseases**: The path to effective control measures. Potchefstroom: ARC-Grain Crops. Disponível em: < <https://www.grainsa.co.za/procedures-in-the-diagnosis-of-plant-diseases-the-path-to-effective-control-measures> > . Acesso em: 02 abr. 2019.

ALMEIDA, K. A. et al. **Aplicações da biotecnologia na fitopatologia**: o futuro é agora. Lavras: UFLA, 2018.

BAI, G. H ; KOLB, F.L.; SHANER, G.; DOMIER, L.L. Amplified fragment length polymorphism markers linked to a major quantitative trait locus controlling scab resistance in wheat. **Phytopathology** v. 89, p.343-8, 1999.

BATISTA, D. A escalada dos transgênicos. SAFRA – **Revista do Agronegócio**, n. 203, 2018. Disponível em: < http://revistasafra.com.br/wp-content/uploads/2018/05/REVISTA_SITE.pdf > . Acesso em: 30 mar. 2019.

BERBARA, R.L.L.; BRIOSO, P.S.T. Micélios + carga enzimática. Evolução dos Biológicos. **Revista Campo & Negócios HF**, v.79, p.64-65, 2011.

BESPALHOK, F.J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. Melhoramento para resistência a doenças. In: BESPALHOK, F.J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. **Melhoramento de Plantas**. (2007). Disponível em: < <http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/capitulo%2016.pdf> > Acesso em: 02 abr. 2019.

BRENT, K.J.; HOLLOMON, D.W. **Fungicide resistance**: the assessment of risk. Brussels: GPCF (FRAC Monograph No .21), 48p., 1998.

BRIOSO, P.S.T.; POZZER, L.; MONTANO, H.G. Uso Atual e futuro da biologia molecular na fitopatologia - Parte II – Diversidade e Aplicações. **Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP)**, v.10, p.67-110, 2002.

CHIOCCHETTI, A. et al. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* isolated from soil, basil seed, and plants by RAPD analysis. **Plant disease**. v. 83, p. 576-581, 1999.

COLEMAN; A.D.; WOUTERS, R.H.M.; MUGFORD, S.T.; HOGENHOUT, S.A. Persistence and transgenerational effect of plant-mediated RNAi in aphids. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, p. 541-548, 2014.

COOK, R.J.; BAKER, K.F. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. **American Phytopathological Society**, 1983.

CORDEIRO, M.C.R.; SÁ, M.F.G. Biotecnologia e resistência a patógenos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 10, p.34-39, 1999.

FLETCHER, J.; WAYADANDE, A.; MELCHER, U.; YE, F. The phytopathogenic mollicute-insect vector interface: a close look. **Phytopathology**, v. 88, p.1.351-1.358, 1998.

KAWASHIMA et al. A pigeonpea gene confers resistance to Asian soybean rust in soybean. **Nature Biotechnology**, v. 34, p. 661-665, 2016.

KHEYR-POUR, A. et al. Watermelon chlorotic stunt virus from the Sudan and Iran: sequence comparisons and identification of a whitefly-transmission determinant. **Phytopathology**, v. 90, p.629-635, 2000.

LANZA, M.A.; GUIMARÃES, C.T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Aprovecuário**, v. 21, p.97-108, 2000.

LEE, H.K.; TEWARI, J.P.; TURKINGTON, T.K.; TRAIL, E. A PCR-based assay to detect *Rhynchosporium secalis* in barley seed. **Plant Disease**, v. 85, p.220-225, 2000.

LEITE, B.; RONCATO, L.B.; PASCHOLATI, S.F.; LAMBAIS, M.R. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungo patogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP)**, v. 5, p.235-280, 1997.

NEJAT, N. et al., Plant-pathogen interactions: toward development of next-generation disease-resistant plants. **Critical reviews in biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 229-237, 2016.

NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research** v. 28, n.12, E63, 2000.

RESENDE, R.O. Perspectiva de plantas transgênicas no controle de fitovírus. In: LUZ, W.C. da; FERNANDES, J.M.C.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. (Eds.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP)**, v.2, p.123-152, 1994.

SALLES FILHO, S.L.M.; BONACELLI, M.B.M.; MELLO, D.L. Instrumentos de Apoio à Definição de Políticas de Biotecnologias, Estudos em Biotecnologia- Campinas: MCT/FINEP, 2001.

SATORATO, A.; NIETSCH, S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to resistance gene to angular leaf spot in common beans. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 637-642, 2000.

SCHNABEL, G.; JONES, A.L. The 14 alpha-demethylase (*CYP51A1*) gene is over expressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. **Phytopathology**, v. 91, p.102-110, 2001.

SILVA, J.F.V.; ABDELNOOR, R.V.; COSTA, C.L.; BAIA, G. S. Análise de RAPD em isolados de *Fusarium* spp. parasitas de ovos de *Heterodera glycines* ou de plantas de soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p.491-496, 2000.

SILVEIRA, J.M.F.J.; BORGES, I.C.; BUAINAIN, A.M. Biotecnologia e agricultura: da ciência e tecnologia aos impactos da inovação. **São Paulo em perspectiva**, v.19, n.2, p.101-114, 2005.

STASKAWICZ, B.J. et al. 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science** v. 268, p.611-617, 1995.

WANG, Y. et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. **Nature biotechnology**, v.32, p.947-951, 2014.

CAPÍTULO V

PRINCÍPIOS E APLICAÇÕES DA PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVA ABSOLUTA, HRM (HIGH RESOLUTION MELTING) E LAMP (LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION)

Marcos Rogério André

Rosangela Zacarias Machado

Lívia Perles, Renan Amaral

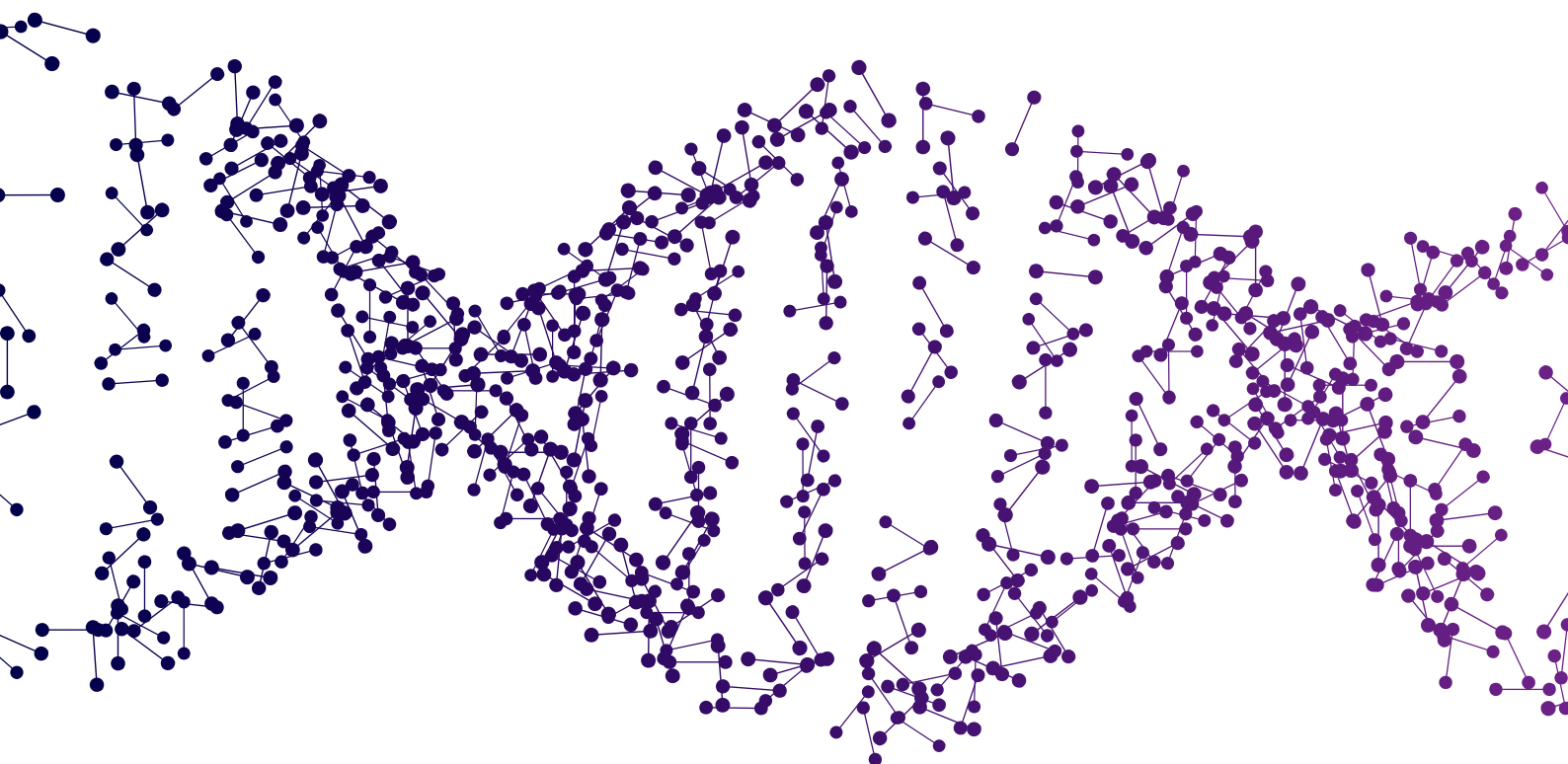
Victória Valente Mello

Maria Eduarda Furquim



CONTEÚDO

1	Introdução	53
2	PCR em Tempo Real Quantitativa Absoluta	53
2.1	Bases da PCR em Tempo Real Quantitativa	53
2.2	Sistemas de Detecção.....	54
2.2.1	Intercalantes de DNA	54
2.2.2	Sondas de Hidrólise (<i>Sistema TaqMan®</i>)	54
3	PCR em Tempo Real Quantitativa Absoluta	55
4	HRM (<i>High Resolution Melting</i>).....	57
5	LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification)	58
	Referências	60



1 INTRODUÇÃO

Técnicas moleculares têm sido amplamente aplicadas no diagnóstico de enfermidades infecciosas e parasitárias (YANG e ROTHMAN 2004). Devido à sua alta sensibilidade e especificidade, tais técnicas compreendem importantes ferramentas para o diagnóstico e o monitoramento de doenças (HOFMANN; GRIOT; CHAIGNAT et al., 2008). A Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e suas variações, tais como PCR em Tempo Real Quantitativa (qPCR), *High Resolution Melting* (HRM) e *Loop Mediated Isothermal Amplification* (LAMP), são as técnicas mais utilizadas no momento, com uma gama de aplicações clínicas.

Assim, neste capítulo, serão discutidos os princípios das técnicas moleculares mais utilizadas no diagnóstico de patógenos, bem como suas vantagens e dificuldades, com o objetivo de facilitar o entendimento das mesmas.

2 PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVA ABSOLUTA

2.1 Bases da PCR em Tempo Real Quantitativa

A PCR em tempo real quantitativa é uma ferramenta utilizada em muitos laboratórios, em aplicações voltadas à investigação científica básica e no diagnóstico direto de material genético. Esta tecnologia une o princípio da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) com o monitoramento de emissão de fluorescência emitido por moléculas adicionadas nas reações, permitindo a visualização da polimerização de produtos de PCR, gerados durante a reação (NAVARRO et al., 2015; PABINGER et al., 2014).

A cada ciclo de amplificação, ocorre um acréscimo linear na emissão de fluorescência conforme produtos de PCR são produzidos. A correlação entre a quantidade de produtos de PCR gerados a cada ciclo e a intensidade de fluorescência emitida são utilizadas para calcular a quantidade de DNA presente no início da reação, levando em consideração o número de ciclos necessários para que estes produtos sejam detectados pela primeira vez (BUSTIN; NOLAN, 2004).

Os níveis de fluorescência emitidos em cada amostra podem variar devido a alterações no meio em que a reação ocorre, criando um "sinal de fundo" (*background signal*). Este sinal de fundo é mais evidente durante os primeiros ciclos das reações, antes que ocorra acúmulo significativo do produto-alvo. A intensidade de "sinal de fundo" emitido é utilizada para a determinação de um limiar de fluorescência. Este limiar, ou linha basal (*Baseline Threshold*), é calculado através de uma plataforma algorítmica específica, determinando o ponto em que a fluorescência emitida individualmente pelas amostras excede a linha basal. O ciclo em que este ponto ocorre é chamado de Ciclo de Quantificação (*C_q*), que é inversamente relacionado ao logaritmo do número inicial de cópias. O valor de *C_q* reflete, portanto, o ponto em que ocorre acúmulo de produtos de PCR, suficiente para a detecção do DNA-alvo (BUSTIN; NOLAN, 2004).

2.2 Sistemas de Detecção

2.2.1 Intercalantes de DNA

As moléculas mais comumente utilizadas para este método são o SYBR Green I e Eva Green, que se ligam de forma reversível, porém forte, às moléculas de DNA de cadeia dupla por alocação do cromóforo entre os pares de bases empilhados. Estas moléculas possibilitam o monitoramento da amplificação de produtos de PCR a cada ciclo, através da leitura da absorbância de energia luminosa (fótons). Esta energia, emitida por fluoróforos, dá-se através da excitação destes por absorção de comprimentos de ondas específicos, emitidos por *lasers* ou lâmpadas halógenas acopladas ao termociclador, bem como um fluorímetro para a leitura da emissão de fluorescência. Desta forma, o acréscimo de fluorescência é medido ao final de cada ciclo de PCR, quando ocorre a formação de DNA de cadeia dupla (BUSTIN; NOLAN, 2004).

As principais vantagens deste método são a incorporação destes fluoróforos em protocolos previamente estabelecidos, com oligonucleotídeos iniciadores comuns. Outra vantagem é o menor custo em relação ao uso de sondas de hidrólise, porém apresenta menor especificidade quando comparado a esta. Esta inespecificidade ocorre devido à possibilidade de ligação dos intercalantes em cadeias simples de DNA e também de ligação indiscriminada em qualquer outra cadeia dupla gerada durante a reação, por exemplo: a emissão de fluorescência inespecífica gerada por ligação aos dímeros de *primers* (BUSTIN; NOLAN, 2004).

2.2.2 Sondas de Hidrólise (*Sistema TaqMan®*)

O sistema de detecção, popularmente conhecido como *TaqMan*, utiliza a atividade exonucleásica da enzima *Taq* polimerase como chave para o monitoramento dos produtos de PCR gerados a cada ciclo. Esta técnica tem como base a utilização de oligonucleotídeos, ou sondas de hidrólise, duplamente marcadas com: um fluoróforo "repórter" na extremidade 5' e um *quencher*, ou abafador, na extremidade 3' (sendo TAMRA o mais comumente utilizado). Semelhantemente aos fluoróforos intercalantes de DNA, a emissão de fluorescência do repórter dá-se através da excitação deste por absorção de comprimentos de ondas específicos e leitura por fluorímetro, acoplado ao equipamento termociclador (KIM et al., 2013).

Em uma sonda *TaqMan* intacta, a fluorescência emitida pelo repórter acoplado à extremidade 5' é absorvida pelo *quencher* localizado na extremidade 3'. Isto ocorre através da transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET), fazendo com que a intensidade de fluorescência emitida permaneça abaixo da linha basal (KIM et al., 2013; BUSTIN; NOLAN, 2004).

Mais recentemente, *quenchers* escuros estão substituindo os fluorescentes em reações de PCR em Tempo Real, liberando, assim, o TAMRA como repórter nas análises multiplex, reações estas em que são utilizadas mais de uma sonda de hidrólise, com fluoróforos que emitem comprimentos de onda distintos, para detecção de diferentes genes (BUSTIN; NOLAN, 2004).

Durante a etapa de polimerização, todas as ligações de nucleotídeos à cadeia-base serão quebradas. Isto ocorre devido à atividade exonucleásica da enzima *Taq* polimerase. Desta forma, a sonda de hidrólise é clivada gradativamente a partir da extremidade 5', separando o fluoróforo de seu abafador, permitindo que esta fluorescência possa então ser detectada pelo equipamento acoplado ao termociclador. Assim, a geração de produtos de PCR é detectada pelo monitoramento da fluorescência gerado a cada ciclo, conforme ocorre a clivagem das sondas de hidrólise, utilizadas na reação (BUSTIN, NOLAN, 2004).

Este sistema apresenta maior especificidade quando comparado ao sistema de intercalantes de DNA, devido à utilização de três oligonucleotídeos que deverão ser complementares ao DNA-molde. Entretanto, a necessidade de utilização de uma sonda complica o processo de concepção dos oligonucleotídeos que serão utilizados em conjunto, devendo ser específicos para a sequência de interesse. É necessário, ainda, salientar que o comprimento do gene-alvo para as reações de qPCR é limitado, devendo conter menos que 500 pares de bases. Tais dificuldades podem levar à concepção e à utilização de conjuntos, iniciador e sonda, falhos, o que pode levar à produção de resultados distorcidos (BUSTIN; NOLAN, 2004).

3 PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVA ABSOLUTA

Ao contrário da PCR convencional (cPCR), à qual o produto amplificado é submetido à eletroforese em gel de agarose para a visualização do resultado, a qPCR pode mensurar a amplificação de DNA durante o progresso da reação, ou seja, em tempo real. A detecção em tempo real só é possível pela adição de uma molécula fluorescente que reporta o aumento na quantidade de DNA por meio do aumento proporcional do sinal de fluorescência. Sendo assim, a principal vantagem da qPCR sobre a cPCR é sua capacidade de poder determinar a quantidade de *template* no início da reação, promovendo, com alta acurácia, precisão e sensibilidade à quantificação do número de cópias de DNA-alvo.

Bustin et al. (2009), em seu artigo "*The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*", descrevem importantes informações com o objetivo de aumentar a confiabilidade dos resultados, ajudando a garantir a integridade da literatura científica, promovendo a consistência entre laboratórios e o aumento da transparência experimental.

Em princípio, a quantificação de ácidos nucleicos por meio da qPCR não mostra dificuldades. Quanto maior o número de cópias de ácidos nucleicos no início da reação, menor é a quantidade de ciclos requeridos para gerar um número específico de produto. Portanto, o número de ciclos requeridos para a fluorescência chegar a um específico limiar de detecção (*threshold*) é inversamente correlacionado com a quantidade de ácidos nucleicos na amostra. A conversão do ciclo de quantificação (Cq) para a quantidade de ácidos nucleicos na amostra é obtida pela interpolação dos valores de Cq da amostra-teste, versus os valores de Cq da curva-padrão obtidos por meio de uma diluição seriada de DNA, para a qual a quantidade de *template* inicial é previamente conhecida.

Um dos principais entraves na análise de dados quantitativos é a obtenção de dados imprecisos ou pouco acurados. É necessário ter em mente que: (1) um resultado pode ser preciso, mas, ao mesmo tempo, precisamente errado; (2) uma quantificação precisa não é a mesma coisa que uma quantificação acurada; (3) dados altamente acurados são difíceis de serem obtidos. Enquanto a precisão se refere à reprodutibilidade e à repetibilidade, a acurácia é a medida de concordância entre os valores experimentalmente obtidos e o valor real, o qual provavelmente é desconhecido.

A qPCR possui uma amplificação exponencial de moléculas-alvo. Assumindo que a eficiência de amplificação (E) é de 100%, cada molécula de DNA será duplicada a cada ciclo. Desta forma, é possível extrapolar o número de moléculas que havia no início da reação, utilizando a fórmula ($N_n = N_0 \times 2^n$). Entretanto, na vida real, uma E de 100% dificilmente é obtida, e um modelo matemático mais apropriado e que leva em conta a E pode ser baseado na equação: $N_n = N_0(1 + E)^n$.

Outra propriedade importante da qPCR é a influência do número de cópias de DNA no início da reação. A obtenção de dados quantitativos a partir de amostras contendo 1.000 cópias de DNA-alvo no início da reação é muito acurada. Por outro lado, amostras que contenham número de cópias inicial menor que 1.000, fazem com que a estimativa do número de moléculas-alvo seja dificultada. Uma molécula de DNA ao final de um ciclo de amplificação pode ser duplicada ou, ainda, permanecer como uma única molécula. De fato, se a E é de 0,8, há probabilidade de 20% que, após um ciclo de amplificação, ela ainda permaneça como uma simples cópia. Essa incerteza de amplificação é correlacionada com a E : Uma amostra contendo 100 cópias de DNA-alvo no início da reação possui uma incerteza de 10%, se a E for de 0,9, mas essa incerteza aumenta dramaticamente para 25%, se a E for de 0,5.

Quando amostras contendo baixo número de cópias de DNA *template* no início da reação são medidas por qPCR, pode ser observado alta diferença no número de cópias entre as réplicas. Essa diferença no número de cópias entre as réplicas pode ser explicada pelo "Efeito de Monte Carlo", uma inerente limitação da qPCR quando amostras contendo baixa concentração de DNA são analisadas.

O cerne da quantificação de ácidos nucleicos por qPCR está pautado na eficiência de amplificação. De forma simplificada, a quantificação absoluta refere-se em comparar uma amostra desconhecida com um padrão externo (curva-padrão), cuja concentração de DNA é previamente conhecida. A curva-padrão pode ser preparada usando DNA genômico, Gblocks, DNA plasmidial, RNAs, etc., cada um com suas vantagens e desvantagens. Além de ser um passo crucial para a realização da qPCR, a curva-padrão fornece informações vitais que asseguram a qualidade da reação. Dentre essas, os resultados da eficiência de amplificação (E), o quadrado do coeficiente de regressão (R_2), intercepto do eixo Y (y -intercepto) e o *Slope* mostram o quão acurado e sensível é seu teste. Os parâmetros para cada um dos indicadores ($[E = >90 \text{ ou } <105\%]$; $[R_2 = >0.980]$; $[slope = -3.32]$) devem ser verificados e respeitados, a fim de se obterem resul-

tados acurados.

Sendo assim, é possível, por exemplo, determinar o número de partículas virais na amostra de um paciente infectado ou avaliar o potencial de diferentes princípios ativos frente à infecção por bactérias, protozoários, helmintos, etc., entre pacientes humanos e animais. De posse dessas informações, pode-se avaliar a carga parasitária durante o curso da infecção e identificar qual princípio ativo possui melhor desempenho no tratamento de diferentes enfermidades.

4 HRM (*High Resolution Melting*)

A análise por *High Resolution Melting* (HRM) ou Dissociação de Alta Resolução é uma metodologia que pode ser utilizada tanto para o diagnóstico de agentes patogênicos quanto para avaliar variações genéticas (SNPs, mutações, metilação). Trata-se de uma análise muito sensível, que possibilita identificar variações de somente um nucleotídeo nas sequências de DNA (WITTEWERT et al., 2003). As amostras podem ser discriminadas de acordo com a sequência de nucleotídeos, comprimento da sequência, conteúdo GC ou complementariedade da cadeia.

O método baseia-se na detecção de pequenas diferenças nas curvas de dissociação das fitas de DNA. A técnica de HRM exige a utilização de reagentes empregados em ensaios de PCR convencional ou tempo real com a adição de um intercalante de DNA que emite fluorescência (fluoróforo). Após a realização da PCR e da amplificação do fragmento específico, há maior grau de fluorescência devido ao maior número de DNA em fita dupla. Após a PCR, a análise de HRM começa. A temperatura na qual 50% do DNA está desnaturado e 50% está em fita dupla é conhecida como temperatura de "melting". A curva de dissociação é tipicamente realizada ao longo de uma ampla faixa de temperatura (50°C até cerca de 95°C) em incrementos pequenos ($\sim 0,3^\circ \text{C}$), durante um período de tempo (~ 10 segundos). Durante esse processo, a temperatura de dissociação do amplicon é atingida, e os dois filamentos de DNA separam-se. Variações nas sequências de DNA fazem com que ocorram mudanças em seus perfis de dissociação, registrados pelo equipamento para posterior montagem de uma curva de dissociação em alta resolução.

Para acompanhar a transição de DNA de fita dupla (dsDNA) para DNA de fita simples (ssDNA), são utilizados corantes intercalantes. Estes corantes mostram uma emissão de fluorescência variável, a depender de sua associação com DNA de cadeia dupla ou simples. O SYBR Green I é um corante de primeira geração para HRM. Ele emite fluorescência quando intercalado em dsDNA, mas não quando livre em solução. Alguns trabalhos desencorajaram o uso de SYBR Green I para HRM, alegando que modificações substanciais de protocolo são necessárias (REED et al., 2007). Isso ocorre pela falta de precisão do referido fluoróforo, com o chamado fenômeno de "dye jumping", em que o fluoróforo de uma fita dissociada pode ser reincorporado em regiões de dsDNA que ainda não haviam dissociado (GUNDRY et al., 2003; REED et al., 2007). Novos fluoróforos, como o LC Green e o LC Green Plus, o ResoLight, o EvaGreen, o

Chromofy, SYTO 9 estão disponíveis no mercado e foram usados com sucesso para a HRM, haja vista que são intercalantes saturantes da molécula de DNA (MONTGOMERY et al., 2010).

5 LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification)

A amplificação circular isotérmica de DNA (LAMP) é um método desenvolvido para amplificar DNA com alta especificidade, eficiência e rapidez, em condições isotérmicas, fato que possibilita a não utilização de termocicladores para sua execução (NOTOMI et al., 2000).

Inicialmente, este método utilizava um conjunto de quatro oligonucleotídeos iniciadores, os quais reconhecem seis regiões distintas do DNA-alvo, sendo estes: os externos sense e antissense, e os internos sense e antissense. Estes últimos são, na verdade, oligonucleotídeos complementares a duas regiões distintas do DNA-alvo (NOTOMI et al., 2000). Posteriormente, foi verificado que a adição de dois novos oligonucleotídeos iniciadores poderia acelerar a reação, os quais foram denominados *loop primers* (NAGAMINE et al., 2002).

A enzima utilizada neste método, originalmente isolada do *Bacillus stearothermophilus* e denominada BST polimerase, possui atividade 5' → 3' polimerase, porém não possui atividade 5' → 3' e 3' → 5' exonuclease, o que permite a sua utilização em uma reação isotermal (NEW ENGLAND; BIOLABS, 2016). Portanto, não é necessária a utilização de três temperaturas distintas como classicamente empregadas nos protocolos de cPCR, a citar: temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão.

A LAMP possui alta eficiência em amplificar o DNA-alvo. É capaz de detectar baixo número de cópias de uma amostra de DNA-alvo, além de mostrar-se altamente específica (NOTOMI et al., 2000). Este método sofre menor interferência de inibidores de reação de amplificação de DNA quando comparada ao cPCR (KANEKO et al., 2007). Para sua realização, não é necessária a utilização de equipamentos sofisticados. O custo por reação é muito baixo (aproximadamente 1 dólar) (GRAB et al., 2011).

A visualização dos resultados da LAMP pode ser realizada por diferentes métodos. Inicialmente, a visualização dos resultados era baseada na eletroforese em gel de agarose contendo intercalantes de DNA (NOTOMI et al., 2000). Logo em seguida, perceberam que a turbidez formada pela presença de pirofosfato de magnésio, composto este formado durante a amplificação de DNA, poderia ser um método de visualização dos resultados (MORI et al., 2001). Ainda, a aquisição dos resultados pode ser realizada em aparelhos de PCR em tempo real, equipado com turbidômetro ou a olho nu, por meio da observação de turbidez nas amostras positivas, logo após a reação ser finalizada.

Posteriormente, outros métodos de revelação foram desenvolvidos, tais como a utilização de calceína, que inicialmente se liga aos íons de manganês (Mn^{+2}), ficando "abafada", sem emitir fluorescência; durante a reação, devido à formação de pirofosfato, a calceína perde o Mn^{+2} e emite fluorescência, que por sua vez é amplificada pela entrada de Mg^{+2} no lugar antes ocupado pelo

Mn²⁺ (TOMITA et al., 2008). Neste mesmo sentido, propuseram a utilização de probes marcadas com fluoróforos, para visualizar o resultado da reação a olho nu (MORI et al., 2006). Adicionalmente, pode-se adicionar SYBR Green I na amostra logo após o término da reação. Nesta condição, as amostras positivas mudam a cor para um tom de verde, possibilitando a visualização a olho nu, sem necessidade de equipamentos (NJIRU et al., 2008). Ainda, pode-se utilizar azul de hidroxinaftol para a revelação da reação. Neste caso, o produto da reação adquire cor azulada nas amostras positivas, ao passo que amostras negativas adquirem coloração roxa. Nesta última variação de revelação da reação, não se faz necessária a utilização de equipamentos sofisticados (GOTO et al., 2009), possibilitando a realização desta técnica em locais sem grandes recursos financeiros.

REFERÊNCIAS

ANNAKA, T. Rapid and simple detection of *Legionella* species by LAMP, a new DNA amplification method. **Rinsho Biseibutsu Jinsoku Shindan Kenkyukai shi = JARMAM: Journal of the Association for Rapid Method and Automation in Microbiology**, Gifu-shi, v. 14, n. 1, p. 25-30, 2002.

BUATES, S.; BANTUCHAI, S.; SATTABONGKOT, J.; HAN, E. T.; TSUBOI, T.; UDOMSANGPETCH, R.; SIRICHAISINTHOP, J.; TAN-ARIYA, P. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for clinical detection of *Plasmodium falciparum* gametocytes. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 414-420, 2010.

BURBULIS, I. E.; YAMAGUCHI, K.; NIKOLSKAIA, O. V.; PRIGGE, S. T.; MAGEZ, S.; BISSER, S.; RELLER, M. E.; GRAB, D. J. Detection of Pathogen-Specific Antibodies by Loop-Mediated Isothermal Amplification. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 22, n. 4, p. 374-380, 2015.

BUSTIN, S. A.; NOLAN, T. In: BUSTIN, S. A. *A-Z Quantitative PCR*. 2004, p. 218-268.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; UBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J. O.; WITTEWER, C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v.44, n.4, p. 611-622, 2009.

GRAB, D. J.; LONSDALE-ECCLES, J.; INOUE, N. LAMP for tadpoles. **Nature Methods**, New York, v. 2, n. 9, p. 635-635, 2005.

GRAB, D. J.; NIKOLSKAIA, O. V.; INOUE, N.; THEKISOE, O. M.; MORRISON, L. J.; GIBSON, W.; DUMLER, J. S. Using detergent to enhance detection sensitivity of African trypanosomes in human CSF and blood by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5, n. 8, p. e1.249, 2011.

GUNDRY, C.N.; VANDERSTEEN, J.G.; REED, G.H.; PRYOR, R.J.; CHEN, J.; WITTEWER, C.T. "Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes". **Clinical Chemistry** v.49, n. 3: p.396-406, 2003.

KANEKO, H.; KAWANA, T.; FUKUSHIMA, E.; SUZUTANI, T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, Amsterdam, v. 70, n. 3, p. 499-501, 2007.

KARANIS, P.; THEKISOE, O.; KIOUPTSI, K.; ONGERTH, J.; IGARASHI, I.; INOUE, N. Development and preliminary evaluation of a loop-mediated isothermal amplification procedure for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal and water samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 17, p. 5.660-5.662, 2007.

KIM, J.; LIM, J.; LEE, C. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. **Biotechnology Advances**, v.31, p. 1.358-1.373, 2013.

KUBOKI, N.; INOUE, N.; SAKURAI, T.; DI CELLO, F.; GRAB, D. J.; SUZUKI, H.; SUGIMOTO, C.; IGARASHI, I. Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 12, p. 5.517-5.524, 2003.

MONTGOMERY, J.L.; SANFORD, L.N.; WITTEWER, C.T. High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v.10, n.2, p.219-240, 2010.

MORI, Y.; NAGAMINE, K.; TOMITA, N.; NOTOMI, T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, n. 1, p. 150-154, 2001.

MORI, Y.; HIRANO, T.; NOTOMI, T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. **BMC Biotechnology**, London, v. 6, n. 1, p. 3, 2006.

NAGAMINE, K.; HASE, T.; NOTOMI, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. **Molecular and cellular probes**, London, v. 16, n. 3, p. 223-229, 2002.

NEW ENGLAND, BIOLABS. Bst DNA Polymerase, Large Fragment. Disponível em: < <https://www.neb.com/products/m0275-bst-dna-polymerase-large-fragment> >. Acesso em: 27 jan. 2016.

NJIRU, Z. K.; MIKOSZA, A. S.; ARMSTRONG, T.; ENYARU, J. C.; NDUNG'U, J. M.; THOMPSON, A. R. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 2, n. 2, p. e147, 2008.

NJIRU, Z. K.; MIKOSZA, A. S. J.; MATOVU, E.; ENYARU, J. C. K.; OUMA, J. O.; KIBONA, S. N.; THOMPSON, R. C.; NDUNG'U, J. M. African trypanosomiasis: sensitive and rapid detection of the sub-genus *Trypanozoon* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 589-599, 2008b.

NAVARRO, E.; SERRANO-HERAS, G. A.; CASTAÑO, M. J. A.; SOLERA, J. B. Real-time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v.439, p. 231-250, 2015.

NJIRU, Z. K.; OUMA, J. O.; BATETA, R.; NJERU, S. E.; NDUNGU, K.; GITONGA, P. K.; GUYA, S.; TRAUB, R. Loop-mediated isothermal amplification test for *Trypanosoma vivax* based on satellite repeat DNA. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 180, n. 3, p. 358-362, 2011.

NKOUAWA, A.; SAKO, Y.; NAKAO, M.; NAKAYA, K.; ITO, A. Loop-mediated isothermal amplification method for differentiation and rapid detection of *Taenia* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, n. 1, p. 168-174, 2009.

NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MASUBUCHI, H.; YONEKAWA, T.; WATANABE, K.; AMINO, N.; HASE, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 28, n. 12, p. e63, 2000.

PABINGER, S.; RÖDIGER, S.; KRIEGNER, A.; VIERLINGER, K.; WEINHÄUSEL, A. A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. **Bio-molecular Detection and Quantification**, v.1, p. 23-33, 2014.

REED, G.H.; KENT, J.O.; WITTEWER, C.T. "High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics". **Pharmacogenomics**, n. 8, v. 6, p. 597-608, 2007.

TOMITA, N.; MORI, Y.; KANDA, H.; NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. **Nature Protocols**, London, v. 3, n. 5, p. 877-882, 2008.

YANG, S.; ROTHMAN, R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. **Lancet** v.4, p.337-348, 2004.

CAPÍTULO VI

RESPOSTA ANTIOXIDANTE DE DEFESA NA INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO

Kevein Ruas de Oliveira

Leticia Rodrigues Alves

Ricardo Borjas Ventura

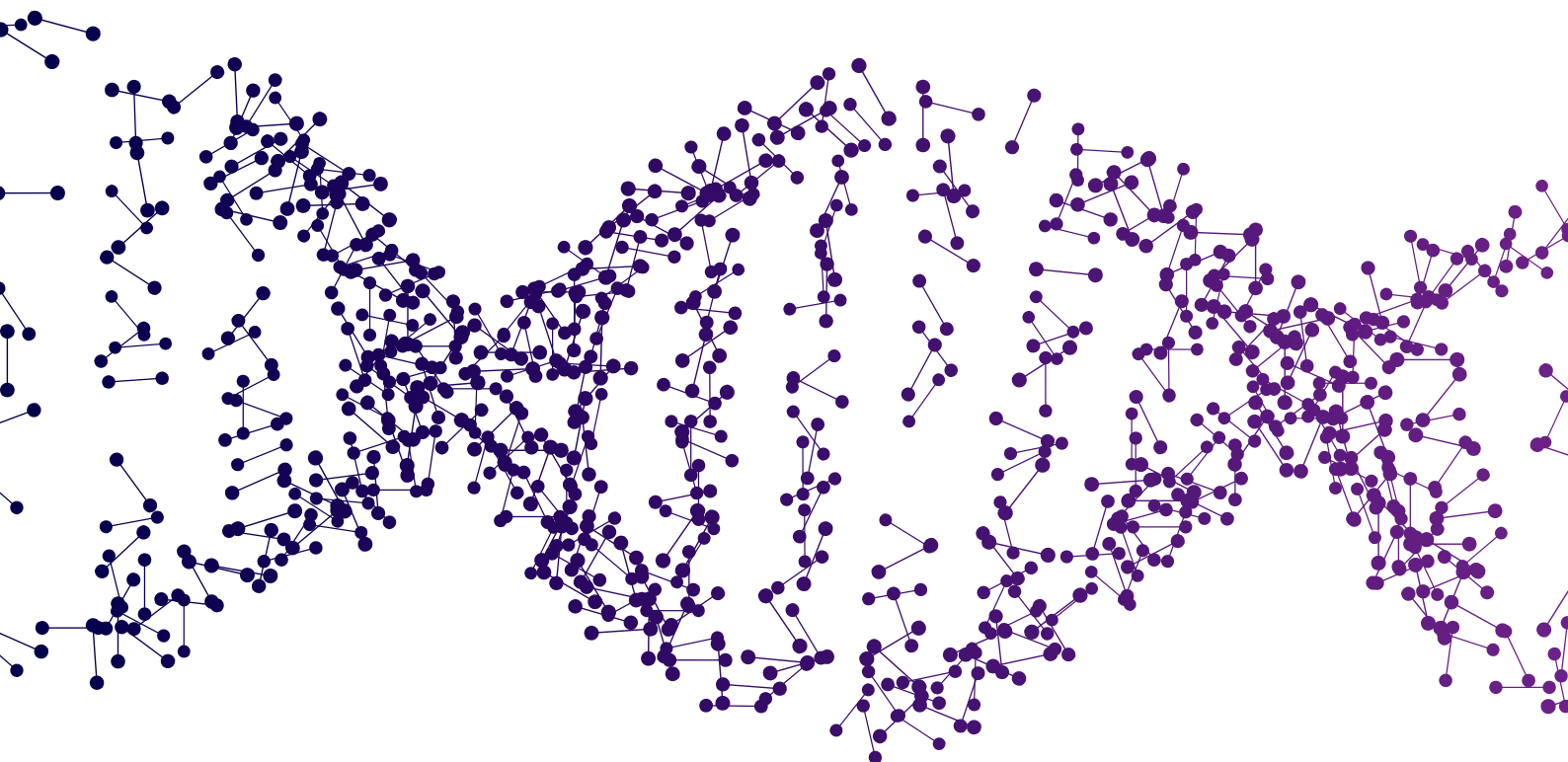
José Clebson Barbosa Lúcio

Priscila Lupino Gratão



CONTEÚDO

1	Introdução	65
2	Estresse biótico	66
3	Interação planta-patógeno	68
4	Resposta antioxidante de defesa	69
5	Perspectivas	71
	Referências	72



1 INTRODUÇÃO

A produção agrícola mundial de alimentos é constantemente afetada de forma severa por vários agentes abióticos e bióticos. Sendo assim, produzir alimentos em quantidade e qualidade adequadas para a crescente população tem-se tornado cada vez mais difícil, também devido aos efeitos negativos das alterações climáticas (KAYUM et al., 2016).

Todas as plantas dispõem de um complexo mecanismo de defesa, podendo apresentar o que chamamos de resistência natural, baseada em barreiras químicas e físicas preexistentes, ou dispõem de outro mecanismo de defesa eficiente, este denominado de induzido; sendo ativado apenas se a planta for submetida a algum estresse (LLORENS et al., 2017).

Os estresses podem ser classificados como abióticos ou bióticos (IMADI et al., 2015). Dentre os principais estresses abióticos, destacam-se a salinidade, a seca, o alagamento, a presença de metais pesados no solo e o aumento de temperatura (ASENSI-FABADO et al., 2017). Esses estresses interferem no crescimento e no desenvolvimento das plantas, acarretando perdas na produtividade. Com relação aos estresses bióticos, podemos destacar os insetos-praga, fungos, bactérias, vírus e nematoides, e ervas-daninhas. Os agentes de estresses bióticos privam diretamente o hospedeiro de seus nutrientes, levando ao menor vigor das plantas e, em casos extremos, à morte da planta hospedeira. Na agricultura, o estresse biótico é uma das principais causas de perdas pré e pós-colheita nas diferentes culturas (SINGLA; KRATTINGER, 2016). O rendimento das culturas é reduzido em cerca de 25% em função das doenças e da infestação de insetos (SAVARY et al., 2012).

Todas essas adversidades acabam por gerar um desequilíbrio na homeostase celular, levando a severas alterações no metabolismo do vegetal, as quais comprometem seu crescimento e 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 estresse (IMADI et al., 2015). Neste contexto, a mitigação dos diferentes estresses aos quais as plantas podem ser submetidas tem-se tornado um grande desafio para a comunidade científica.

Nas pesquisas desenvolvidas com estresses bióticos, o foco principal tem sido o estudo dos mecanismos de defesa das plantas, visando ao desenvolvimento de tecnologias e de produtos que possibilitem a geração de plantas mais resistentes, e que sejam economicamente viáveis e sustentáveis. Neste capítulo, será dado maior enfoque ao estresse biótico, que, assim como o abiótico, também acarreta superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO), como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxila ($OH^{\cdot}$), e outros produtos, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singleto (1O_2) (DEMIDCHIK, 2015).

O sistema antioxidante de defesa das plantas compreende os principais mecanismos de defesa contra a superprodução das EROs. Esse sistema é composto por várias enzimas e compostos não enzimáticos que atuam na eliminação das EROs, onde as enzimas antioxidantes apresentam alta afinidade com

EROs específicas, como a Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), Catalase (CAT, EC 1.11.1.6), Ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), Glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2), Monodeidroascorbato reductase (MDHAR, EC. 1.6.5.4), Deidroascorbato reductase (DHAR, EC 1.8.5.1), Glutathione peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9), Guaiacol peroxidase (GPX; EC 1.11.1.7), Peroxidase (POX; EC 1.11.1.7), Glutathione-S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) (CAVERZAN et al., 2016). Por outro lado, os antioxidantes não enzimáticos não são específicos para as EROs, como o ácido ascórbico (AsA), a glutathione (GSH), prolina, poliaminas, betaína, carotenos e flavonoides (ZAGORCHEV et al., 2013). Assim, para que a defesa seja efetiva, é necessário que tanto os compostos antioxidantes quanto as enzimas antioxidantes atuem em conjunto para interromper o processo descontrolado de oxidação e para evitar danos celulares (GRATÃO et al., 2005).

No caso dos estresses bióticos, as EROs têm-se mostrado fundamentais à indução de resistência em plantas. Nesse caso, as EROs são responsáveis, por exemplo, pela morte celular programada, numa tentativa de impedir a invasão do patógeno (TORRES, 2010). A morte celular, principalmente sob estresse biótico, é responsável por ativar uma resposta hipersensitiva, mediada por uma defesa sistêmica adquirida (ZURBRIGGEN et al., 2010). Além disso, a produção de EROs é fundamental para o reconhecimento bem-sucedido de determinado patógeno e para evitar a infecção através da ativação de defesas de plantas (ZURBRIGGEN et al., 2010; TORRES, 2010).

As EROs desempenham funções de sinalização multifacetada, median-do o estabelecimento de múltiplas respostas que podem atuar como toxinas locais. As EROs são responsáveis, também, por interações com outros sinais e fitormônios, o que pode estar relacionado às diversas formas de atuação das mesmas como sinalizadoras (Baxter et al., 2013). Embora a produção de EROs seja principalmente associada a estresses abióticos e ao ataque de patógenos, a mesma também ocorre em outras interações bióticas, incluindo simbioses benéficas com bactérias e micorrizas (TORRES, 2010). Isso indica que a produção de EROs é uma característica comum às diferentes interações entre plantas e patógenos, e entre plantas e organismos benéficos.

2 ESTRESSE BIÓTICO

As plantas estão inseridas em um ambiente complexo, no qual diversos organismos interagem com as mesmas. Muitos deles são fundamentais para a perpetuação das espécies vegetais. Um exemplo disso é a polinização, na qual a planta oferece o néctar, e em contrapartida os insetos transportam o pólen que possibilita a fecundação e a dispersão da espécie. Microrganismos também estabelecem relações simbióticas com as plantas, como, por exemplo, as associações mutualísticas entre raízes e fungos, formando as micorrizas, que permitem às plantas explorarem mais eficientemente os recursos do solo, o que aumenta a produtividade primária (KLIRONOMOS et al., 2000).

Além disso, as bactérias também estabelecem relações essenciais com as plantas. Existem bactérias do solo que são capazes de retirar diretamente

do ar o nitrogênio, em forma gasosa, e transformando-o em formas absorvíveis pelas plantas. Uma das associações mais conhecidas é a que ocorre entre várias espécies de leguminosas e as bactérias da família Rhizobiaceae, e pode ser verificada através da formação de nódulos nas raízes (GARG; GEETANJALI, 2007). Em recente estudo, uma variedade de gêneros bacterianos associados a plantas halotolerante *Suaeda fruticosa* (L.) foi identificada (ASLAM; ALI, 2018). Surpreendentemente, várias cepas bacterianas mostraram a capacidade de aumentar o crescimento de plantas de milho sob condições de estresse salino, e isso foi parcialmente associado com maior atividade antioxidante das plantas induzida pelas bactérias. Esta descoberta mostra o potencial da microbiota associada às plantas para a aplicação como proteção biológica contra o estresse abiótico e sugere que as bactérias podem estimular as plantas para um maior potencial de proteção celular e aumentar a produtividade agrícola sob condições ambientais adversas.

No entanto, nem sempre as relações entre plantas e os demais organismos são positivas. As plantas são constantemente atacadas por pragas e doenças causadas por insetos, nematoides, ácaros, fungos e bactérias, que podem levar a perdas na produtividade agrícola e a grandes prejuízos aos produtores.

Dentre essas doenças, a ferrugem da Soja (*Phakopsora pachyrhizie*) é uma doença que causa desfolha precoce, impedindo a completa formação dos grãos, sendo acarretada por um fungo que se dissemina pelo ar (BROMFIELD, et al., 1980). Como medida de controle, devem ser aplicados fungicidas, o que ocasiona grande impacto no custo de produção e na qualidade do solo.

Por outro lado, o Mofo-Branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) é uma doença que acomete diversas culturas, e seu manejo é complexo. Os primeiros sintomas podem ser identificados por lesões encharcadas nas folhas ou qualquer outro tecido da parte aérea da planta. Nos tecidos infectados, aparece uma eflorescência branca que forma o micélio. A principal forma de controle é a rotação de culturas e o uso de variedades resistentes, além de produtos químicos e biológicos. A Mosca-Branca (*Bemisia tabaci*) é uma praga que dispersa diversos vírus em várias culturas e é de difícil controle. Os produtos registrados disponíveis precisam da alternância de mecanismos de ação para evitar a resistência genética. Os Nematoides (*Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne incognita*, *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus*) são pragas consideradas pelas principais sociedades científicas internacionais como um problema para a produção agrícola (CAMPBELL et al., 1990).

As plantas percebem e respondem ao ataque de pragas e doenças por um repertório de mecanismos que regulam a expressão gênica, a fim de maximizar as chances de sobrevivência. A defesa das plantas contra patógenos microbianos e herbívoros envolve a regulação da expressão gênica para a síntese de metabólitos secundários de defesa e uma série de proteínas específicas (HOWE; JANDER, 2008; MITHOFER; BOLAND, 2012). As plantas baseiam-se na imunidade inata de cada célula e nos sinais sistêmicos que emanam dos locais de infecção (JONES; DANGL, 2006). Além disso, os hormônios vegetais desempenham papéis essenciais durante a sinalização de defesa sistêmica (RO-

BERT-SEILANIANZ et al., 2011). Por exemplo, o ácido salicílico desencadeia principalmente resistência a patógenos biotróficos e hemibiotróficos, enquanto uma combinação de ácido jasmônico e de etileno ativa a resistência contra patógenos necrotróficos (ROBERT-SEILANIANZ et al., 2011).

3 INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO

Durante o processo evolutivo, as plantas vêm interagindo molecularmente de forma complexa com herbívoros e microrganismos epifíticos, simbióticos e patogênicos (CHISHOLM et al., 2006). Estes patógenos podem ser divididos em duas categorias de acordo com seu estilo de vida. Os biotróficos, que se alimentam do tecido da planta hospedeira viva, e os necrotróficos, que causam a morte do hospedeiro pela secreção de toxinas ou enzimas para se alimentarem dos restos dos tecidos (THOMMA et al., 2001; GLAZE BROOK. 2005).

Dentro das especificidades, vírus, fungos, bactérias, nematoides, insetos, herbívoros e plantas parasitas podem agir fisicamente usando ou modificando os plasmodesmas no processo de infecção, explorando as estruturas celulares para disseminação de efetores, induzindo mudanças nos hormônios do hospedeiro para o tráfego simplástico de nutrientes, e/ou danificando mecanicamente as paredes das células do hospedeiro, resultando em danos bioquímicos e fisiológicos nas plantas hospedeiras (GANUSOVA, 2018).

Devido a esta constante exposição a vários patógenos, as plantas elaboraram estratégias de contra-ataque para se defender. Neste sentido, as interações planta-patógeno são classificadas em compatíveis, onde o patógeno é virulento e o hospedeiro é suscetível, e incompatíveis onde o patógeno é avirulento e o hospedeiro é resistente (JONES; DANGL, 2006).

Nas interações incompatíveis, o sistema de defesa da planta é eficientemente ativado, conduzindo à resistência. Isso se dá devido ao reconhecimento entre elicitor-receptor que ativa as respostas de defesa da planta de maneira rápida, impedindo que a doença se instale. Na interação compatível, não há o reconhecimento do elicitor da planta, de forma que não existe um estímulo para a ativação de suas respostas de defesa (PIETERSE et al., 2012). Essas interações podem ocorrer entre patógenos que não codificam o elicitor, patógenos virulentos e plantas com ou sem o receptor; ou ocorre entre patógenos avirulentos, os quais possuem o elicitor, e plantas que não possuem o alelo de resistência que codifica o receptor, condicionando o desenvolvimento da doença (GAUR et al., 2014).

Mais recentemente, a patologia de plantas tem atentado para interações de plantas com múltiplas espécies e/ou genótipos de patógenos ao mesmo tempo (TOLLENAERE et al., 2017). Essa relação é conhecida como coinfeção e apresenta três principais causas de danos em plantas: complexos de patógeno-hospedeiro, patógeno-patógeno e hospedeiro-patógenos múltiplos. Essas interações podem levar a vários resultados: antagonismo, sinergismo, coexistência, mutualismo ou cooperação. O nível de dano da doença que a planta experimenta varia, dependendo do resultado das interações e das respostas corresponden-

tes do hospedeiro (ABDULLAH et al., 2017).

Nestas variadas formas de interação planta-patógeno, durante a ação de um patógeno em uma planta, há uma explosão oxidativa através da produção rápida de ERO, como H_2O_2 , $O_2^{\cdot -}$ e $OH^{\cdot}$, e ela está envolvida em um sistema integrado e amplificado de sinalização para respostas ao estresse. Esse sistema ativa respostas de defesa mediadas por proteínas que passam por um processo reversível de fosforilação e desfosforilação, são as proteínas quinases (DODDS; RATHJEN, 2010).

Como resultado desses processos, estão a coexpressão gênica, as interações proteína-DNA, interação RNA não codificante (ncRNA), interação ncRNA-proteína, interação proteína-proteína e redes de reações metabólicas, que agem traduzindo o fluxo de informações sob diferentes condições ambientais e celulares a que a planta está exposta (GARBUETT et al., 2014). Em contraste, os componentes moleculares patogênicos interferem nesses módulos e reconectam o fluxo de informações para seu benefício (PAJEROWSKA-MUKHTAR et al., 2013). Em particular, nas interações com vírus, devido à alta taxa de mutação dos mesmos, os genomas virais e suas formas replicativas, como RNA de fita dupla, são bastante conservados e, em muitos casos, as plantas percebem-nos como sinais exógenos, disparando a ativação do silenciamento gênico como resposta de defesa (CONTI et al., 2017).

A interação gene a gene pode ser caracterizada por dois fenótipos principais. O primeiro é a resposta de hipersensibilidade (HR), na qual há morte celular programada das células que circundam o local de infecção inicial, acarretando o fenótipo de necrose local do tecido do hospedeiro, o que limita a propagação do patógeno. O segundo é a resistência sistêmica adquirida (SAR), a que ocorre em tecidos distantes do local inicial de infecção e pode durar por semanas. Esta interação confere imunidade ao patógeno que desencadeou a resposta de resistência ou àqueles proximamente relacionados, processo conhecido como *priming* (SAGOR et al., 2012).

Além do sistema imune da planta, há também barreiras constitutivas, como a parede celular e a cutícula, assim como alguns fitormônios, como ácido jasmônico (JA) e salicílico (SA), os quais têm uma forte interação juntamente com etileno, atuando na resposta de defesa das plantas. Porém, sabe-se que o JA e o SA possuem efeitos antagônicos nessa resposta. O JA está envolvido nas respostas de defesa de patógenos necrotróficos, enquanto o SA participa na defesa de patógenos biotróficos, pois uma vez que esse último fitormônio está envolvido na HR, a morte celular priva o patógeno dos nutrientes, resultando na resistência da planta (ZEVALLOS et al., 2013).

4 RESPOSTA ANTIOXIDANTE DE DEFESA

Todas as plantas interagem com uma série de fatores bióticos (Figura 1). No caso das plantas cultivadas, existem estudos que relatam a queda no rendimento de diversos cultivos por causa das pragas e doenças a nível global. Estima-se que fitopatógenos causem perdas de cerca de 16% na produtividade

das culturas (FICKE et al., 2017).

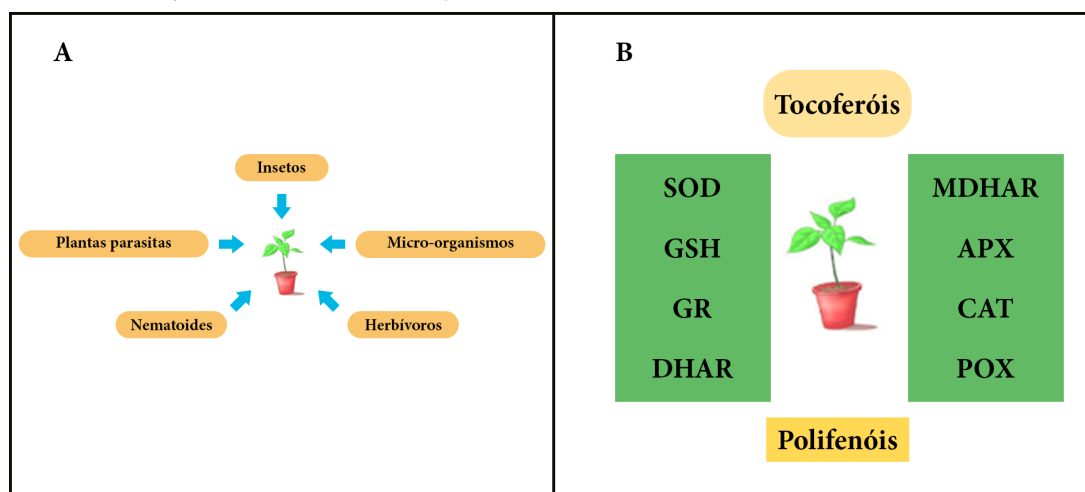


Figura 1. A) Fatores bióticos que afetam o rendimento das plantas cultivadas (Modificado de Das et al., 2016). B) Compostos enzimáticos e não enzimáticos produzidos em plantas sob estresse biótico.

Quando os patógenos entram em contato com as plantas, dentro delas, ocorre uma sobreprodução de EROs, as quais atacam diversas partes da célula vegetal, como membranas, proteínas, DNA e RNA, causando a morte celular (DAS et al., 2016).

Devido às perdas causadas por fatores bióticos externos (pragas e doenças), é conveniente entender como as plantas podem defender-se deles. Este capítulo focará principalmente nas respostas enzimáticas e não enzimáticas que ocorrem nas interações planta-patógeno.

Dentre os sistemas enzimáticos, temos a SOD, considerada a primeira linha de defesa, já que dismuta o superóxido em H_2O_2 . Segundo Cvetkovska e Vanlerberghe (2012), *Psuedomona syringae* pv maculícola incrementou a atividade da Cu/Zn-SOD em *Nicotiana tabacum*. Em outro estudo, Jiang et al. (2015) apontaram que maior atividade de SOD encontra-se associada a maior tolerância da uva a *Botrytis cinérea*.

Por outro lado, as peroxiadases (POX) transformam o H_2O_2 em H_2O . Além de terem um papel relevante na proteção das plantas contra o ataque das doenças, por exemplo, em *Capsicum annuum* L. Abhayashree et al. (2016) reportaram que uma alta atividade das POX se encontra relacionada com a resistência a *Colletotrichum capsici*. Resultados similares foram apontados por Sathiyabama e Mnikandan (2016) no cultivo de *Eleusine coracana*, onde o aumento da atividade de POX teve uma influência positiva contra *Pyricularia grisea*.

A catalase (CAT) é um tipo de peroxidase que dismuta o H_2O_2 em água e oxigênio. Esta enzima é determinante na desintoxicação pelo excesso na síntese de H_2O_2 . Zhou et al. (2015) relataram que uma alta atividade da CAT se encon-

tra relacionada à tolerância de *Citrus sinensis* a *Colletotrichum gloeosporioides*.

Outro mecanismo para eliminar o excesso de H_2O_2 é através do ciclo Glutathiona-Ascorbato. Este ciclo está formado por diferentes enzimas (Glutathione reductase (GR), Ascorbate Peroxidase (APX), Deidroascorbato Redutase (DHAR), Monodeidroascorbato reductase (MDHAR)) e moléculas não enzimáticas, como a Glutathione (GSH), Glutathione oxidada (GSSG), Ascorbato, Deidroascorbato e Monodeidroascorbato.

Em relação à atividade do ciclo Glutathiona-Ascorbato, pesquisadores como Zhou et al. (2015) mostraram a ligação entre maior atividade desse ciclo e a maior tolerância de *C. sinensis* a *Colletotrichum gloeosporioides*.

Além da resposta enzimática, a planta conta com compostos não enzimáticos que ajudam a combater o estresse biótico. Abhayashree et al. (2016) e Zhou et al. (2015) relataram que os compostos fenólicos, por exemplo, têm um papel relevante na proteção de *N. tabacum* e *C. sinensis* sob estresse biótico.

Os dados mostrados permitem inferir a importância do estudo das respostas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas das plantas perante o ataque de diferentes doenças, já que a atividade e a concentração delas estão relacionadas ao nível de resistência e tolerância das plantas aos patógenos. Estes dados devem ser levados em conta por melhoristas com o intuito de se criar cultivares com maior resistência a diversos fatores bióticos.

5 PERSPECTIVAS

A partir da literatura consultada, foi possível perceber que, no caso dos estresses bióticos, as EROs, são fundamentais à indução de resistência em plantas, sendo responsáveis também por interações com outros sinais e fitormônios, principalmente para a ativação de genes de resistência. Diante do exposto, a interação entre planta e patógeno é bastante complexa. Assim, o entendimento dos eventos e mecanismos biológicos, bioquímicos, fisiológicos, moleculares e genéticos de ambos, e da interação entre eles, é de fundamental importância para o controle das doenças e a redução dos danos que acarretam perdas na produção agrícola mundial.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, A. S.; MOFFAT, C. F.; LOPEZ-RUIZ, F. J.; GIBBERD, M. R.; HAMBLIN, J.; ZERIHUN, A. **Host–Multi-Pathogen Warfare: Pathogen Interactions in Co-infected Plants.**

ABHAYASHREE, M.; MURALI, M.; AMRUTHESH, K. Abiotic elicitors mediated resistance and enhanced defense related enzymes in *Capsicum annuum* L. against anthracnose disease. **Scientia Horticulturae**, 204(2), p.172-178, 2016.

AGUIAR, L. H. M., et al. Resistance of cotton genotypes to *Sclerotinia sclerotiorum* by the straw and oxalic acid tests. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 53, n. 11, p. 1.281-1.284, nov. 2018.

ASENSI-FABADO, M. A.; AMTMANN, A.; PERRELLA, G. Plant responses to abiotic stress: the chromatin context of transcriptional regulation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, 1860(1), p.106-122, 2017.

ASLAM, F.; ALI, B. Halotolerant Bacterial Diversity Associated with *Suaeda fruticosa* (L.) Forssk. Improved Growth of Maize under Salinity Stress. *Agronomy* 2018, 8, 131. Baxter, A., Mittler, R., & Suzuki, N. ROS as key players in plant stress signalling. **Journal of experimental botany**, 65(5), p.1.229-1.240, 2013.

BROMFIELD, K. R.; MELCHING, J. S.; KINGSOLVER, C. H. Virulence and aggressiveness of *Phakopsora pachyrhizi* isolates causing soybean rust. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, n. 1, p. 17-21, 1980.

CAVERZAN, A.; CASASSOLA, A.; BRAMMER, S. P. Reactive oxygen species and antioxidant enzymes involved in plant tolerance to stress. **In: Abiotic and biotic stress in plants-Recent advances and future perspectives.** InTech, 2016.

CHISHOLM, S.T.; COAKER, G.; DAY, B.; SLASKAWICZ, B. J. 'Host-microbe interaction: Shaping the Evolution of the plant immune response', *Cell*, 124 (4), p. 803, 2006.

CONTI, G.; RODRIGUEZ, M.C.; VENTURUZZI, A.L.; ASURMENDI, S. 'Modulation of host plant immunity by Tobamovirus proteins', **Annals of Botany**, 119, p. 737-747, 2017.

CVETKOVSKA, M. E.; VANLERBERGHE, G. Alternative oxidase impacts the plant response to biotic stress by influencing the mitochondrial generation of reactive oxygen species. **Plant, Cell & Environment**, 2012.

DAS, S.; PATRA, J.; THATOI, H. Antioxidative response to abiotic and biotic stresses in mangrove plants: A review. **International Review of Hydrobiology** 101, p.3-19, 2016.

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. **Environmental and experimental botany**, 109, p.212-228, 2015.

DODDS, P.N.; AND RATHJEN, J.P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics** 11, p.539. 2010.

FICKE, A.; COWGER, C.; BERGSTROM, G.; BRODAL, B. Understanding yield loss and pathogen biology to improve disease management: Stagonospora nodorum blotch-a case study in wheat. **Plant Disease** 102, p.696-707, 2017.

GANUSOVA, E. E.; BURCH-SMITH, T. M. Review: Plant-pathogen interactions through the plasmodesma prism. **Plant Science**, 2018.

GARBUTT, C. C.; BANGALORE, P. V.; KANNAR, P.; MUKHTAR, M. S. 'Getting to be edge: Protein dynamical networks as a new fronteir in plant-microbe interactions. **Front. Plant Sci.** 5: p.312, 2014.

GARG; GEETANJALI, N.; GARG, GEETANJALI. Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signaling: A review. **Agronomy for Sustainable Development**.

GLAZEBOOK, J. (2005) 'Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens.', **Anual review of phytopathology**, 43, p. 205-227, 2007.

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**, 32(6), p.481-494, 2005.

HOWE, G. A.; JANDER, G. Plant immunity to insect herbivores. **Annu. Rev. Plant Biol.**, 59, p.41-66, 2008.

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**, 94(3), p.525-537, 2015.

JIANG, L.; JIN, P.; WANG, L.; YU, X.; WANG, H.; ZHENG, Y. Methyl jasmonate primes defense responses against *Botrytis cinerea* and reduces disease development in harvested table grapes. **Scientia Horticulturae**, 192, p.218-223, 2015.

JONES, J.; DANGL, J. 'The plant immune system', **Nature**, 444 (7117), p.323-329.

KAYUM, M. A.; KIM, H. T.; NATH, U. K.; PARK, J. I.; KHO, K. H.; CHO, Y. G.; NOU, I. S. (2016). Research on biotic and abiotic stress related genes exploration and prediction in *Brassica rapa* and *B. oleracea*: a review. **Plant Breeding and Biotechnology**, 4(2), p.135-144, 2006.

KLIRONOMOS, J. N.; MCCUNE, J.; HART, M.; NEVILLE, J. The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity. **Ecology letters**, 3(2), p.137-141, 2000.

KOZANITAS, M.; OSMUNDSON, T. W.; LINZER, R.; GARBELOTTO, M. Interspecific interactions between the Sudden Oak Death Pathogen *Phytophthora ramorum* and two sympatric *Phytophthora* species in varying ecological conditions. **Fungal Ecol.** 28, p.86-96, 2017.

LLORENS, E.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; LAPEÑA, L. Advances in induced resistance by natural compounds: towards new options for woody crop protection. **Scientia Agricola**, 74(1), p.90-100, 2017.

MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Plant defense against herbivores: chemical aspects. **Annual review of plant biology**, 63, p.431-450, 2012.

PAJEROWSKA-MUKHTAR, K. M.; EMERINE, D. K.; MUKHTAR, M. S. Tell me more: Roles of NPRs in plant immunity. **Trends Plant Sci.** 18: p.402-411, 2013.

PIETERSE C.M.J.; VANDER DOES, D.; ZAMIOUDIS, C.; et al. Hormonal modulation of plant immunity. **Annu Rev Cell Dev Biol** 28: p.489- 521, 2012.

PINTO-ZEVALLOS, D. M.; MARTINS, C. B.; PELLEGRINO, A. C. ; ZARBIN, P. H. G. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. **Quim Nova** 36: p.1.395-1.405, 2013

ROBERT-SEILANIANZ, A.; GRANT, M.; JONES, J. D. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. **Annual review of phytopathology**, 49, p.317-343, 2011.

SAGOR, G.H.; TAKAHASHI, H.; NIITSU, M.; TAKAHASHI, Y.; BERBERICH, T.; KUSANO, T. 'Exogenous thermospermine has activity to induce a subset of the defense genes and restrict cucumber mosaic virus multiplication in *Arabidopsis thaliana*.' **Plant cell reports**, 31(7), p. 1.227-1.232, 2012.

SATHIYABAMA, M.; MANIKANDAN, A. Chitosan nanoparticle induced defense responses in finger millet plants against blast disease caused by *Pyricularia grisea* (Cke.) **Sacc. Carbohydrate polymers**, 154, p.241-246, 2016.

SAVARY, S.; FICKE, A.; AUBERTOT, J. N.; HOLLIER, C. **Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security**, 2012.

SINGLA, J.; KRATTINGER, S. G. Biotic stress resistance genes in wheat. In: WRIGLEY, C.W.; FAUBION, J.; CORKE, H.; SEETHARAMAN, K. **Encyclopedia of Food Grains**. Oxford: Elsevier, p.388-392, 2016.

TOLLENAERE, C.; LACOMBE, S.; WONNI, I.; BARRO, M.; NDOUGONNA, C.; GNACKO, F. et al. Virus-bacteria rice co-Infection in Africa: field estimation, reciprocal effects, molecular mechanisms, and evolutionary implications. **Front. Plant Sci**, 2017.

TORRES, M. A. ROS in biotic interactions. **Physiologia Plantarum**, 138(4), p.414-429.

ZAGORCHEV, L.; SEAL, C.; KRANNER, I.; ODJAKOVA, M. (2013). A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress. **International journal of molecular sciences**, 14(4), p.7.405-7.432, 2010.

ZHOU, Y.; LI, S.; ZENG, K. Exogenous nitric oxide-induced postharvest disease resistance in citrus fruit to *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 96, p.505-512, 2015.

ZURBRIGGEN, M. D.; CARRILLO, N.; HAJIREZAEI, M. R. ROS signaling in the hypersensitive response: when, where and what for? **Plant signaling & behavior**, 5(4), p.393-396, 2010.

CAPÍTULO VI

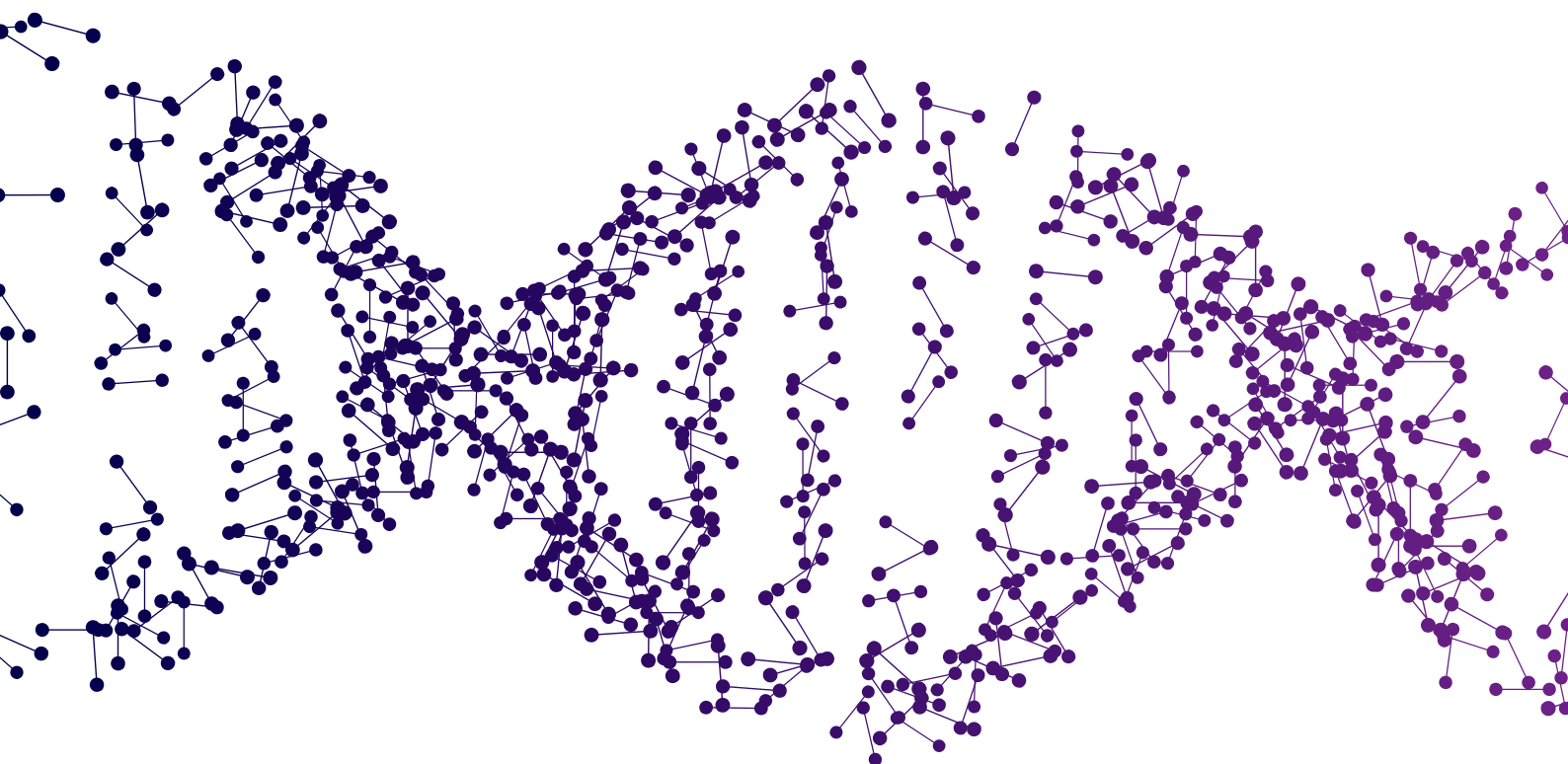
NOVAS MOLÉCULAS BACTERIANAS PARA O MANEJO DE RESISTÊNCIA DE PRAGAS AGRÍCOLAS

Tereza Cristina Luque Castellane
Raquel Oliveira Moreira
Jardel Diego Barbosa Rodrigues
Maria Helena Zanetti
Janete Aparecida Desidério



CONTEÚDO

1	Introdução	79
2	Microrganismos alternativos para o Manejo da Resistência de pragas agrícolas.....	80
2.1	<i>Pseudomonas</i> spp.	80
2.2	<i>Chromobacterium subtsugae</i>	81
2.3	Exopolissacarídeos com atividade inseticida	82
2.4	Considerações Finais	83
	Referências	84



1 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se como um dos maiores exportadores agrícolas do mundo, mostrando que o setor agrícola é o grande responsável por impulsionar a economia nacional. Dentre os desafios que o setor enfrenta para alcançar grandes resultados, estão as pragas agrícolas, que anualmente causam perdas de até 55 bilhões de reais ao agronegócio brasileiro e de quase 5% do PIB mundial.

Na tentativa de reduzir essas perdas, ainda hoje, o controle desses agentes é comumente realizado através de aplicações de inseticidas, como organofosforados, neonicotinoides e inibidores da quitina-biossíntese, que podem ter eficácia limitada devido à natureza crítica das diferentes pragas agrícolas, dentre as quais, *Diatraea grandiosella* (Dyar) (Lepidoptera: Crambidae), *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), que vivem em diferentes microclimas. Como alternativa ao controle realizado por meio dos inseticidas sintéticos, surgiu o controle biológico, sendo a bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) um dos agentes de controle biológico de maior destaque nesse contexto. Esta bactéria apresenta a capacidade de produzir e secretar diversas proteínas com atividade inseticida, tais como: δ -endotoxinas (proteínas Cry e Cyt) e proteínas inseticidas vegetativas (Vip) (HANSEN; SALAMITOU, 2000).

No entanto, as populações de diversas pragas são notórias pelo rápido desenvolvimento de resistência a inseticidas sintéticos (ROGERS; BRIER, 2010; OMOTO, 2015) e ao modo de ação das toxinas Bt, seja pela utilização de bioinseticidas, seja de culturas geneticamente modificadas (BERNARDI et al., 2017; FATORETTO, 2017). Por exemplo, o milho Bt é uma das principais táticas para gerenciar as populações *S. frugiperda* no Continente Americano, mas a adoção em grande escala da tecnologia e a contínua expressão de toxinas Cry nas plantas Bt exercem forte pressão de seleção para o desenvolvimento de resistência na população (BERNARDI et al., 2017; MARQUES et al., 2017; FATORETTO, 2017). Isso mostra a importância da tecnologia nos âmbitos agrônômicos, econômicos e ambientais, que consequentemente refletem em toda a cadeia produtiva. Apesar das vantagens, a intensiva adoção dessa tecnologia traz preocupações. O risco de desenvolvimento de resistência é aumentado por causa do sistema agrícola intensivo em regiões tropicais, que geralmente têm sobreposição temporal e espacial de diferentes culturas de Bt (BALDIN; SILVA; SILVA, 2017).

Na busca por alternativas eficazes ao uso de inseticidas químicos e das tecnologias Bt no controle de pragas agrícolas, atualmente, são demandadas alternativas sustentáveis para controlar as espécies-praga de diversos cultivos, especialmente grãos, com princípios ativos que não degradem o meio ambiente, a biodiversidade e principalmente a saúde do agricultor e do consumidor. Neste contexto, a seguir, serão pontuadas algumas novas e potenciais moléculas bacterianas com atividade inseticida.

2 MICRORGANISMOS ALTERNATIVOS PARA O MANEJO DA RESISTÊNCIA DE PRAGAS AGRÍCOLAS

2.1 *Pseudomonas* spp.

As bactérias do gênero *Pseudomonas* são conhecidas por sua ampla distribuição por diversos ambientes, como solo, água, superfície de plantas e animais, capacidade de utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos como fonte de energia e produção de um conjunto notável de exoenzimas, toxinas e metabólitos secundários (RANGEL et al., 2016). Além destas características, foram relatadas recentemente que essas bactérias produzem moléculas com atividade inseticida, podendo assim ser utilizadas no Manejo da Resistência de Pragas (MIP).

Desde 2009, foram descritas mais de 70 novas espécies, sendo que nos últimos 3 anos houve, em média, a identificação de 10 novas espécies por ano (PEIX; RAMÍREZ-BAHENA; VALÁZQUEZ, 2018). Nesta diversidade, encontramos espécies que são nocivas a humanos, *Pseudomonas aeruginosa*, a plantas, *Pseudomonas syringae*, já outras são conhecidas por sua capacidade de biorremediação de poluentes, *Pseudomonas putida*, e efeitos benéficos em plantas, como na melhora da sanidade vegetal e na produção agrícola, *Pseudomonas fluorescens* (FLURY et al., 2016).

Vários trabalhos têm mostrado o potencial da utilização de bactérias do gênero *Pseudomonas* para o controle de insetos-praga. Estes estudos resultaram na descoberta de uma ampla variedade de moléculas que contribuíram ou foram efetivas para o controle, como as proteínas Fit de *Pseudomonas fluorescens* CHA0 e *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391, contra *Spodoptera littoralis*, *Heliothis virescens* e *Plutella xylostella* (RUFFNER et al., 2013); do cianeto de hidrogênio e diferentes tipos de lipopeptídeos cíclicos de *Pseudomonas protegens* CHA0, *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 e *Pseudomonas* sp. CMR12a avaliados em *G. mellonella* e *Plutella xylostella* (FLURY et al., 2017); de lipopeptídeos xantholysins A e B de *Pseudomonas* sp. DJ15 em *Myzus persicae* (LIM et al., 2017); de análogos de rizoxina, orfamida A e quitinase de *Pseudomonas protegens* Pf-5 em *Drosophila melanogaster* (LOPER et al., 2016).

Além da descoberta destas moléculas, já temos também o desenvolvimento de plantas transgênicas com genes de *Pseudomonas* eficazes no controle de praga da ordem coleóptero. Schellenberger et al. (2016) e Wei et al. (2018), avaliando a eficiência das plantas transgênicas com genes de *Pseudomonas* no controle da *Diabrotica virgifera virgifera*, na cultura do milho, constataram que a proteína IPD072Aa de *Pseudomonas chlororaphis* e a proteína PIP-47Aa isolada de *Pseudomonas mosselii* apresentaram eficácia em controlar a *D. virgifera virgifera*, assim como das pragas secundárias *Diabrotica barberi*, *Diabrotica undecimpunctata*, *Howardia*, *Diabrotica speciosa* e *Phyllotreta cruciferae*. Esses resultados colocam-nos frente a possíveis novos mecanismos de ação e a novas alternativas ao manejo da resistência dos insetos.

2.2 *Chromobacterium subtsugae*

Embora pouco explorada no manejo integrado de pragas, a bactéria Gram-negativa *Chromobacterium subtsugae* (Betaproteobacteria) é um entomopatôgeno interessante no desenvolvimento de produtos orgânicos inseticidas ou como fonte doadora de genes para a piramidação de eventos transgênicos, em combinação com toxinas de *B. thuringiensis*.

As bactérias *C. subtsugae* são saprófitas, aeróbicas facultativas, com temperatura ótima de crescimento, entre 25–30° C, pH 6,5–8,0 e não patogênicas para células humanas (MARTIN et al., 2007). Uma característica da *C. subtsugae* refere-se à formação de colônias de pigmentação púrpura intensa, produto de um metabólito secundário chamado violaceína, codificado por genes *vioABCDE* durante o crescimento e propagação da bactéria, podendo atuar biologicamente como antibacteriano Gram-positivo, antiviral, antifúngico e antioxidante. Adicionalmente, a ação citotóxica contra células tumorais da violaceína é estudada no âmbito farmacêutico. Além da *C. subtsugae*, as espécies *C. violaceum*, *Janthionobacterium lividum*, *Alteromonas luteoviolacea*, *Pseudoalteromonas luteoviolacea* e *Duganella* sp. B2. produzem a violaceína, apresentando uma vantagem competitiva contra espécies antagonistas (PAUER et al., 2018).

Entretanto, diferentemente de bactérias do mesmo gênero, *C. subtsugae* foi associada ao contexto de controle de pragas após ser isolada de solo rico em matéria orgânica, em uma floresta de Maryland (EUA), e demonstrar atividade inseticida em testes de toxicidade em laboratório com sobrenadantes e filtrados de cultura contra diferentes pragas, destacando-se a *Leptinotarsa decemlineata*, *Diabrotica virgifera* e *Plutella xylostella* (MARTIN et al., 2007b; MARTIN et al., 2007c). A cepa *C. subtsugae* strain PRAA4-1 foi formulada como princípio ativo do bioinseticida GRANDEVO® (Marrone Bio Innovations, Davis, California), indicado para controle de lagartas e coleópteros em algumas espécies de hortaliças, frutíferas, cereais e entre outras culturas comestíveis. Efeitos subletais, como redução da fecundidade e da oviposição em pulgões, psílídeos, moscas-brancas, *Lygus*, cochonilhas, tripes e ácaros fitófagos também são reportados pela empresa fabricante (MARRONE BIO INNOVATION, 2013).

Apesar das semelhanças com *C. violaceum*, ao comparar o genoma entre as duas espécies por NGS, vários conjuntos de genes biossintéticos preditos são altamente modificados ou exclusivos de *C. subtsugae*, podendo estar associados às propriedades entomopatogênicas que a bactéria apresenta. Alguns genes, envolvidos na codificação de enzimas como peptídeo sintetases não ribossômicas e policetídeo sintases, são similares a outras bactérias associadas com capacidade inseticida, tais como *Xenorhabdus* spp., *Paenibacillus larvae* e *Paenibacillus alvei* (BLACKBURN et al., 2016). Adicionalmente, Vöing et al. (2017) detectaram, na cepa *C. subtsugae* MWU12-2387 proveniente de Truro (Massachusetts), operons de virulência homólogos a *Mycobacterium*, peptídeos sintetases não ribossômicos de sideróforos, cianeto de hidrogênio, efetores associados ao sistema de secreção do tipo III, proteína de ligação à quitina e 15 possíveis genes de quitinase, todos com possível contribuição para a toxicidade em insetos, comprovando a eficácia desta espécie no controle de pragas.

2.3 Exopolissacarídeos com atividade inseticida

Juntamente com o avanço do uso de novos microrganismos para o controle de pragas, outras abordagens vêm sendo pesquisadas, e, recentemente, a utilização de exopolissacarídeos (EPS) é considerado um potencial candidato futuro contra algumas pragas agrícolas e urbanas (ABINAYA et al., 2018). Os EPSs são produzidos por vários organismos do solo, tais como: bactéria e fungo (CASTELLANE et al., 2017). Espécies de bactérias como, *Bacillus* sp. (DEKA et al., 2018), *Nostoc flagelliforme* (HAN et al., 2014), *Pseudomonas* sp. (SATHIYANARAYANAN et al., 2016) e *Rhizobium tropici* (CASTELLANE et al., 2017; DAS et al., 2018) foram reportados como produtores de EPS. Esses são polímeros de monossacarídeos (homopolissacarídeos ou heteropolissacarídeos) secretados no meio de cultivo, sendo considerados excelentes macromoléculas com diferentes aplicações nas áreas de biomedicina e indústria, incluindo produtos bioemulsificantes (CASTELLANE et al., 2017), bioissorventes (SHUHONG et al., 2014), agentes antibiofilme, agentes antimicrobianos (SACCO et al., 2019), atividade antioxidante, antiinflamatório e probióticos (RANI et al., 2017). Eles também desempenham um papel crucial nos mecanismos de defesa desencadeados por fatores ambientais, ataques de bacteriófagos, bem como apego a superfícies, coleta de nutrientes e antigenicidade (SAJNA et al., 2013).

Muitos estudos demonstram que as propriedades biológicas de polissacarídeos são dependentes de uma variedade de parâmetros estruturais, como composição monossacarídica, tipo e configuração da ligação glicosídica, tamanho dos pontos de ramificação, peso molecular e a presença de substituição por grupos polares e apolares (BANERJEE et al., 2017). Relatórios recentes elucidaram que os biopolímeros microbianos podem ser explorados para uma série de aplicações biomédicas e biológicas de EPS, com especial referência ao desenvolvimento de novos produtos antimicrobianos e inseticidas, para enfrentar o crescente nível de resistência das pragas agrícolas, bem como organismos microbianos aos antibióticos comumente usados. No entanto, os mecanismos envolvidos em sua atividade pesticida ainda são pouco compreendidos.

Apesar do recente progresso na descoberta de novas moléculas bacterianas com fins biológicos, ainda existe uma busca exaustiva por inseticidas potentes e efetivos contra pragas agrícolas [*Helicoverpa zea* (FANG et al., 2015), *Spodoptera frugiperda* (BERNARDI et al., 2017) e *Plutella xylostella* (TABASHNIK et al., 2009)]. Atualmente, os EPSs com atividade inseticida utilizados, como *Pseudomonas chlororaphis* estirpe PCL1391 e *Pseudomonas protegens* CHA0 e Pf-5 (RUFFNER et al., 2013), possuem atividade inseticida contra larvas de mosquito, registrando, após 24 h de incubação, 100% de mortalidade. Somado a isso, muitos polissacarídeos bacterianos são relativamente não tóxicos e não causam significantes efeitos colaterais que são um dos maiores problemas associados com compostos sintéticos.

Apesar do enorme potencial econômico e ambiental de biopolímeros de origem bacteriana, seu uso representa atualmente pequena fração do mercado em todo o mundo, e o efeito inseticida de polissacarídeos bacterianos ainda não deixou as bancadas dos laboratórios. Assim, novas pesquisas poderão su-

gerir uma aplicabilidade biológica para polissacarídeos de bactérias, tais como substâncias úteis no controle biológico e/ou na formulação de novos inseticidas alternativos.

2.4 Considerações Finais

A adoção de práticas de MIP, por exemplo, a adoção de áreas de refúgio para manutenção de insetos suscetíveis na área, bem como o uso de plantas piramidadas, poderia melhorar o controle de pragas agrícolas e preservar a eficácia das tecnologias de manejo dessas pragas, incluindo as culturas Bt. Todavia, nas últimas décadas, a indústria vem tentando desenvolver novos produtos; no entanto, a descoberta de modos de ação está cada vez mais difícil e caro. A descoberta, o desenvolvimento e a possibilidade de registro de novas moléculas com ação pesticidas, com modo de ação inovador, para os próximos 10 anos, é praticamente nula, sem expectativa.

Por isso, novas tecnologias estão sendo desenvolvidas, visando a diminuir a utilização e a dependência de produtos químicos no controle de pragas agrícolas. Algumas dessas alternativas baseiam-se no uso de microrganismos, engenharia genética e biomoléculas. Controle biológico empregando novas biomoléculas podem ser, sim, alternativas válidas para o controle químico. Entretanto, conforme relatado anteriormente, o desenvolvimento industrial de novas moléculas bacterianas permanece restrito devido à falta de exploração. A realização de estudos envolvendo a busca de entomopatógenos, assim como a exploração das peculiaridades genéticas e sua aplicabilidade biotecnológica tornaram-se imprescindíveis no desenvolvimento de uma agricultura ambientalmente sustentável e produtiva.

Neste contexto, o capítulo abordou, resumidamente, alguns procariotos que podem ser utilizados como princípio ativo em formulações ou como fonte de novos genes promissores no manejo de insetos resistentes. Entretanto, apesar de algumas novas biomoléculas e/ou do uso de novas técnicas de biologia molecular (RNA de interferência e CRISPR) serem uma das possibilidades para o manejo de pragas num futuro próximo, ainda será necessário usar de maneira integrada as diferentes táticas de controle disponíveis. Sendo assim, as boas práticas agrícolas para o manejo de pragas, como: o monitoramento de pragas; a rotação de pesticidas com diferentes modos de ação; o uso e a preservação de inimigos naturais; a rotação de culturas e o respeito ao período de vazão sanitário são imprescindíveis para evitar a resistência em pragas agrícolas, bem como possibilitar o controle mais efetivo de pragas.

REFERÊNCIAS

- ABINAYA, M.; VASEEHARAN¹, B.; DIVYA¹, M.; VIJAYAKUMAR, S.; GOVINDARAJAN, M.; ALHARBI, N. S.; KHALED, J. M.; AL-ANBR, M. N.; BENELLI, G. Structural characterization of *Bacillus licheniformis* Dab1 exopolysaccharide-antimicrobial potential and larvicidal activity on malaria and Zika virus mosquito vectors. **Environ Sci Pollut Res**, 25(19), p. 18.604-18.619, 2018.
- AGROLINK. Pragas causam perdas de até R\$ 55 bilhões à agricultura no Brasil. Disponível em: < https://www.agrolink.com.br/noticias/pragas-causam-perdas-de-ate-r-55-bilhoes-a-agricultura-no-brasil_220429.html >. Acesso em: 1º mar 2019.
- BALDIN, E.L.L.; SILVA, A.F.; SILVA, I.F. Inovações em Manejo Fitossanitário. Botucatu: Fepaf, 2017. 232 p. Disponível em: < https://www.researchgate.net/profile/Ivana_Silva2/publication/321268808_INOVACOES_EM_MANEJO_FITOSSANITARIO/links/5a1804afaca272df0808ed85/INOVACOES-EM-MANEJO-FITOSSANITARIO.pdf#page=62 >. Acesso em: 12 mar. 2019.
- BANERJEE, A.; RUDRA, S.G.; MAZUMDER, K.; NIGAM, V.; BANDOPADHYAY, R. Structural and Functional Properties of Exopolysaccharide Excreted by a Novel *Bacillus anthracis* (Strain PFAB2) of Hot Spring Origin. **Indian Journal of Microbiology**. 58(1): p. 39-50. 2017.
- BERNARDI, D.; BERNARDI, O.; HORIKOSHI, R. J.; SALMERON, E.; OKUMA, D. M.; FARIAS, J. R.; NASCIMENTO, A. R. B.; OMOTO, C. Selection and characterization of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to MON 89034 × TC1507 × NK603 maize technology. **Crop Protection**, v. 94, p. 64-68, 2017.
- BLACKBURN, MICHAEL B.; SPARKS, MICHAEL, E.; GUNDERSEN-RINDAL, DAWN, E. The genome of the insecticidal *Chromobacterium subtsugae* PRAA4-1 and its comparison with that of *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. **Genomics Data**, v. 10, p. 1-3, 2016.
- CASTELLANE, T.C.L.; CAMPANHARO, J. C.; COLNAGO, L. A.; COUTINHO, I. D.; LOPES, E. M.; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. M. Characterization of new exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici* during growth on hydrocarbon substrate. **Int J Biol Macromol**, 96: p. 361-369. 2017.

DAS, S.; SEN, I. K.; KATI, A.; SOME, S.; MANDAL, A. K.; ISLAM, S. S.; BHATTACHARYYA, R.; MUKHOPADHYAY, A. Flocculating, emulsification and metal sorption properties of a partially characterized novel exopolysaccharide produced by *Rhizobium tropici* SRA1 isolated from *Psophocarpus tetragonolobus* (L) D.C. **Int Microbiol**, 22: 91. 2018.

DEKA, P.; GOSWAMI, G.; DAS, P.; GAUTOM, T.; CHOWDHURY, N.; BORO, R.C.; BAROOAH, M. Bacterial exopolysaccharide promotes acid tolerance in *Bacillus amyloliquefaciens* and improves soil aggregational. **Mol Biol Rep**, 46: 1079. 2018.

FANG, X.J.; ZHOU, Y.; ZHANG, W.F.; XIE, L.; ZHU, J.T. Bt S2685-1, A *Bacillus thuringiensis* strain with significantly larvicidal toxicity against corn earworm (*Helicoverpa zea*), **Bt Research**, Vol.6, n.10, p.1-2. 2015.

FATORETTO, J.C. **Molecular Characterization of *Spodoptera frugiperda* Resistance to Vip3Aa20 Bt protein**. Tese (Doutorado em Internacional Biologia Celular e Molecular Vegetal) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, p. 152. 2017.

FLURY, P.; AELLEN, N.; RUFFNER, B.; PÉCHY-TARR, M.; FATAAR, S.; METLA, Z.; DOMINGUEZ-FERRERAS, A.; BLOEMBERG, G.; FREY, J.; GOESMANN, A.; RAAIJMAKERS, J. M.; DUFFY, B.; HÖFTE, M.; BLOM, J.; SMITS, T. H.; KEEL, C.; MAURHOFER, M. Insect pathogenicity in plant-beneficial pseudomonads: Phylogenetic distribution and comparative genomics. **ISME Journal**, v. 10, n. 10, p. 2.527–2.542, 2016.

FLURY, P.; VESGA, P.; PÉCHY-TARR, M.; AELLEN, N.; DENNERT, F.; HOFER, N.; KUPFERSCHMIED, K. P.; KUPFERSCHMIED, P.; METLA, Z.; MA, Z.; SIEGFRIED, S.; WEERT, S.; BLOEMBERG, G.; HÖFTE, M.; KEEL, C. J.; MAURHOFER, M. Antimicrobial and insecticidal: Cyclic lipopeptides and hydrogen cyanide produced by plant-beneficial *Pseudomonas* strains CHA0, CMR12a, and PCL1391 contribute to insect killing. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 100, p. 1–15, 2017.

HAN, P.P.; SUN, Y.; WU, X.Y.; YUAN, Y.J.; DAI, Y.J.; JIA, S.R. Emulsifying, flocculating, and physicochemical properties of exopolysaccharide produced by cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*. **Appl Biochem Biotechnol**, 172(1): p. 36–49. 2014.

HANSEN, B. M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: CHARLES, J.F.; DELECLUSE, ARMELLE; NIELSEN-LE ROUX, C. (Eds). **Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application**. Netherland: Kluwer Academic Plubishers, p. 41- 64, 2000.

LIM, D. J.; YANG, S. Y.; NOH, M. Y.; LEE, C. W.; KIM, J. C.; KIM, I. S. Identification of lipopeptide xantholysins from *Pseudomonas* sp.DJ15 and their insecticidal activity against *Myzus persicae*. **Entomological Research**, v. 47, p. 337-343, 2017.

LOPER, J. E.; HENKELS, M. D.; RANGEL, L. I.; OLCOTT, M. H.; WALKER, F. L.; BOND, K. L.; KIDARSA, T. A.; HESSE, C. N.; SNEH, B.; STOCKWELL, V. O.; TAYLOR, B. J. Rhizoxin analogs, orfamide A and chitinase production contribute to the toxicity of *Pseudomonas protegens* strain Pf-5 to *Drosophila melanogaster*. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 10, p. 3.509-3.521, 2016.

MARQUES, L.H.; SANTOS, A. C.; CASTRO, B. A.; MOSCARDINI, V. F.; ROSSETTO, J.; SILVA, O. A. N.; ZOBIOLE, L. H. S.; VALVERDE-GARCIA, P.; BABCOCK, J. M.; STORER, N. P.; RULE, D. M.; FERNANDES, O. A. Field evaluation of soybean transgenic event DAS-81419-2 expressing Cry1F and Cry1Ac proteins for the control of secondary lepidopteran pests in Brazil. **Crop Protection**, v. 96, p. 109-115, 2017.

MARRONE BIO INNOVATION, Grandevo® product information. Davis, Califórnia, 2013. Disponível em: <<https://marronebioinnovations.com/>>. Acesso em: 23 mar 2019.

MARTIN, P.A.W.; SHROPSHIRE, A.D.S.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; BLACKBURN, M.B. *Chromobacterium subtsugae* sp. nov., for control of insect pests. U.S. Patent n. 7, p.244,607, 17 jul. 2007a.

MARTIN, P.A.W.; GUNDERSEN-RINDAL, D.; BLACKBURN, M.; BUYER, J. *Chromobacterium subtsugae* sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 993-999, 2007b.

MARTIN, P.A.W.; HIROSE, E.; ALDRICH, J.R. Toxicity of *Chromobacterium subtsugae* to southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) and corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of economic entomology**, v. 100, n. 3, p. 680-684, 2007c.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E A. Refúgio. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/refugio/#/home>>. Acesso em: 1º mar 2019.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: Manole. p.297- 310, 1986.

OMOTO, C. **Estratégias de manejo podem prolongar vida útil das tecnologias de milho** Bt. p. 107–109, 2015.

PAUER, H.; HARDOIM, C. C. P.; TEIXEIRA, F. L.; MIRANDA, K. R.; BARBIRATO, D. S.; CARVALHO, D. P.; CAETANO, L.; ANTUNES, M.; LEITÃO, A. A. C.; LOBO, L. A.; CAVALCANTI, R. M.; DOMINGUES, P. Impact of violacein from *Chromobacterium violaceum* on the mammalian gut microbiome. **PloS one**, v. 13, n. 9, p. e0203.748, 2018.

PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M.-H.; VELÁZQUEZ, E. The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 57, p. 106–116, 1º jan 2018.

RANGEL, L. I.; HENKELS, M. D.; SHAFFER, B. T.; WALKER, F. L.; DAVIS, E. W.; STOCKWELL, V. O.; BRUCK, D.; TAYLOR, B. J.; LOPER, J. E. Characterization of toxin complex gene clusters and insect toxicity of bacteria representing four subgroups of *pseudomonas fluorescens*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–22, 2016.

RANI, R.P.; ANANDHARAJ, M.; SABHAPATHY, P.; RAVINDRAN, A.D. Physiochemical and biological characterization of novel exopolysaccharide produced by *Bacillus tequilensis* FR9 isolated from chicken. **Int J Biol Macromol**, 96: p. 1-10. 2017.

ROGERS, D.J.; BRIER, H.B. Pest-damage relationships for *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) on vegetative soybean. **Crop Protect**, 29 (1), p. 39-46. 2010.

RUFFNER, B.; PÉCHY-TARR, M.; RYFFEL, F.; HOEGGER, P.; OBRIST, C.; RINDLISBACHER, A.; KEEL, C.; MAURHOFER, M. Oral insecticidal activity of plant-associated pseudomonads. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 751–763, 2013.

SACCO, L.P.; CASTELLANE, T.C.L.; POLACHINI, T.C.; LEMOS, E.G.M.; ALVES, L.M.C. Exopolysaccharides produced by *Pandora* shows emulsifying and anti-biofilm activities. **Journal of Polymer Research**, 4. 2019.

SAJNA, K.V.; SUKUMARAN, R.K.; GOTTUMUKKALA, L.D.; JAYAMURTHY, H.; DHAR, K.S.; PANDEY, A. Studies on structural and physical characteristics of a novel exopolysaccharide from *Pseudozyma* sp. NII 08165. **Int J Biol Macromol**, 59: p. 84–89. 2013.

SATHIYANARAYANAN, G.; BHATIA, S. K.; KIM, H. J.; KIM, J. H.; JEON, J. M.; KIM, Y. G.; PARK, S. H.; LEE, S. H.; LEED, Y. K.; YANG, Y. H. Metal removal and reduction potential of an exopolysaccharide produced by Arctic psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. PAMC 28620. **RSC Adv**, 6(99), p. 96.870–96.881. 2016.

SCHELLENBERGER, U. , ORAL, J.; ROSEN, B. A.; WEI, J. Z.; ZHU, G.; XIE, W.; MCDONALD, M. J.; CERF, D. C.; DIEHN, S. H.; CRANE, V. C.; SANDAHL, G. A.; ZHAO, J. Z.; NOWATZKI, T. M.; SETHI, A.; LIU, L.; PAN, Z.; WANG, Y.; LU, A. L.; WU, G.; LIU, L. A selective insecticidal protein from *Pseudomonas* for controlling corn rootworms. **Science**, v. 354, n. 6312, p. 634–637, 4 nov. 2016.

SHUHONG, Y.; ZHANG, M.; YANG, H.; WANG, H.; XIAO, S.; LIU, Y.; WANG, J. Biosorption of Cu^{2+} , Pb^{2+} and Cr^{6+} by a novel exopolysaccharide from *Arthrobacter* ps-5. **Carbohydr Polym**, 101: p. 50-56. 2014.

TABASHNIK, B.E.; VAN RENSBURG, J.B.J.; CARRIÈRE, Y. Field-evolved insect resistance to *Bt* crops: definition, theory, and data. **J. Econ. Entomol**, 102(6), p. 2.011–2.025. 2009.

VÖING, K.; HARRISON, A.; SOBY, S.D. Draft genome sequence of *Chromobacterium subtsugae* MWU12-2387 isolated from a wild cranberry bog in Truro, Massachusetts. **Genome Announc.**, v. 5, n. 12, p. e01633-16, 2017.

WEI, J. Z.; O'REAR, J.; SCHELLENBERGER, U.; ROSEN, B. A.; PARK, Y. J.; MCDONALD, M. J.; ZHU, G.; XIE, W.; KASSA, A.; PROCYK, L.; PEREZ ORTEGA, C.; ZHAO, J. Z.; YALPANI, N.; CRANE, V. C.; DIEHN, S. H.; SANDAHL, G. A.; NELSON, M. E.; LU, A. L.; WU, G.; LIU, L. A selective insecticidal protein from *Pseudomonas mosselii* for corn rootworm control. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, n. 2, p. 649–659, 2018.

CAPÍTULO VIII

PRÁTICAS DE MANEJO, RESISTÊNCIA GENÉTICA E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE FITONEMATÓIDES

Edicleide Macedo da Silva

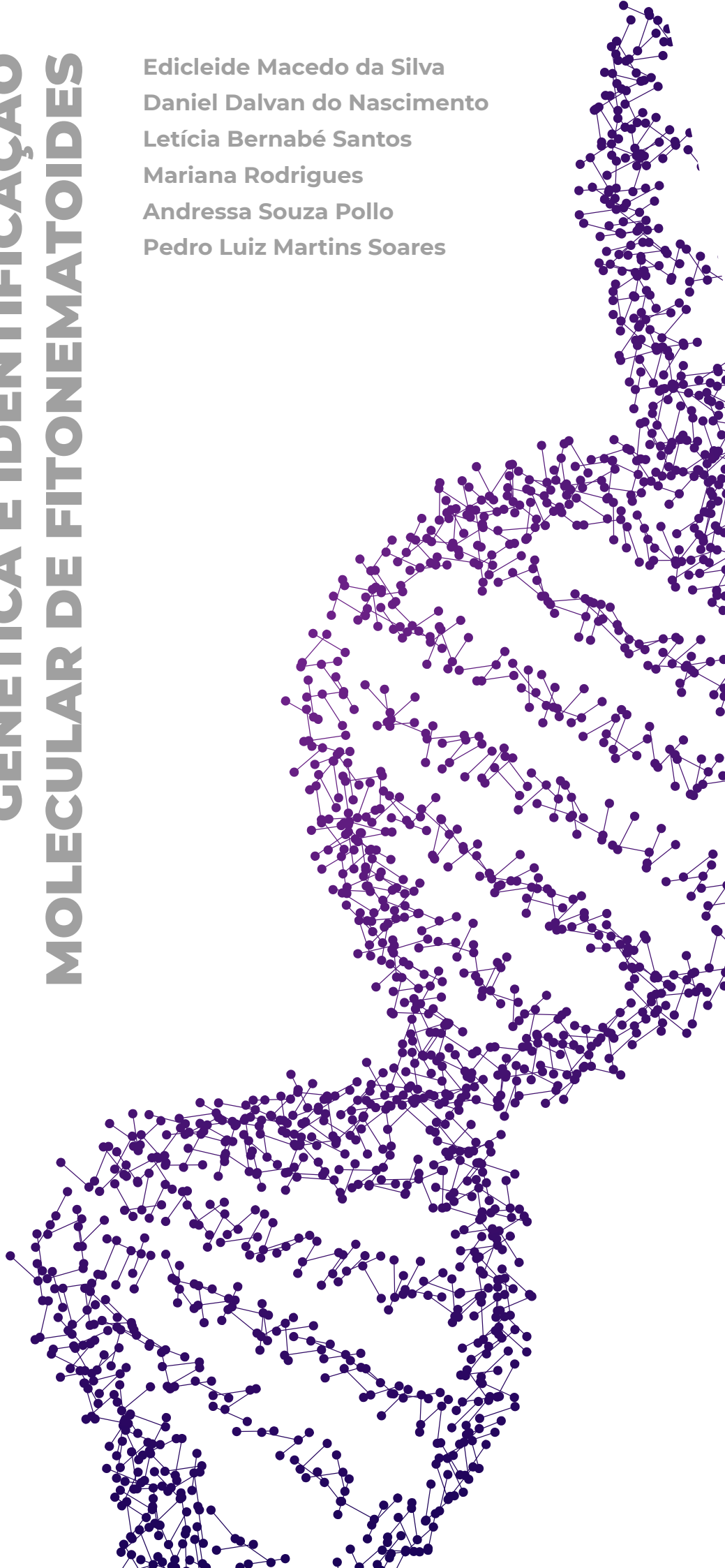
Daniel Dalvan do Nascimento

Letícia Bernabé Santos

Mariana Rodrigues

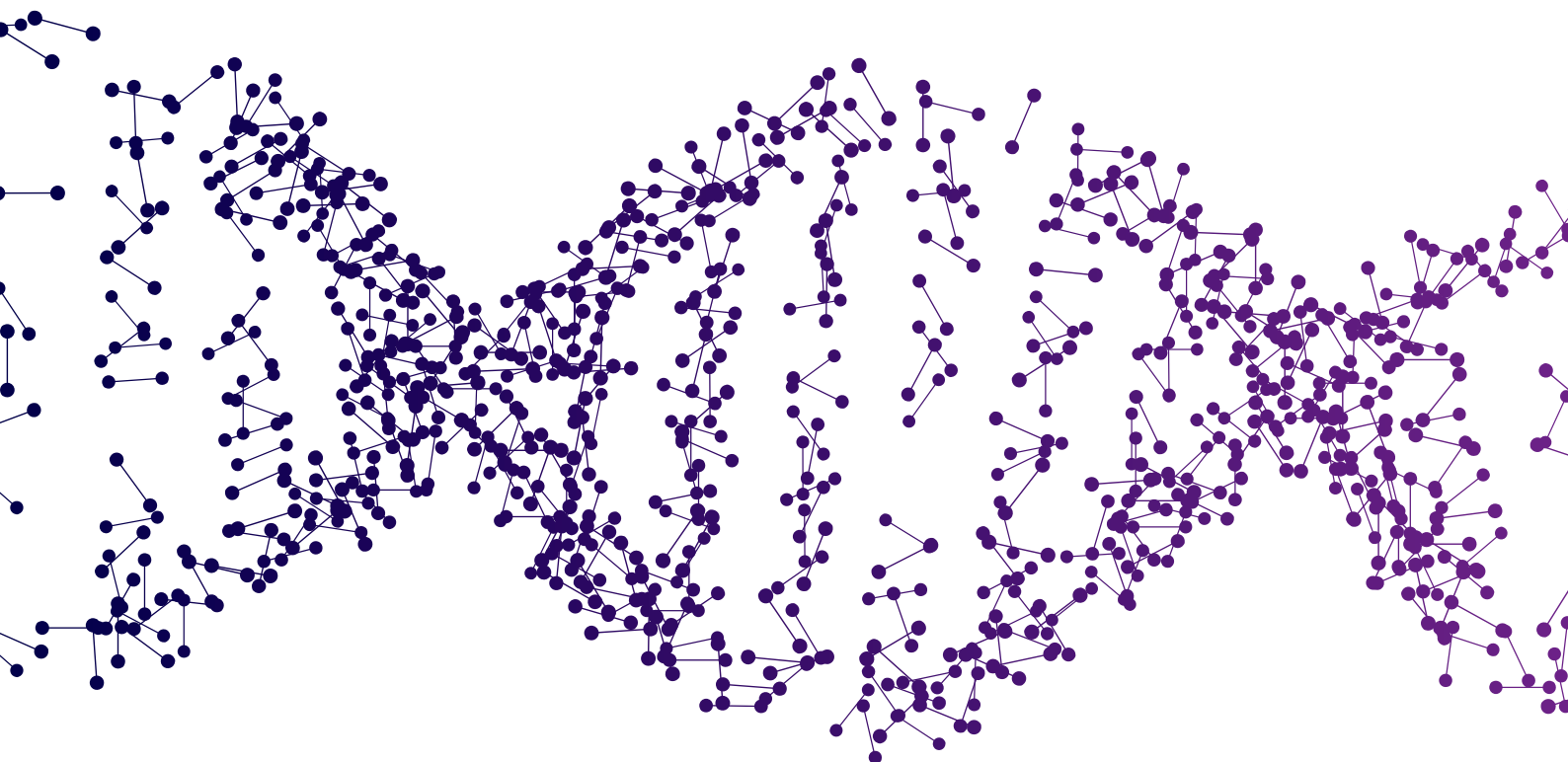
Andressa Souza Pollo

Pedro Luiz Martins Soares



CONTEÚDO

1	Introdução	91
2	Manejo integrado de nematoides	91
3	Resistência genética de plantas a nematoides	92
4	Identificação molecular de nematoides	94
	Referências	97



1 INTRODUÇÃO

As raízes das plantas são responsáveis por extrair água e nutrientes do solo, porém quando outro fator biótico ou abiótico prejudica ou reduz seu crescimento, impede a planta de atingir seu máximo potencial produtivo (GREGORY, 2006). Os nematoides parasitos de plantas estão entre as principais doenças de solo e são conhecidos pelo seu difícil controle (VAN DER PUTTEN et al., 2006). Os sintomas, causados por esses parasitas, manifestam-se em forma de reboleiras, com plantas menores e cloróticas, frequentemente confundidos com problemas nutricionais ou outras doenças (FOSU-NYARKO; JONES, 2016), bem como ocorrendo concomitantemente com esses fatores. Nesse contexto, é difícil estimar os danos ocasionados por esses fitopatógenos. No entanto, estimam-se perdas anuais próximas a US\$ 80 bilhões no cenário mundial, devido à ação desses fitoparasitos (NICOL et al., 2011).

Já foram descritas cerca de 4.100 espécies de fitonematoides, classificados como altamente especializados em infectar plantas por meio de diferentes hábitos de parasitismo, tanto nas raízes como nas partes aéreas (DECRAEMER et al., 2006). O grupo de nematoides mais importante são os sedentários, no qual estão as espécies de *Meloidogyne* (nematoides de galha), *Heterodera* e *Globodera* (nematoides de cisto) (HAEGEMAN et al., 2012). Ademais, *Pratylenchus* spp. (nematóide das lesões radiculares), *Radopholus similis* (nematóide cavernícola), *Ditylenchus dipsaci* (nematóide do amarelão do alho), *Bursaphelenchus xylophilus* (nematóide selvagem do pínus), *Rotylenchus reniformis* (nematóide reniforme), *Xiphinema index* (nematóide transmissor de viroses), *Nacobbus aberrans* (o falso nematóide de galha) e *Aphelenchoides besseyi*, são de grande importância no cenário mundial, e a maioria ocorre no Brasil (JONES et al., 2013).

Para que esses fitoparasitos possam ser controlados, é necessário compreender os métodos de controle, além das interações com o hospedeiro, biodiversidades e, principalmente, utilizar métodos confiáveis de identificação (SEESAO et al., 2017). Os métodos de identificação são baseados na morfologia, bioquímica e características moleculares; entretanto, há dificuldades na identificação devido ao tamanho desses vermes, à alta diversidade de espécies (muitas delas ainda não descritas) e à ausência de características específicas (CHITWOOD, 2003). A integração das diferentes técnicas de identificação é de grande importância para maior precisão na determinação da espécie. Neste capítulo, serão brevemente abordados os principais métodos de controle de nematoides, com foco na utilização de cultivares resistentes, além da utilização de técnicas moleculares de identificação.

2 MANEJO INTEGRADO DE NEMATOIDES

A forma mais efetiva na redução da incidência de nematoides é a prevenção, evitando a entrada e/ou a disseminação. Ademais, medidas como o monitoramento das áreas por meio de análises nematológicas periódicas, a retirada de restos culturais de plantas infectadas, a utilização de mudas e/ou de sementes de qualidade e isentas de nematoides, até mesmo evitar que o resíduo vegetal,

implementos e outros materiais contaminados sejam transferidos e/ou depositados em áreas livres da incidência do patógeno (SOARES et al., 2018).

Em áreas com altas infestações, o uso de arado ou de grade aradora, visando à destruição dos restos culturais, principalmente as raízes, à visando a sua dessecação, assim como do solo, é uma prática de manejo fundamental e eficiente na redução da população de nematoides. Os nematoides são sensíveis aos raios solares e à falta de umidade, não sobrevivem por muito tempo em ambientes sem a presença de plantas hospedeiras e fora das raízes. Entretanto, esse método propicia a redução de material e matéria orgânica, a erosão do solo e tende a reduzir seu potencial produtivo, devido à diminuição da atividade biológica e estrutural do solo, além de outras consequências (BERTOLINI; LOMBARDI NETO, 1993).

A rotação de culturas, que consiste em alternar cultivos de diferentes espécies em uma mesma área (PRESTES et al., 1999), e a sucessão de culturas, que é o cultivo de espécies diferentes na mesma área ao longo do ano (FRANCHINI et al., 2011), são excelentes ferramentas e fundamentais na redução populacional dos nematoides, desde que as espécies de plantas utilizadas não sejam hospedeiras, sejam resistentes ou apresentem menor fator de reprodução. Esse método, além de reduzir a população, interrompendo o ciclo do nematoide, pode restabelecer o equilíbrio do solo e a ciclagem de nutrientes, refletindo também na produtividade (RITZINGER; SOUZA, 2000). Entretanto, seu uso é limitado devido à baixa disponibilidade de culturas de interesse econômico para o agricultor e que reduza a população de nematoides.

A utilização de produtos químicos e biológicos também é importante ferramenta no manejo de nematoides. Os químicos, de modo geral, apresentam alta eficiência na proteção das raízes nas fases iniciais de desenvolvimento radicular, porém têm residual curto, possibilitando aumento populacional do nematoide após esse período (DONG; ZHANG, 2006). Já o controle biológico, além de não ser agressivo ao meio ambiente, apresenta eficiência equivalente ou superior ao controle químico e, também, maior período de ação (SOARES et al., 2017). Porém, esse método ainda apresenta algumas limitações, pois necessita de condições favoráveis para aplicação, não é compatível com alguns produtos químicos e necessita de armazenagem específica.

A utilização de cultivares resistentes é a estratégia de manejo mais desejável, considerando sua facilidade de utilização, eficiência e compatibilidade com outros métodos de controle (FANCELLI, 2003).

3 RESISTÊNCIA GENÉTICA DE PLANTAS A NEMATOIDES

Dentre os métodos de controle de nematoides mais eficientes e utilizados, a resistência genética desempenha papel importante e indispensável nos programas de melhoramento genético. Essa é realizada por meio da utilização de cultivares que contenham genes responsáveis pela resistência ao parasitismo do nematoide e onde atuam, restringindo ou prevenindo a multiplicação desses em suas raízes, evitando assim possíveis danos (MOURA, 1997).

O manejo de nematoides utilizando a resistência genética é considerado uma forma eficiente no controle desses agentes, que têm causado sérios danos às culturas. O manejo genético pode ser considerado o método mais efetivo e que tem contribuído para a redução da aplicação de produtos fitossanitários, reduzindo a contaminação do meio ambiente e diminuindo a reprodução dos nematoides (CASTAGNONE-SERENO, 2002; BOERMA; HUSSEY, 1992).

Levando em consideração a alta ocorrência dos nematoides, bem como os prejuízos causados por eles, estudos estão sendo realizados para que seja identificado fontes de resistência às principais espécies de nematoides. Uma vez identificadas, o genótipo deverá ser selecionado e, em seguida, serão iniciados os estudos de herança da resistência, e os resultados serão utilizados em pesquisas futuras.

Entre os estudos realizados, visando à resistência genética, pode-se citar a pesquisa realizada por Oliveira e Asmus, (2018), em que foi avaliada a reprodução de *Meloidogyne javanica*, *Rotylenchulus reniformis* e *Pratylenchus brachyurus* em raízes de quatro cultivares de sorgo sacarino. As cultivares de sorgo 'BRS 506', 'BRS 508', 'BRS 509' e 'BRS 511' podem ser consideradas resistentes a *R. reniformis* e *M. javanica*, e suscetíveis a *P. brachyurus*. Brida, Correia e Wilcken (2017) verificaram a reação de oito cultivares de soja a *Pratylenchus brachyurus*. Concluíram que todas as cultivares de soja foram suscetíveis, porém em diferentes graus, com fator de reprodução entre 1,24 e 2,80.

Esforços têm sido empregados na busca por genótipos das mais variadas espécies vegetais que apresentam genes de resistência às diversas espécies de nematoides. Além desses, estão sendo realizados estudos de herança da resistência para auxiliar os programas de melhoramento.

Nos estudos de herança da resistência, a magnitude dos efeitos gênicos que controlam um determinado caráter tem grande importância no processo de seleção, bem como na predição do comportamento de gerações híbridas e nas populações segregantes. É indispensável que sejam realizadas as estimativas das proporções atribuídas a efeitos gênicos aditivos, dominantes e epistáticos, sendo essa informação crucial para nortear os programas de melhoramento genético (CRUZ; REGAZZI, 1997), já que é necessário conhecer quantos genes estão envolvidos na resistência, podendo ser monogênica (um único gene), oligogênica (dois a três genes) ou poligênica (vários genes).

Inicialmente, para que seja realizado o estudo do controle genético, é necessário que os genitores sejam contrastantes para o caráter de interesse. Após a identificação dos genitores contrastantes, devem ser obtidas as gerações F1, F2 e os retrocruzamentos. Para caracteres com distribuição discreta, as hipóteses de segregação são avaliadas pelo teste de qui-quadrado (RAMALHO et al., 2012).

Em algumas situações, a característica onde está sendo realizado o estudo do controle genético, pode não seguir os padrões mendelianos. Nesse caso, onde há muitos genes conferindo a resistência, o estudo de herança não é possível de ser realizado pelo teste qui-quadrado. Nessa situação, pode ser realizado

o estudo por meio dos componentes de média e de variância (CRUZ; REGAZZI, 1997).

Cândido et al. (2017) realizaram um estudo em meloeiro (*Cucumis melo*) para se conhecer o controle genético do caráter para resistência a *Meloidogyne incognita*. Foi concluído que o controle genético da resistência a *M. incognita*, em meloeiro, é de caráter poligênico, governado por seis loci gênicos, com dominância incompleta do alelo de resistência e com a presença de interação gênica de epistasia entre os genes.

Para a realização dos estudos visando à herança da resistência, têm sido observadas algumas dificuldades. Arantes et al. (1999) destacam que os principais entraves desses estudos podem ser atribuídos, em parte, ao alto nível de variabilidade do patógeno em campo e, ainda, devido ao método utilizado para classificar as plantas como resistentes ou suscetíveis. Além disso, algumas espécies de nematoides, como o nematoide de cisto da soja, *Heterodera glycines*, apresentam várias raças, já tendo sido relatadas no Brasil as raças 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10 e 14, além de 4⁺ e 14⁺ (RIGGS; SCHMITT, 1988). Na cultura do alho, a grande dificuldade em selecionar genótipos resistentes está associada ao *D. dipsaci*, ao apresentar um complexo de 11 a 30 raças biológicas (DECKER, 1981).

Diante dessas dificuldades, é indispensável iniciar o programa de melhoramento genético, identificando as raças fisiológicas existentes. Isso contribui para a obtenção de resultados seguros, na busca por cultivares resistentes que proporcionem redução dos nematoides. É necessário que os trabalhos com esses patógenos sejam intensificados, dada sua grande variabilidade genética, falta de cultivares resistentes às principais espécies e adaptadas às diferentes regiões do Brasil.

Os estudos com os nematoides, visando à resistência genética, à transferência do/s gene/s e à identificação de novas espécies, têm sido possíveis, graças ao melhoramento clássico, juntamente com o uso das ferramentas moleculares.

4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE NEMATOIDES

A distinção das espécies de nematoides, associadas a infestações em culturas e a grandes perdas de produtividade de forma acurada e no tempo apropriado, passou a ser um pré-requisito para o desenvolvimento de estratégias efetivas de manejo (SUBBOTIN et al., 2014). Para a obtenção de tais resultados, a aplicação de técnicas taxonômicas integradas, envolvendo o uso de abordagens morfológicas, bioquímicas e moleculares, é indispensável (CARNEIRO et al., 2017). Há características morfológicas difíceis de serem identificadas, mesmo para especialistas em taxonomia. Assim, com o advento das análises filogenéticas, revelou-se que espécies de nematoides consideradas únicas por longos períodos de tempo sofreram especiação críptica e passaram a ser morfologicamente indistinguíveis, fato este que vem ocorrendo com várias espécies de nematoides parasitas de plantas (GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ et al., 2010; CANTALAPIEDRA-NAVARRETE et al., 2013; SUBBOTIN et al., 2014).

Os estudos filogenéticos de nematoides começaram recentemente e, por

este motivo, a identificação taxonômica precisa de algumas espécies e ainda se encontra indefinida e confusa. Blaxter et al. (1998) e Aleshin et al. (1998) foram os primeiros pesquisadores a realizar estudos filogenéticos mais amplos de nematoides a partir de sequências da região SSU rDNA, cujos estudos abrangeram 53 e 19 sequências de nematoides, respectivamente. Na ocasião, Blaxter et al. (1998) definiram os táxons analisados em cinco clados principais e mostraram claramente que ecologias tróficas, como, os parasitismos animal e vegetal, surgiram várias vezes de forma independente. Posteriormente, Holterman et al. (2006) apresentaram um estudo mais amplo com 339 táxons do filo Nematoda, os quais foram subdivididos em 12 clados bem suportados em uma árvore filogenética bayesiana. A necessidade de mais estudos foi crescendo exponencialmente. A baixa resolução de alguns clados pelo estudo da região SSU rDNA levou os pesquisadores a analisarem adicionalmente a região LSU rDNA (HOLTERMAN et al., 2008) e a aumentar o número de sequências analisadas. Megen et al. (2009) analisaram 1.215 sequências de nematoides da região SSU rDNA, de aproximadamente 1.700 pb, e encontraram resultados semelhantes àqueles obtidos por Holterman et al. (2006); no entanto, com um número menor de clados (que têm um único ancestral envolvido) bem suportados. Os autores concluíram que a evolução convergente, ou seja, a evolução, independentemente, de características similares em espécies de diferentes linhagens, pode ser a explicação adicional para a volatilidade aparentemente persistente da sistemática dos nematoides (MEGEN et al., 2009).

A subdivisão do filo Nematoda é um trabalho que está em progresso e foi iniciado pela análise das regiões do DNA ribossomal, pois estas regiões apresentam-se em multicópias, são conservadas, mas também possuem variação genética suficiente para distinguir gêneros e até mesmo espécies dos organismos (CARNEIRO et al., 2017). Em eucariotos, a região SSU rDNA (*Small Subunit*) corresponde à subunidade 18S do DNA ribossomal, enquanto a região LSU rDNA (*Large subunit*) corresponde à região 28S. Entre essas duas subunidades ribossomais, encontra-se a região ITS1-5.8S-ITS2. As regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) não são codificadoras e, portanto, acumulam maior número de mutações genéticas, podendo também ser utilizadas na discriminação de espécies (MACHIDA; KNOWLTON, 2012). Como as regiões SSU e LSU rDNA possuem baixa taxa evolutiva, espécies de nematoides com alta relação genética entre si podem não ser distinguidas pela análise destas regiões. Assim, para a taxonomia definitiva das espécies de nematoides, uma abordagem multilocus, envolvendo o sequenciamento de vários genes conservados e de regiões mitocondriais, será necessária (BERT et al., 2011; MACHIDA ; KNOWLTON, 2012).

Além das dificuldades na identificação de nematoides inerentes à pequena quantidade de estudos moleculares, à escassez de sequências de DNA no banco de dados e à constante especiação destes parasitas, técnicas laboratoriais realizadas inapropriadamente poderão contribuir para com os erros na identificação acurada de espécies. Para a extração de DNA, os nematoides devem ser coletados com o auxílio de um microscópio de forma individual, pois cada indivíduo pode apresentar mutações genéticas distintas, mesmo que pertencentes à mesma espécie e, portanto, não podem ser submetidos à extração de DNA em

conjunto (HOLTERMAN et al., 2008). Devido à falta de acurácia de sequências depositadas no banco de dados, é necessário fazer uma análise minuciosa de sequências representativas de cada espécie para compor a árvore filogenética.

Embora as análises moleculares sejam fundamentais, os taxonomistas constituem uma peça-chave para assegurar a ligação entre a sistemática clássica e a filogenia. Como esta ligação já vem sendo realizada com avanços significativos nos últimos anos, possivelmente, dentro de mais alguns anos a sistemática notoriamente volátil dos nematoides será transformada em uma estrutura única, mais ou menos robusta e amplamente aceita (BERT et al., 2011).

REFERÊNCIAS

ALESHIN, V. V.; KEDROVA, O. S.; MILYUTINA, I. A.; VLADYCHENSKAYA, N. S.; PETROV, N. B. Relationships among nematodes based on the analysis of 18S rRNA gene sequences: molecular evidence for monophyly of chromadorian and secernentian nematodes. **Russian Journal of Nematology** 6:175-184, 1998.

ARANTES, N. E.; KIIHL, R. A. S.; Almeida, L. A. Melhoramento genético visando à resistência. In: SILVA, J.F.V. (eds) **O nematoide de cisto da soja: A experiência brasileira**, p. 105-117, 2009.

BERTOLINI, D.; LOMBARDI, N. F. Manual Técnico de Manejo e Conservação do Solo e Água, **CATI**, São Paulo. Manual 38, 1993.

BERT, W.; KARSSSEN, G.; HELDER, J. Phylogeny and Evolution of Nematodes. In: Jones J, Gheysen G, Fenoll C (Eds). **Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions**. Dordrecht: Springer, p. 45-59, 2011.

BOERMA, H. R.; HUSSEY, R. S. Breeding plants for resistance to nematodes. **Journal of Nematology** 24, p.242-252, 1992.

BLAXTER, M. L.; DE LEY, P.; GAREY, J. R.; LIU, L. X.; SCHELDEMAN, P.; VIERSTRAETE, A.; VANFLETEREN, J. R.; MACKEY, L. Y.; DORRIS, M.; FRISSE, L. M.; VIDA, J. T.; THOMAS, W. K. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature** 392, p.71-75, 1998.

BRIDA, A. L.; CORREIA, E. C. S. S.; WILCKEN, S. R. S. Suscetibilidade de cultivares de soja ao nematoide das lesões radiculares, **Summa Phytopathol** 3, p.248-249, 2017.

CÂNDIDO, W. S.; CASTOLDI, C.; SANTOS, L. S.; TOBAR-TOSSE DE, SOARES, P. L. M.; BRAZ, L. T. Genetic parameters of resistance to *Meloidogyne incognita* in melon. **Ciência Rural** 5, p.6, 2017.

CANTALAPIEDRA-NAVARRETE, C.; NAVAS-CORTÉS, J. A.; LIÉBANAS, G.; VOVLAS, N.; SUBBOTIND, S. A.; PALOMARES-RIUS, J. E.; CASTILLO, P. Comparative molecular and morphological characterisations in the nematode genus *Rotylenchus*: *Rotylenchus paravitis* n. sp., an example of cryptic speciation. **Zoologischer Anzeiger** 252, p.246-268, 2013.

CASTAGNONE-SERENO, P. Genetic variability of nematodes: a threat to the durability of plant resistance genes. **Euphytica** 124, p.193-199, 2002.

CARNEIRO, R. M. D. G.; LIMA, F. S. O.; CORREIA, V. R. Methods and tools currently used for the identification of plant parasitic nematodes. In.: SHAH, M.M.; MAHAMOOD, M. (Eds.) *Nematology - Concepts, Diagnosis and Control*. Londres: **IntechOpen**, p. 20-35, 2017.

CHITWOOD, D. J. Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service. **Pest Management Science** 59, p.748-753, 2003.

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

DECKER, H. Plant nematodes and their control: (**Phytonematology**). New Dehli: Amerind, 540p., 1981.

DECRAEMER W.; GERAERT, E. Ectoparasites. In: PERRY, R.; MOENS, M. (eds) **Plant Nematology Wallingford**. CABI publishing, UK, p.153-184, 2006.

DONG, L. Q.; ZHANG, K. Q. Microbial control of plant- parasitic nematodes: a five-party interaction. **Plant Soil The Hague** 288, p.31-45, 2006.

FERY, R. L.; DUKES, P. D.; THIES, J. A.; WONDER, C.; BELLE, C. Southern root-knot nematode resistant bell peppers. **HortScience** 5, p.900-902, 1998.

FANCELLI, M. Resistência e alternativas de controle de pragas. In: Simpósio brasileiro sobre bananicultura 5 workshop do genoma musa 1. Paracatu. **Anais**. Cruz das Almas Gráfica e Editora Nova Civilização, p.127- 133, 2003.

FOSU-NYARKO, J.; JONES, M. G. K. "Advances in understanding the molecular mechanisms of root lesion nematode host interactions." **Annual Review of Phytopathology** 54, p.253-278, 2016.

FRANCHINI, J.C.; COSTA, J.M.; DEBIASI, H.; TORRES, E. **Importância da rotação de culturas para a produção agrícola sustentável no Paraná**. Londrina Embrapa Soja (Embrapa Soja. Documentos) 327, p.52, 2011.

GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ, C.; PALOMARES-RIUS, J. E.; CANTALAPIEDRA-NAVARRETE, C.; LANDA, B. B.; ESMENJAUD, D.; CASTILLO, P. Molecular analysis and comparative morphology to resolve a complex of cryptic *Xiphinema* species. **Zoologica Scripta** 39, p.483-498, 2010.

GREGORY, P. J. Roots, rhizosphere and soil: the route to a better understanding of soil science?. **European Journal of Soil Science** 57, p.2-12, 2006.

HAEGEMAN, A.; MANTELIN, S.; JONES, J. T.; GHEYSEN, G. Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. **Gene** 492, p.19-31, 2012.

HOLTERMAN, M.; RYBARCZYK, K.; VAN DEN ELSEN, S.; VAN MEGEN, H.; MOOYMAN, P.; PEÑA-SANTIAGO, R.; BONGERS, T.; BAKKER, J.; HELDER, J. A ribosomal DNA-based framework for the detection and quantification of stress-sensitive nematode families in terrestrial habitats. **Molecular Ecology Resources** 8, p.23-34, 2008.

HOLTERMAN, M.; VAN DER WURFF, A.; VAN DEN ELSEN, S.; VAN MEGEN, H.; BONGERS, T.; HOLOVACHOV, O.; BAKKER, J.; HELDER, J. Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. **Molecular Biology and Evolution** 23, p.1.792-1.800, 2006.

JONES, J. T.; HAEGEMAN, A.; DANCHIN, E. G.; GAUR, H. S.; HELDER, J.; JONES, M. G.; KIKUCHI, T.; MANZANILLA-LÓPEZ, R.; PALOMARES-RIUS, J. E.; WESEMAEL, W. M. L.; PERRY, R. N. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology** 14, p.946-961, 2013.

MACHIDA, R. J.; KNOWLTON, N. PCR Primers for Metazoan Nuclear 18S and 28S Ribosomal DNA Sequences. **PLoS ONE** 7(9), p.e46.180, 2012.

MOURA, R. M. O gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose: Parte II. In: FERNANDES, J.M.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. (eds.). **Revisão anual de patologia de plantas**, p. 281-315, 1997.

NICOL, J. M.; TURNER, S. J.; COYNE, D. L.; DEN NIJS, L.; HOCKLAND, S.; MAAFI, Z. T. Current nematode threats to world agriculture. In: JONES, J.T.; GHEYSEN, G.; FENOLL, C. (eds) **Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions**, p. 21-44, 2011.

OLIVEIRA, C. S.; ASMUS, G. L. Reação de cultivares de sorgo sacarino a *Meloidogyne javanica*, *Rotylenchulus reniformis* e *Pratylenchus brachyurus*. **Revista de Agricultura Neotropical** 4, p.68-73, 2018.

PRESTES, A. R.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W. C.; COSTA, H. Rotação de culturas no manejo de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas** 7, p.369-405, 1999.

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

RIGGS, R. D.; SCHMITT, D. P. Complete characterization of the race scheme for *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology** 3, p.392-395, 1988.

RITZINGER, C. H. S. P.; SOUZA, J. S. Situação dos problemas nematológicos na região Norte do Brasil. In: Congresso brasileiro de nematologia 12 **Anais**. Uberlândia Sociedade Brasileira de Nematologia Instituto de Ciências Agrárias Universidade Federal de Uberlândia, p.82-86, 2000.

SEESÃO, Y.; GAY, M.; MERLIN, S.; VISCOGLIOSI, E.; ALIOUAT-DENIS, C. M.; AUDEBERT, C. A review of methods for nematode identification. **Journal of microbiological methods** 138, p.37-49, 2017.

SOARES, P. L. M.; VIDAL, R. L.; NASCIMENTO, D. D.; THOMAZELLI, G. S.; COSTA, J. P. G.; FERREIRA, R. J. Os nematoides de galha (*Meloidogyne* spp.) nas culturas de milho e sorgo. In: PAES, M. C. D.; PINHO, R. G. V.; MOREIRA, S. G. (Org.). Soluções integradas para os sistemas de produção de milho e sorgo no Brasil. Sete Lagoas-MG: ABMS 1, p.66-105, 2018.

SOARES, P. L. M.; NASCIMENTO, D. D.; VIDAL, R. L.; VIZENTINI, L. R. Controle Biológico de Nematoides. In: BALDIN, E. L.; KRONK, A. Z.; SILVA, I. F. (Org.). Inovações em manejo fitossanitário. Botucatu-SP, p.FEPAF 1:167-189, 2017.

SUBBOTIN, S. A.; CHITAMBAR, J. J.; CHIZHOV, V. N.; STANLEY, J. D.; INSERRA, R. N.; DOUCET, M. E.; MCCLURE, M.; YE, W.; YEATES, G. W.; MOLLOV, D. S.; CANTALAPIEDRA-NAVARRETE, C.; VOVLAS, N.; VAN DEN BERG, E.; CASTILLO, P. Molecular phylogeny, diagnostics, and diversity of plant-parasitic nematodes of the genus *Hemicycliophora* (Nematoda: Hemicycliophoridae). **Zoological Journal of the Linnean Society** 171, p.475-506, 2014.

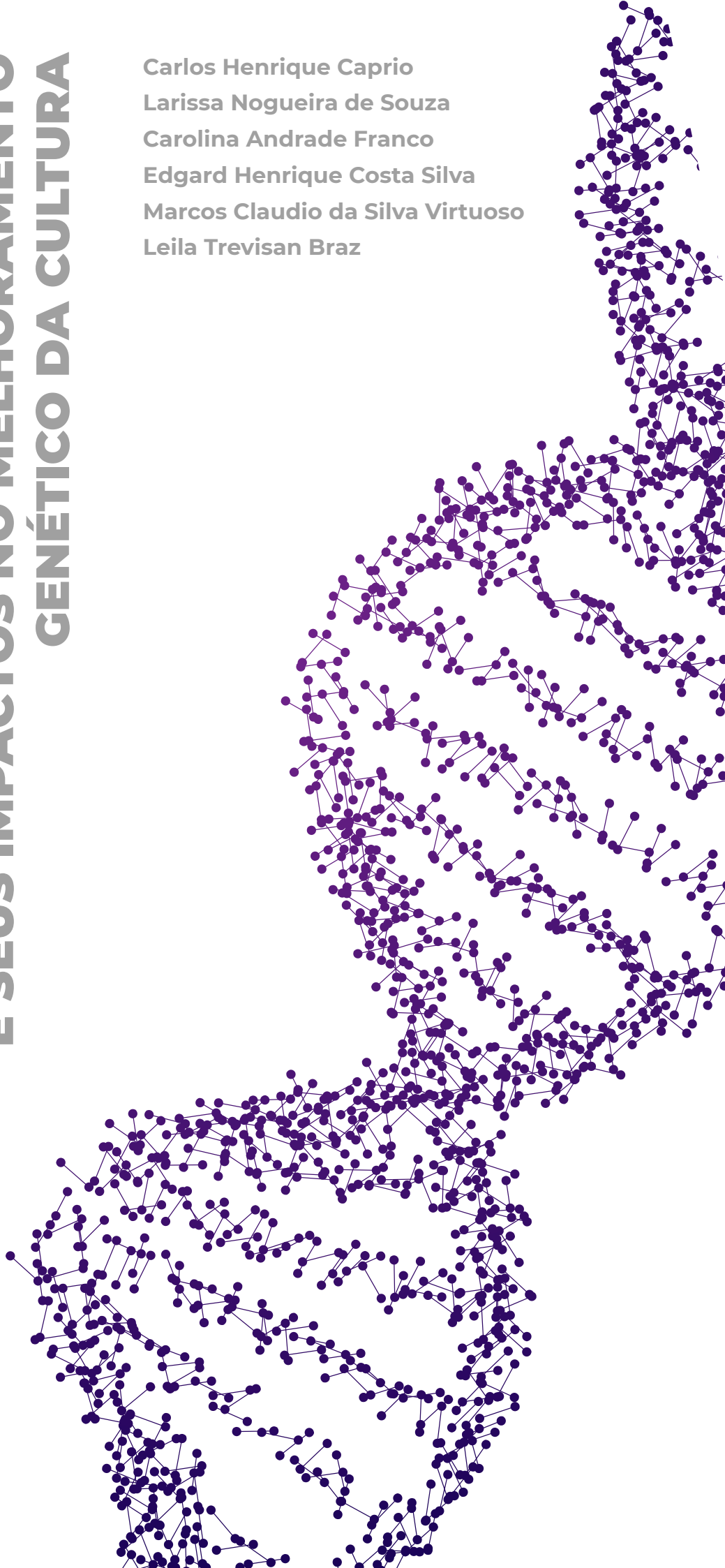
VAN DER PUTTEN, W. H.; COOK, R.; COSTA, S.; DAVIES, K. G.; FARGETTE, M.; FREITAS, H.; HOL, W. H. G.; KERRY, B. R.; MAHER, N.; MATEILLE, T.; MOENS, M.; PEÑA, E.; PIŚKIEWICZ, A. M.; RAEYMAEKERS, D. W.; RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA, S.; VAN DER WURFF, A. W. G. Nematode interactions in nature: models for sustainable control of nematode pests of crop plants?. **Advances in Agronomy** 89, p.227-260, 2006.

VAN MEGEN, H.; VAN DEN ELSEN, S.; HOLTERMAN, M.; KARSEN, G.; MOOYMAN, P.; BONGERS, T.; HOLOVACHOV, O.; BAKKER, J.; HELDER, J. A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences. **Nematology** 11, p.927-950, 2009.

CAPÍTULO IX

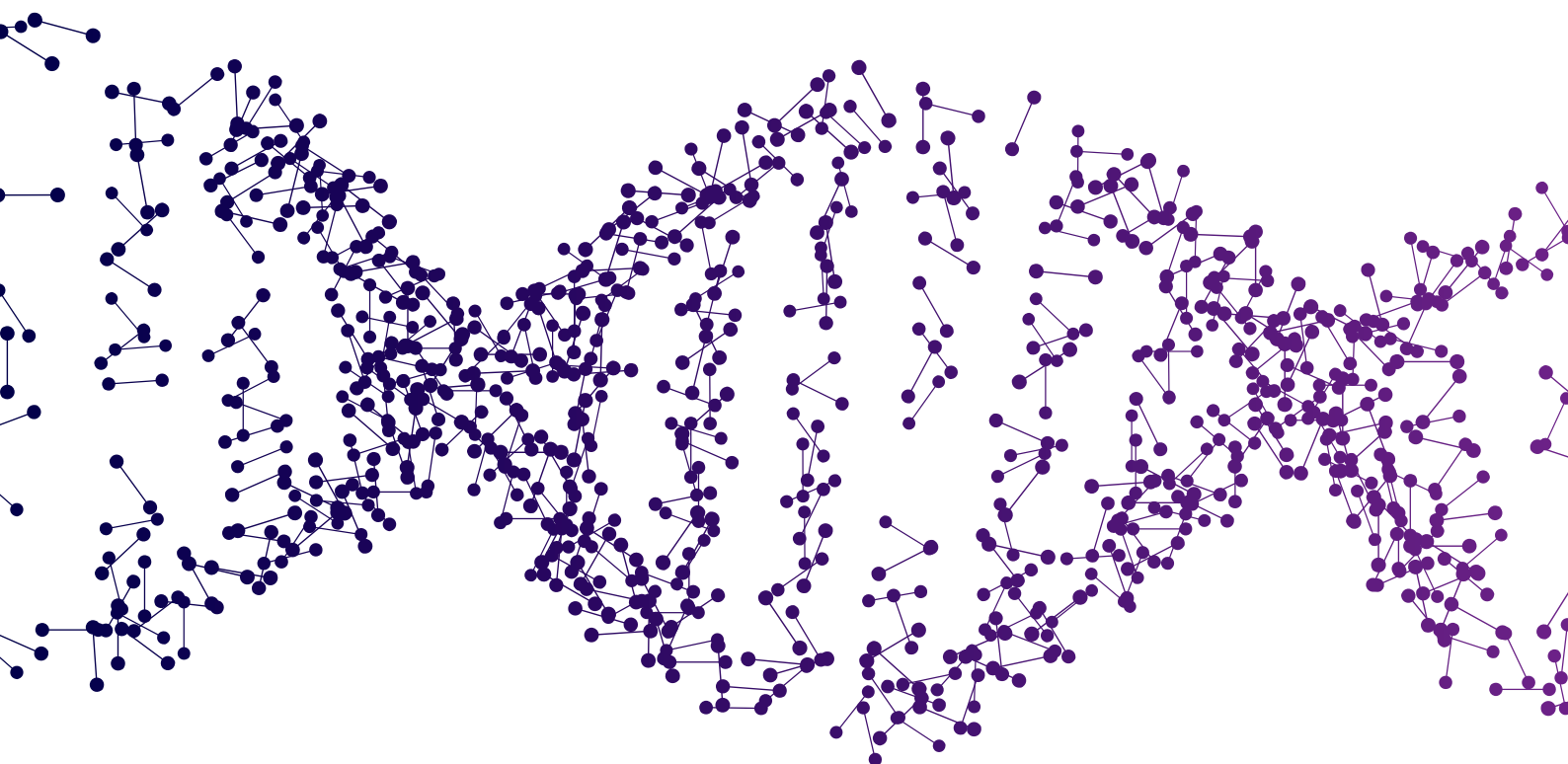
BREMIA LACTUCAE: O MÍLDIO DA ALFACE E SEUS IMPACTOS NO MELHORAMENTO GENÉTICO DA CULTURA

Carlos Henrique Caprio
Larissa Nogueira de Souza
Carolina Andrade Franco
Edgard Henrique Costa Silva
Marcos Claudio da Silva Virtuoso
Leila Trevisan Braz



CONTEÚDO

1	Introdução	104
2	O míldio da alface	104
3	Resistência de alface à <i>Bremia lactucae</i>	105
4	Distribuição e identificação de raças de <i>Bremia lactucae</i>	106
5	Perspectivas e desafios	108
	Referências	109



1 INTRODUÇÃO

A alface é uma das hortaliças folhosas mais consumidas em todo o mundo, desempenhando importante função socioeconômica. No Brasil, os principais estados produtores de alface estão localizados na região Sudeste do País, sendo: São Paulo com 31% da produção nacional, Rio de Janeiro com 27% e Minas Gerais com 7%. Somente no Estado de São Paulo essa cultura ocupa cerca de 11 mil hectares, especialmente na região do Cinturão Verde de São Paulo (IEA, 2018). Em outros municípios, a produção visa a abastecer mercados locais. De acordo com a Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo - CEAGESP, cerca de 49.435 toneladas foram comercializadas em todo o estado, entre janeiro e dezembro de 2016 (AGRIANUAL, 2019).

O cultivo da alface, no entanto, tem sido desfavorecido pela presença de inúmeras doenças. As aplicações de fungicidas constituem 24% dos gastos de insumos, o que representa cerca de 8% do custo de produção da cultura (AGRIANUAL, 2019). No inverno e na primavera, quando há condições climáticas mais favoráveis ao desenvolvimento desta olerícola, as principais doenças que limitam seu cultivo são o míldio (*Bremia lactucae* Regel) e o mofo-branco (*Sclerotinia* spp.) (TÖFOLI et al., 2014).

O míldio, causado por *Bremia lactucae*, é uma doença de distribuição mundial e é tida como uma das mais importantes e severas da cultura, devido seu alto poder destrutivo, tanto em casa de vegetação, como em campo (ZAMBOLIM et al., 2000). Além da alface, o patógeno *B. lactucae* foi relatado no Brasil infectando alcachofra (*Cynara scolymus* L.), serralha-lisa e serralha-de-espinho (*Sonchus oleraceus* L. e *S. asper* L.) (VIEIRA; BARRETO, 2006). Além disso, esse patógeno apresenta grande variabilidade genética, o que dificulta o uso de cultivares resistentes no controle da doença.

O entendimento das características de *B. lactucae* e sua dinâmica populacional, como também dos mecanismos de resistência da alface ao míldio, podem levar ao desenvolvimento de novas estratégias para o controle dessa doença no Brasil.

2 O MÍLDIO DA ALFACE

O patógeno *Bremia lactucae*, pertence ao gênero *Bremia*, que agrupa oomicetos pertencentes à família Peronosporaceae, do Reino Straminipila (MICHELMORE; INGRAM, 1981; PADGETT-JOHNSON; LAEMMLEN, 2009). A infecção por este patógeno tem gerado grandes perdas na produção de alface, o que o torna uma das doenças mais devastadoras dessa cultura, visto que é capaz de infectar a planta em qualquer estágio de desenvolvimento. O inóculo inicial geralmente consiste em esporângios transportados pelo ar ou pela água, provindos de plantas de alface doentes ou de outros hospedeiros alternativos do gênero *Lactuca* ou, ainda, de restos de cultura infectados (CRUTE, 1992; LOPES et al., 2010).

Os fatores ambientais influenciam fortemente a doença, tais como a tem-

peratura, a umidade relativa, a velocidade do vento, a radiação solar e a duração do molhamento foliar na esporulação, na dispersão, na sobrevivência e nos processos de infecção de *B. lactucae* (LEBEDA et al., 2008). Este patógeno tem seu desenvolvimento favorecido em locais de clima ameno, onde, em um ambiente com umidade relativa superior a 90% e com temperatura de 23°C, a sobrevivência dos esporângios será maior do que a 31°C (WU et al., 2000). Para a ocorrência, são requeridos, pelo menos, 3 a 4 horas de duração de molhamento foliar durante o processo de infecção (FALL et al., 2015).

A sintomatologia consiste na formação de manchas verde-claras ou amareladas na face superior da folha doente, tornando-se necróticas, ao mesmo tempo em que, na face inferior, observam-se eflorescências esbranquiçadas pulverulentas do oomiceto (BEDENDO et al., 2011). A severidade da doença pode variar de acordo com a época de plantio, com o manejo da cultura, bem como com as cultivares utilizadas (LOPES et al., 2010).

Em geral, o controle efetivo do míldio dá-se pela combinação de cultivares resistentes e frequentes aplicações de fungicidas. Contudo, o uso de produtos fitossanitários apresenta uma série de inconvenientes, tais como a persistência de resíduos, custos elevados, baixa eficiência - dado ao curto ciclo da cultura - e elevada pressão de seleção sobre o patógeno, propiciando a seleção de raças resistentes aos fungicidas (XU, 2011; PETRŽELOVÁ et al., 2013). Algumas moléculas produzidas a partir de lipopeptídeos de *Bacillus* spp. têm sido estudadas e apresentam potencial para o desenvolvimento como biopesticida para o controle de *B. lactucae*. Porém, essas moléculas ainda não estão disponíveis para o produtor (DERAVEL et al., 2014).

Além do emprego de cultivares resistentes e eventualmente de fungicidas, algumas medidas culturais auxiliam na maximização do controle da doença. Dentre tais práticas, incluem-se o uso de mudas saudáveis e a utilização de um espaçamento adequado que permita boa aeração entre as plantas. Além disso, faz-se necessário também promover a rotação de culturas, eliminar os restos ao final dos ciclos de colheita e evitar a irrigação que possibilite longo período de molhamento foliar (LOPES et al., 2010).

3 RESISTÊNCIA DE ALFACE À *Bremia lactucae*

Apesar do uso de cultivares resistentes ao míldio associado à aplicação de fungicidas seja o método mais eficaz de controle da doença, vários relatos de raças fisiológicas e adaptações a fungicidas têm sido observados ao longo dos anos (BROWN et al., 2004; MICHELMORE; WONG, 2008; VAN HESE et al., 2016). Assim, a obtenção de tais genótipos resistentes à doença exige grande esforço por parte dos melhoristas, uma vez que é necessário conhecer a interação patógeno-hospedeiro, as fontes de resistência disponíveis, assim como o comportamento e a estrutura da população do patógeno.

Diversos mecanismos genéticos de resistência ao míldio da alface foram identificados em espécies de *Lactuca*. No entanto, a relação entre *Lactuca* spp. e *B. lactucae* é uma das interações gene a gene (raça-específica) mais bem caracterizada

(JOHNSON; CRUTE, 1975; FARRARA et al., 1987; LEBEDA et al., 2002; PARRA et al., 2016). Nesta interação, os genes de resistência da alface (Dm ou FR) correspondem a fatores de avirulência no patógeno (Avr). A combinação de um gene Dm ou fator de resistência com um fator Avr resulta em interação incompatível, expressa como hipersensibilidade do hospedeiro, ou seja, quando não ocorre doença (CRUTE, 1992; BUENO et al., 2006; e LEBEDA et al., 2007). Esse tipo de resistência é oligogênica, completa ou qualitativa, também sendo chamada de resistência vertical, que se verifica na interação diferencial significativa entre raças e cultivares.

Nos últimos anos, o melhoramento de alface, visando à resistência ao míldio, tem sido baseado nessa interação. Os genes *Dm* ou FR têm conferido alto nível de resistência em cultivares de alface do mundo (PETRŽELOVÁ et al., 2013; BRAZ et al., 2016; TOBAR-TOSSE et al., 2017). A introgressão de genes *Dm* ou FR de espécies silvestres do gênero *Lactuca*, como *L. saligna* e *L. serriola*, tem resultado no aumento do número de genes de resistência utilizados pelos programas de melhoramento e, conseqüentemente, no número de cultivares disponíveis (GRUBE; OCHOA, 2005; LEBEDA et al., 2007; MICHELMORE; WONG, 2008; PARRA et al., 2016).

Atualmente, já foram descritas mais de 52 fontes distintas de resistência ao míldio da alface (CRUTE; LEBEDA, 1981; MICHELMORE; WONG, 2008; PARRA et al., 2016). No entanto, a utilização de tais genes só é efetiva apenas temporariamente, até que novas mudanças na virulência dos agentes patogênicos ocorram dentro da população, quebrando a resistência genética das cultivares recém-lançadas, fato este que afeta diretamente a frequência dos fatores de virulência na população do patógeno (LEBEDA et al., 2007). A quebra da resistência também pode ocorrer por conta da base genética estreita, devido ao uso de poucos genes de resistência na obtenção de cultivares. A fim de se diminuir essa pressão e, conseqüentemente, a rápida quebra da resistência, é recomendado utilizar cultivares com diferentes genes Dm ou FR (PETRŽELOVÁ et al., 2013). Portanto, o controle permanente do míldio da alface requer busca contínua por novos genes de resistência (LEBEDA et al., 2007).

Nesse contexto, a variabilidade genética entre as populações de *B. lactucae* deve ser considerada no planejamento de experimentos focados na pesquisa de mecanismos de resistência (LEBEDA et al., 2007), pois o vertiginoso surgimento de novas raças faz com que os melhoristas busquem constantemente superar a patogenicidade das raças de *B. lactucae*. Assim, programas de melhoramento para a resistência de míldio da alface, para serem bem-sucedidos, devem considerar a distribuição da virulência das populações do patógeno nas regiões produtoras.

4 DISTRIBUIÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE RAÇAS DE *Bremia lactucae*

Para avaliar a distribuição e a variação da virulência na população de *B. lactucae* da Europa, em 1998, foi criado o International Bremia Evaluation Board (IBEB), que foi estabelecido por pesquisadores de empresas públicas e privadas na Europa a fim de padronizar procedimentos para identificação e classificação de variação em populações europeias (GUENARD et al., 1999; VAN ETTEKO-

VEN; VAN DER AREND, 1999). Isso proporcionou a definição de um conjunto de cultivares diferenciadoras, que a partir daí, são periodicamente atualizadas, e protocolos para fenótipos de virulência e denominação de raças. Na Europa, mais de 100 padrões de virulência diferentes são encontrados a cada ano, e cerca de 29 foram denominadas como raças de *B. lactucae* (IBEB, 2018).

No Brasil, o monitoramento de *B. lactucae* tem sido realizado desde 2003 no Estado de São Paulo, com exceção de 2005, quando houve um ano de pausa das atividades. As coletas e o monitoramento têm sido realizados pelo alunos do Núcleo de Estudos em Olericultura e Melhoramento (NEOM), sob a supervisão da Profa. Dra. Leila Trevisan Braz, da Universidade Estadual Paulista, do Câmpus de Jaboticabal (UNESP-FCAV). Na primeira pesquisa, em 2003 e 2004, a primeira raça foi identificada e denominada SPBl:01 (BRAZ et al., 2007). Posteriormente, em 2006 e 2007, foram encontradas outras três: SPBl:02, SPBl:03 e SPBl:04 (SOUZA et al., 2011). Em 2008, 2009 e 2010, houve mais três raças: SPBl:05, SPBl:06 e SPBl:07 (CASTOLDI et al., 2012). Em 2011, foram encontradas mais duas: SPBl:08 e SPBl:09 (GALATTI et al., 2012). E em 2012 e 2013, a presença de outras três: SPBl:10, SPBl:11; e SPBl:12, foram detectadas (NUNES et al., 2016). Em 2014, novas raças foram identificadas: SPBl:13, SPBl:14, SPBl:15 e SPBl:16. Em 2015, foi identificada a SPBl:17 (MARIN, 2016).

Portanto, em São Paulo, após a caracterização de cerca de 600 isolados, 17 raças de *B. lactucae* foram identificadas até 2015. Essas raças foram identificadas usando o conjunto de cultivares diferenciadoras de alface IBEU-EU, que apresentam genes resistentes conhecidos (genes *Dm*) ou resistências geneticamente não bem caracterizadas (Fatores de Resistência - FR). De 2003 a 2013, utilizou-se o conjunto EU-A de diferenciadoras (VAN ETTEKOVEN; VAN DER AREND, 1999). Em 2014 e 2015, utilizou-se o código EU-B. De 2016 até o presente momento, tem-se utilizado o código EU-C. Recentemente, o mesmo laboratório também está monitorando isolados provindos da região Sul do Brasil, agregando conhecimento sobre a dinâmica populacional desse patógeno.

As raças que apresentam maior frequência entre os locais avaliados e, ao longo dos anos, no Estado de São Paulo, são: SPBl:01, 02, 03 e 04 (FRANCO, 2016). Para alguns autores, somente estas seriam realmente consideradas raças, devido à estabilidade de ocorrência em diversos monitoramentos realizados (dados não publicados).

Os genes de virulência observados com maior frequência nos isolados estudados, no Estado de São Paulo, foram: v1, v2, v3, v4, v5/8, v7, v10, v11, v12 e v13. Esses genes de virulência ocorreram em 100% dos isolados avaliados até 2015. Além desses, v6, v14, v15, v16, v18, v36 e v37 também foram observados, mas em menor incidência (FRANCO, 2016; MARIN, 2016).

Esse mesmo trabalho de identificação de raças e de genes de virulência de *B. lactucae* tem sido realizado em vários países como: Alemanha (LEBEDA; ZINKERNAGEL, 2003), Austrália (TRIMBOLI; NIEUWENHUIS, 2011), Bélgica (VAN HESE et al., 2016), Estados Unidos da América (ILOTT et al., 1985), França (MAISONNEUVE et al., 2011), Israel (SHARAF et al., 2007), Noruega (NORDSKOG et al., 2014) e República Tcheca (PETRŽELOVÁ et al., 2013). O

v17 não foi identificado no Estado de São Paulo até o momento, também sendo o menos frequente no mundo todo (PETRŽELOVÁ et al., 2013). O v38, não identificado em São Paulo, foi observado primeiramente na Alemanha e em Israel, sendo recentemente detectado na República Tcheca, em *L. serriola*. Assim como no Estado de São Paulo, as frequências do v36 e do v37 têm aumentado na Alemanha, na República Tcheca e na Austrália (LEBEDA; ZINKERNAGEL, 2003; MAISONNEUVE et al., 2011; TRIMBOLI; NIEUWENHUIS, 2011; PETRŽELOVÁ et al., 2013; FRANCO, 2016; MARIN, 2016).

Os estudos no Estado de São Paulo, bem como no Brasil, precisam ser aprofundados para a confirmação das raças, dos genes de virulência, do surgimento de novos patótipos e da dinâmica populacional de *B. lactucae*. Métodos modernos de inferência filogenética são necessários para esclarecer as relações entre isolados coletados no Brasil e no mundo todo. A falta deste conhecimento/estudo representa grande lapso de informações, que podem ser refletidas na menor eficiência do controle do míldio no Brasil.

Programas de melhoramento para a resistência de míldio da alface para serem bem-sucedidos, devem considerar a distribuição da virulência das populações do patógeno nas regiões produtoras. Para tanto, os melhoristas devem caracterizar quais são as raças mais importantes e, assim, selecionar genes de resistência adequados para cada região de plantio (LEBEDA; ZINKERNAGEL, 2003).

5 PERSPECTIVAS E DESAFIOS

Devido às características intrínsecas do patógeno, há vários desafios a serem enfrentados nas condições brasileiras. Há um histórico de quinze anos de monitoramento das raças de *B. lactucae*, sendo dezessete delas identificadas e dezesseis genes de virulência presentes na população. Os programas de melhoramento necessitam desses estudos para nortear o desenvolvimento de novas cultivares. A criação de uma organização composta por empresas privadas e públicas para nomear e padronizar os testes de resistência com as raças brasileiras do míldio da alface se faz premente.

Além disso, estudos relacionados à reprodução sexual do patógeno, como o levantamento dos tipos de talos presentes na população, ainda não foram realizados para explicar a emergência de novas raças. Testes visando ao monitoramento da emergência de isolados de *B. lactucae* resistentes a fungicidas também ainda não foram explorados como fonte de variabilidade na população. Em virtude de *B. lactucae* ser um patógeno biotrófico, estudos relacionados à especificidade dos isolados, coletados na cultura da alface, em serem capazes ou não de infectar espécies de plantas infestantes comuns, como *L. serriola*, ajudariam a identificar os hospedeiros alternativos do patógeno, como forma de se manter o patógeno presente na área, na ausência da alface.

À medida que essas informações forem elucidadas, tais descobertas ajudarão no aprimoramento das práticas de controle da doença, gerando maior sustentabilidade para a alface cultura brasileira.

REFERÊNCIAS

AGRIANUAL, 2019: Anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo: FNP – Consultoria & Agroinformativos, 2019. p. 119-121.

BEDENDO, I. P. Míldios. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. cap. 26, p. 467-472.

BRAZ, L. T.; DALPIAN, T.; PISSARDI, M. A. Identification of races of *Bremia lactucae* in São Paulo, Brazil. **Acta Horticulturae**, Seoul-Korea, v. 760, p. 317-321, 2007.

BRAZ, L.T.; DINIZ, G.M.M.; CASTOLDI R.; NUNES. R.; GALATTI, F.; CAMARGO, M.; MARIN, M.V.; DALPIAN, T.; SOUZA, J.O.; GOMES, R.F.; RABELO, H.O. Monitoring races of *Bremia lactucae* in the State of São Paulo from 2003 to 2012. **Acta Horticulturae**, v. 1.127, p. 325-329, 2016.

BROWN, S.; KOIKE, S. T.; OCHOA, O. E.; LAEMMLEN, F.; MICHELMORE, R. W. Insensitivity to the fungicide fosetyl-aluminum in California isolates of the lettuce downy mildew pathogen, *Bremia lactucae*. **Plant Disease**, v. 88, n. 5, p. 502-508, 2004.

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

CASTOLDI, R.; CHARLO, H. C. D. O.; DALPIAN, T.; MELO, D. M.; BOTELHO, A. P.; BRAZ, L. T. Identification of new *Bremia lactucae* races in lettuce in São Paulo state. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 209-213, 2012.

CRUTE, I. R. Downy mildew of lettuce. In: CHAUBE, H. S.; KUMAR, J.; MUKHOPADHYAY, A. N.; SINGH, U. S. (ed.) **Plant diseases of international importance**. New Jersey: Prentice Hall, Diseases of vegetable and oil seed crops. 1992. p.165–185.

CRUTE I. R.; LEBEDA, A. Evidence for a race-specific resistance factor in some lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars previously considered to be universally susceptible to *Bremia lactucae* regel. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 60, p.185-189, 1981.

DERAVEL, J.; LEMIÈRE, S.; COUTTE, F.; KRIER, F.; VAN HESE, N.; BÉCHET, M.; JACQUES, P. Mycosubtilin and surfactin are efficient, low ecotoxicity molecules for the biocontrol of lettuce downy mildew. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 98, n. 14, p. 6.255-6.264, 2014.

FALL, M.L.; BEAULIEU, C.; VAN DER HEYDEN, H.; CARISSE, O. *Bremia lactucae* infection efficiency under field conditions is modulated by leaf wetness duration and temperature. **Phytopathology**, v. 99, n. 7, p. 65-65, 2015.

FARRARA, B.F.; ILOTT, T.W.; MICHELMORE, R.W. Genetic analysis of factors for resistance (*Bremia lactucae*) in species of lettuce (*Lactuca sativa* and *L. serriola*). **Plant Pathology**, v. 36, n. 4, p. 499-514, 1987.

FRANCO, C.A. **Monitoramento de raças de *Bremia lactucae* em alface no ano de 2014 e sua distribuição no Estado de São Paulo**. Dissertação, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal-SP, Brasil. 2016.

GALATTI, F. S.; CASTOLDI, R.; BRAZ, L. T.; PANIZZI, R. C. Monitoramento de raças de *Bremia lactucae* em 2010 e 2011 no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, p. 271-279, 2012.

GRUBE, R. C.; OCHOA, O. E. Comparative genetic analysis of field resistance to downy mildew in the lettuce cultivars 'Grand Rapids' and 'Iceberg'. **Euphytica**, v. 142, n. 3, p. 205-215, 2005.

GUENARD, M.; CADOT, V.; BOULINEAU, F.; DE FONTANGES H. Collaboration between breeders and GEVES-SNES for the harmonization and evaluation of a disease resistance test: *Bremia lactucae* of the lettuce. In: LEBEDA, A.; KRÍSTKOVÁ, E. (eds). **Eucarpia Leafy Vegetables' 99, Olomouc (Czech Republic), 8-11 jun 1999. Palacky University**, p.177-181. 1999.

IBEB. 2018. **International *Bremia* Evaluation Board**. Disponível em: <http://www.worldseed.org/our-work/plant-health/other-initiatives/ibeb/>. Acesso em: 26 jan. 2018.

IEA, 2018. **Instituto de Economia Agrícola. Área e produção dos principais produtos da agropecuária**. Disponível em: http://ciagri.iea.sp.gov.br/nia1/subjetiva.aspx?cod_sis=1&idioma=1. Acesso em: 02 mar. 2018.

ILOTT, T. W.; DURGAN, M. E.; MICHELMORE, R. W. Genetics of virulence in California populations of *Bremia lactucae* (Lettuce Downy Mildew). **Phytopathology**, v. 77, n. 10, p.1.381-1.386, 1987.

JOHNSON, A. G.; CRUTE, I. R. *Bremia* and the way it affects lettuce varieties which are resistant. **The Grower**, v. 25, n. 1975, p. 742-743, 1975.

LEBEDA, A.; SEDLÁŘOVÁ, M.; PETŘIVÁLSKÝ, M.; PROKOPOVÁ, J. Diversity of defense mechanisms in plant- oomycete interactions: a case study of *Lactuca* spp. and *Bremia lactucae*. **European Journal of Plant Pathology**. v. 122, n. 1, p. 71-89. 2008.

LEBEDA, A.; PINK, D. A. C.; ASTLEY, D. Aspects of the interactions between wild *Lactuca* spp. and related genera and lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). In: SPENCER- PHILLIPS, P. T. N.; GISI, U.; LEBEDA, A. (Ed.). **Advances in downy mildew research**. Holanda: Kluwer Academic Publishers, 2002. p.85-117.

LEBEDA, A.; RYDER, E. J.; GRUBE, R.; DOLEZALOVA, I.; KRISTKOVA, E. Lettuce (Asteraceae; *Lactuca* spp.). In: SINGH, R.; BOCA RATON, F. L. (Ed.). **Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement series, vegetable crops**. EUA: CRC Press, 2007, p.377-472.

LEBEDA, A.; ZINKERNAGEL, V. Evolution and distribution of virulence in the German population of *Bremia lactucae*. **Plant Pathology**, v. 52, p. 41-51, 2003.

LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; REIS, A. **Doenças da alface**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2010. 68p.

MAISONNEUVE, B.; JEUNIAUX, S.; JUILLARD, E.; LOVERA, M. Virulence of *Bremia lactucae* populations in Southern France between 2006 and 2011. **Proceedings Eucarpia Leafy Vegetables**, p. 32, 2011.

MARIN, M.V. **Monitoramento de raças e distribuição dos fatores de virulência de *Bremia lactucae*, em alface, no Estado de São Paulo, em 2014 e 2015**. 2016. p.49. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Agrônoma)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2016.

MICHELMORE, R. W.; INGRAM, D. S. Recovery of progeny following sexual reproduction of *Bremia lactucae*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 77, n. 1, p. 131-137, 1981.

MICHELMORE, R.; WONG, J. Classical and molecular genetics of *Bremia lactucae*, cause of lettuce downy mildew. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 122, n. 1, p. 19-30, 2008.

NORDSKOG, B.; ELAMEEN, A.; GADOORY, D. M.; HERMANSEN, A. Virulence characteristics of *Bremia lactucae* populations in Norway. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 139, p. 679-686, 2014.

NUNES, R. D. C.; CASTOLDI, R.; GOMES, R. F.; TOBAR-TOSSE, D. E.; BRAZ, L. T. Survey of races of the causal agent of downy mildew of lettuce in the state of São Paulo in 2012 and 2013. **Summa Phytopathologica**, v. 42, p. 53-58. 2016.

PADGETT-JOHNSON, M.; LAEMMLEN, F. Downy mildew of lettuce (*Bremia lactucae*): biology, disease symptoms and damage. **Using the downy mildew index model for disease management**. 2009. Disponível em: <http://ucce.ucdavis.edu/files/filelibrary/2028/23067.pdf>. Acesso em: 02 mar. 2018.

PARRA, L.; MAISONNEUVE, B.; LEBEDA, A.; SCHUT, J.; CHRISTOPOULOU, M.; JEUKEN, M.; MCHALE, L.; TRUCO, M-J.; CRUTE, I.; MICHELMORE, R. Rationalization of genes for resistance to *Bremia lactucae*. **Euphytica**, v. 210, n. 3, p. 309-326, 2016.

PETRŽELOVÁ, I.; LEBEDA, A.; KOSMAN, E. Distribution, disease level and virulence variation of *Bremia lactucae* on *Lactuca sativa* in the Czech Republic in the period 1999-2011. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 161, n. 7-8, p. 503-514, 2013.

SHARAF, K.; LEWINSOHN, D.; NEVO, E.; BEHARAV, A. Virulence patterns of *Bremia lactucae* in Israel. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 35, n. 1, p. 100-108, 2007.

TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J.; FERRARI, J.T. Divulgação técnica: Míldio e mofo-branco da alface: doenças típicas de inverno. **Biológico**, São Paulo, v.76, n.1, p.19-24, 2014.

TOBAR-TOSSE, D.E.; CANDIDO, W.S.; MARIN, M.V.; PANIZZI, R.C.; BARBOSA, J.C.; BRAZ, L.T. Resistência de linhagens de alface-crespa às raças de *Bremia lactucae* identificadas no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 1, p.55-57, 2017

TRIMBOLI, D.; NIEUWENHUIS, J. New races of *Bremia lactucae* on lettuce in Australia. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 6, n. 1, p. 62-63, 2011.

VAN ETTEKOVEN, K.; VAN DER AREND, A. Identification and denomination of "new" races of *Bremia lactucae*. In: Eucarpia meeting on leafy vegetables genetics and breeding, Olomuc: Czech Republic, **Proceedings...**p. 105 – 107, 1999.

VAN HESE, N.; HUANG, C. J.; de VLEESSCHAUWER, D.; DELAERE, I.; PAUWELYN, E.; BLEYAERT, P.; HÖFTE, M. Evolution and distribution of virulence characteristics of Belgian *Bremia lactucae* populations between 2008 and 2013. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 144, n. 2, p. 431-441, 2016.

VIEIRA, B. S.; BARRETO, R. W. First record of *Bremia lactucae* infecting *Sonchus oleraceus* and *Sonchus asper* in Brazil and its infectivity to lettuce. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 154, n. 2, p. 84-87, 2006.

WU, B.M.; SUBBARAO, K.V.; VAN BRUGGEEN, H.C. Factors affecting the survival of *Bremia lactucae* sporangia deposited on lettuce leaves. **Phytopathology**, v. 90, p. 8, p. 827-833, 2000.

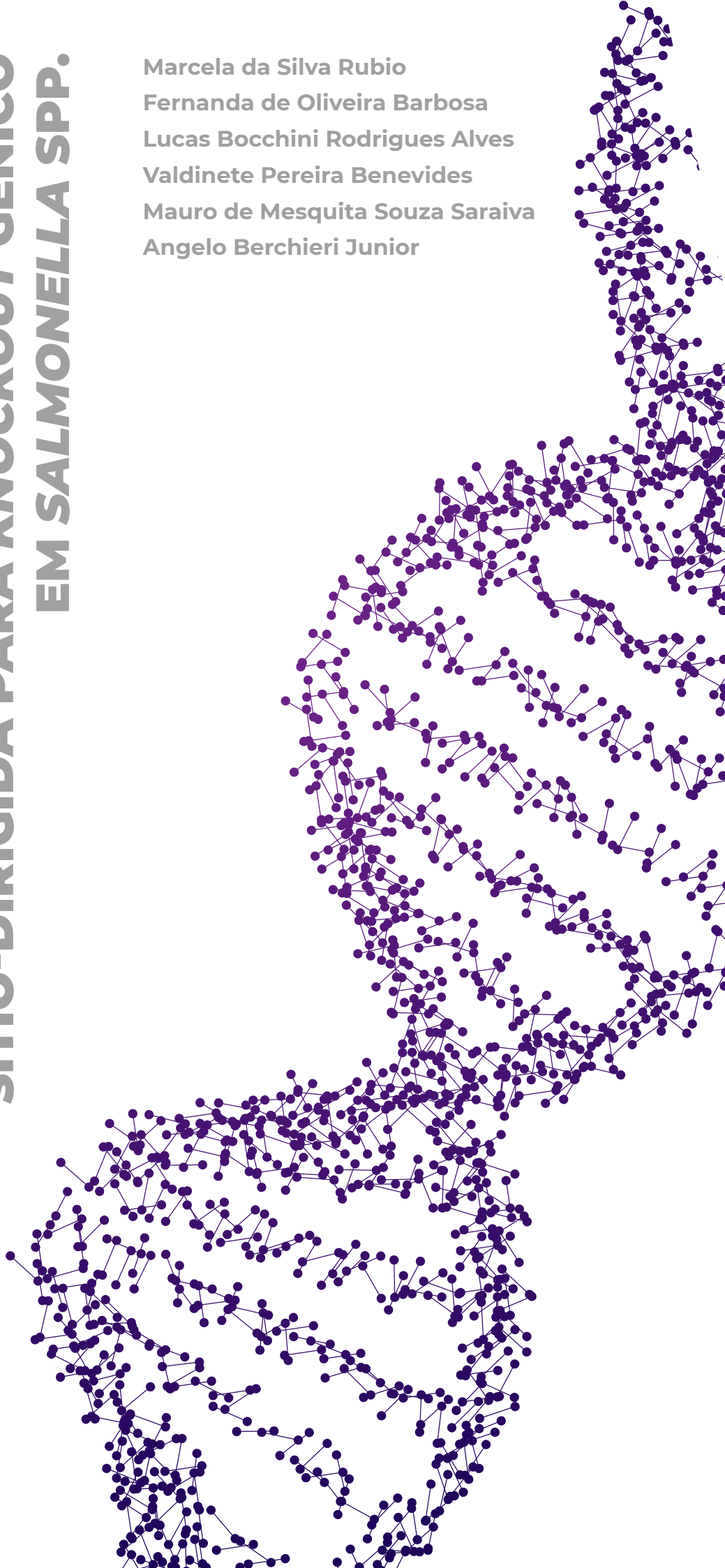
XU, L. **Development of molecular approaches in the study of lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*) population biology**. 2011. 262 f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais e Vegetais). University of Warwick, Coventry, 2011.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas-hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000. 444p.

CAPÍTULO X

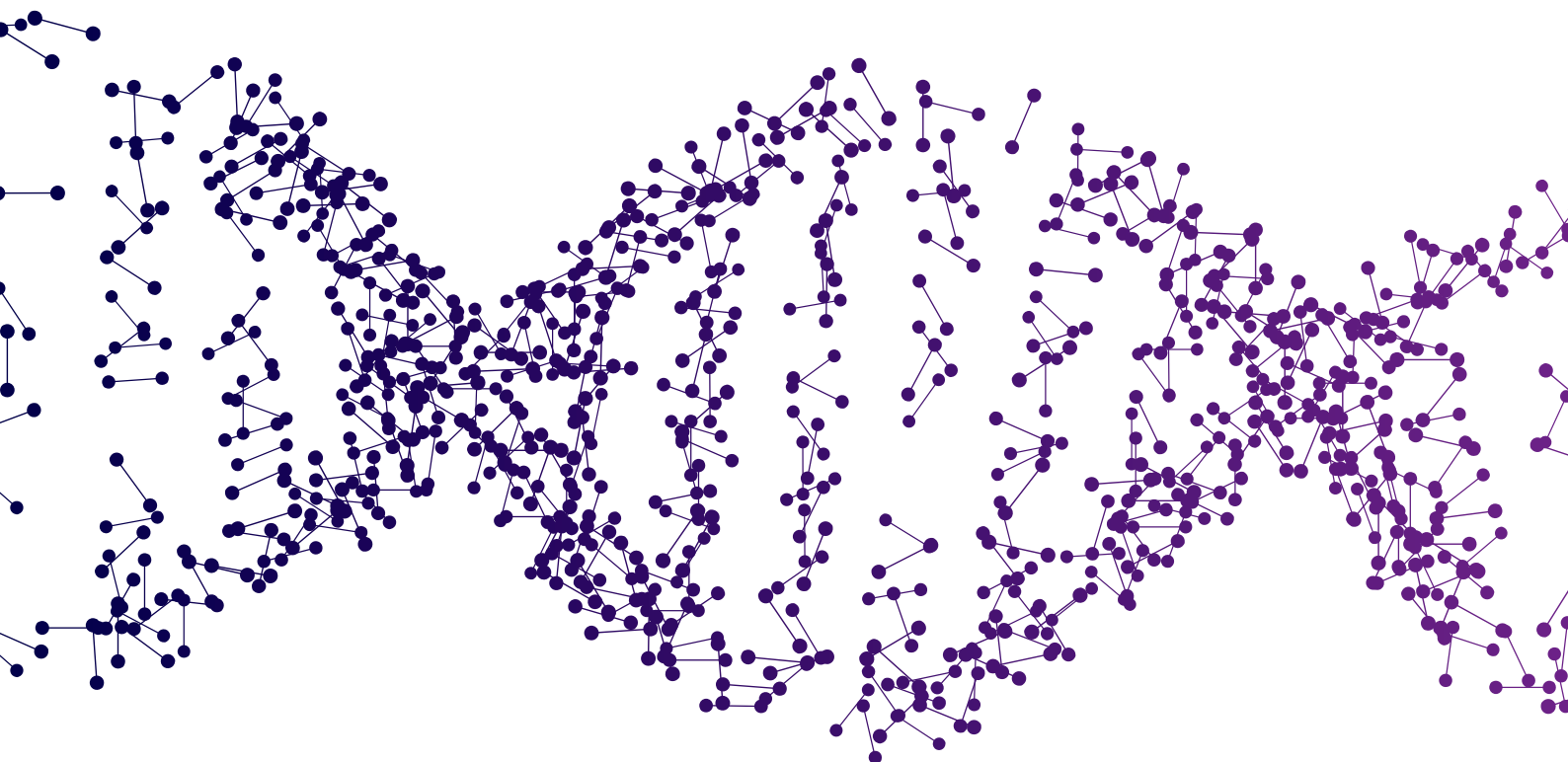
LAMBDA-RED: ENGENHARIA GENÉTICA SÍTIO-DIRIGIDA PARA KNOCKOUT GÊNICO EM *SALMONELLA* SPP.

Marcela da Silva Rubio
Fernanda de Oliveira Barbosa
Lucas Bocchini Rodrigues Alves
Valdinete Pereira Benevides
Mauro de Mesquita Souza Saraiva
Angelo Berchieri Junior



CONTEÚDO

1	Introdução	116
2	Mutação induzida	116
2.1	Mutação sítio-dirigida em <i>Salmonella</i> spp. por meio da técnica de <i>Lambda-Red</i>	117
2.2	Técnica de <i>Lambda-Red</i> propriamente dita.....	118
3	Considerações finais.....	119
	Referências	120



1 INTRODUÇÃO

Patógeno bacteriano gram-negativo, pertencente à família das *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* spp., é um dos maiores desafios sanitários enfrentados na produção animal e na saúde pública. O microrganismo é anaeróbio facultativo, intracelular e, em sua maioria, possui flagelos. Divididos em duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, foram identificados até o presente momento 2.659 sorovares, dos quais, 2.637 e 22 pertencem às espécies anteriormente citadas, respectivamente. Dentre estes, 100 sorovares são zoonóticos, tais como *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium ou, simplesmente, *Salmonella* Typhimurium (STM), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis ou *S. Enteritidis* (SE), entre outros. Nesses casos, podem acometer seres humanos, aves, suínos, bovinos, tifoide, camundongos, répteis e diversos outros seres vivos. Por outro lado, há aqueles hospedeiros-específicos causadores de quadros tifoides, como exemplos, *S. Dublin* (SD) em bovinos, *S. Typhi* em seres humanos e os dois únicos espécimes aflagelados, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum (SG), e biovar Pullorum (SP) em galináceos.

A ampla variedade de sorovares dificulta o desenvolvimento de vacinas que auxiliem no controle do patógeno. Dessa forma, a implementação de outras medidas de biossegurança ajuda na prevenção e na redução da ocorrência desse microrganismo. A ingestão de produtos de origem animal contaminados com esse patógeno tem causado surtos de infecção alimentar em seres humanos, com reconhecida importância para aqueles provenientes de aves comerciais, por se tratar de hospedeiros suscetíveis a bactérias do gênero. Durante as três fases da operação carne fraca no Brasil, no período compreendido entre os meses de março de 2017 e de 2018, foram registradas 337 notificações de produtos brasileiros de origem avícola contaminados por *Salmonella* spp. destinados aos países da União Europeia. No período de um ano após a deflagração da última fase, houve apenas 30 casos notificados. Essa redução significativa muito se deve ao fortalecimento das Instruções Normativas que determinam a monitoria, a prevenção e o controle de *Salmonella* spp. nesses produtos, o aumento na fiscalização e a redução de fraudes.

O quadro infeccioso é variável entre os diferentes sorovares. Alguns são colonizadores intestinais, outros causam infecção sistêmica e, ainda, há aqueles que provocam infecção mista (local e sistêmica). Dessa forma, conhecer tanto a patogenia da doença quanto a fisiologia e os mecanismos de defesa de *Salmonella* auxiliam no desenvolvimento de novos métodos de prevenção e controle deste microrganismo. Para tais fins, a mutagênese tem papel fundamental. No presente capítulo, abordaremos sobre a engenharia genética em *Salmonella* spp. com foco na técnica *Lambda-Red* desenvolvida por Datsenko e Wanner, em 2000.

2 MUTAÇÃO INDUZIDA

"Sem a mutação, a vida provavelmente não teria prosseguido além dos primórdios". Essa frase é defendida por um dos grupos pioneiros em estudos

de mutagênese, liderados pela alemã Charlotte Auerbach, em 1947. Contudo, a história da engenharia genética remonta há quase 100 anos, entre os anos de 1926 e 1927. Apesar de não saber como era a estrutura do DNA, Hermann J. Muller demonstrou que submeter ovos e células espermáticas de *Drosophila* spp. à radiação X, altera as características fenotípicas da mosca-da-fruta, o que leva ao aparecimento desde anormalidades corpóreas, até letalidade. Depois, Muller evidenciou a influência de elevada temperatura no processo de mutagênese. Dessa forma, foi comprovado que fatores artificiais podem mutar os cromossomos, relato reconhecido pelo Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina de 1946. No ano seguinte à premiação, Auerbach, Robson e Carr comprovaram que substâncias químicas também possuem propriedades mutagênicas, como no caso da ação do gás mostarda em *Drosophila* spp. Mesmo ao demonstrar a implicação de diversos fatores, as mutações induzidas ainda eram aleatórias e não possuíam especificidade.

Para maior especificidade, o uso de bacteriófagos e enzimas de restrição foram primordiais no desenvolvimento de técnicas sítio-dirigidas. Em 1971, Hutchison e Edgell inseriram pequenos fragmentos de DNA no bacteriófago ϕ X174 e, entre 1974 e 1975, a equipe liderada por Charles Weissmann publicou trabalhos com mutações pontuais no bacteriófago Q β . Com o advento da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), desenvolvida por Kary Mullis, a indução de mutação genética tomava novos caminhos. Em 2000, Kirill A. Datsenko e Barry L. Wanner propuseram um método para inativar genes cromossômicos em *Escherichia coli* K-12 em uma etapa, por meio da recombinação homóloga do produto de PCR, usando o sistema *Red* (γ , β , exo) do bacteriófago Lambda (λ). Mais recentemente, técnicas sítio-dirigidas de mutagênese, baseadas em *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR), têm sido desenvolvidas e amplamente utilizadas.

Apesar da facilidade na produção de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs), a pesquisa científica deve seguir uma série de regulamentações e normativas. No Brasil, antes de iniciar o processo de modificação genética, o protocolo experimental deve ser aprovado pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), instância colegiada multidisciplinar integrante do Ministério da Ciência e Tecnologia.

2.1 Mutação sítio-dirigida em *Salmonella* spp. por meio da técnica de *Lambda-Red*

Desde o advento da técnica, muito se avançou no entendimento sobre a relação parasito-hospedeiro perante o gênero *Salmonella* spp. e no desenvolvimento de vacinas. Na área animal, em 2018, popularizou-se na mídia o desenvolvimento laboratorial de uma estirpe de *Salmonella* capaz de combater células cancerígenas em camundongos. Esta bactéria, modificada por meio de *Lambda-Red*, era capaz de produzir proteína flagelar FlaB, que infecta os tumores e ativa o sistema imune do animal. Estudos que utilizam salmonelas de interesse na avicultura desenvolveram estirpes atenuadas, a expressão de flagelos em estirpes aflageladas e a produção de vacinas contra *Salmonella* spp., por meio dessa técnica.

2.2 Técnica de *Lambda-Red* propriamente dita

Alguns métodos foram desenvolvidos para introduzir DNA linear em bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas por recombinação homóloga. Datsenko e Wanner propuseram um método para inativar genes cromossômicos em *E. coli* K-12, em uma etapa, recombinao o produto de PCR, usando o sistema *Lambda-Red* (γ , β , exo). Dessa forma, aumenta a recombinação de DNA linear no cromossomo de *E. coli*, uma vez que promove eficiente reparação ou recombinação de quebra de fita dupla. Este método é análogo ao usado por muitos anos em levedura, sendo útil para a construção de mutantes, ao evitar o uso de plasmídeos suicidas ou a geração anterior de plasmídeos portadores das construções.

O sistema de recombinação *Lambda-Red* é composto pelas proteínas: Exo, Beta e Gama. Todas as três são indispensáveis para recombinar com um substrato de fita dupla de DNA (dsDNA), como um produto de PCR. No entanto, ao gerar uma modificação com um substrato de fita simples de DNA (ssDNA), somente Beta é necessária, dado que a protege contra a ação da enzima Exo e promove o emparelhamento ao alvo de ssDNA complementar. Gama evita que as endonucleases RecBCD e SbcCD dirigiram o DNA linear introduzido na bactéria. Por último, Exo é uma exonuclease dependente de dsDNA ($5' \rightarrow 3'$) que degradará o dsDNA linear a partir da extremidade $5'$ e gerará dois produtos possíveis: 1) um duplex de dsDNA parcialmente com extremidades $3'$ salientes, ou 2) se o dsDNA foi suficientemente curto, um ssDNA cuja cadeia complementar inteira foi degradada.

O uso de um substrato linear de dsDNA ou ssDNA depende do objetivo do experimento. O substrato de dsDNA é melhor para inserções ou deleções maiores de aproximadamente 20 nucleotídeos, enquanto o substrato de ssDNA é melhor para mutações pontuais ou alterações de apenas alguns pares de bases.

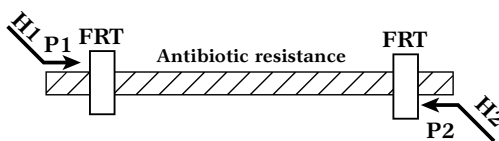
As inserções de dsDNA podem ser preparadas por meio de PCR, ao utilizar iniciadores que amplificam e flanqueiam a sequência de DNA de interesse. Comumente, estes iniciadores são compostos por aproximadamente 70 nucleotídeos, dos quais 20 emparelham com a sequência de DNA de interesse, e os outros 50 são homólogos às regiões flanqueadoras do local-alvo. As melhores aplicações para inserções de dsDNA incluem: grandes inserções ou deleções, incluindo fragmentos de DNA selecionáveis, como genes de resistência a antimicrobianos, bem como fragmentos de DNA não selecionáveis, como substituições de genes e *tags*. A frequência típica de recombinantes é de 1 clone positivo de 10^4 a 10^5 colônias.

O procedimento de inserção de substrato é realizado por meio da eletroporação, que consiste na aplicação de pulsos elétricos curtos de alta voltagem que aumentam o potencial de transporte de membrana, que promovem uma formação transitória de poros aquosos na bicamada lipídica. Dessa forma, é possível que macromoléculas migrem através desses poros.

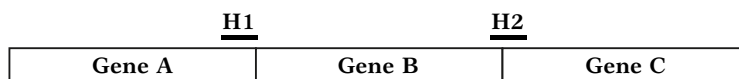
Resumidamente, o plasmídeo *pkd46* é inserido em células competentes por eletroporação. A expressão das proteínas do sistema *Lambda-Red* é ativada

com o uso de L-arabinose, durante multiplicação bacteriana, até atingir a fase exponencial. Estas são transformadas em células competentes para inserção de produto de PCR homólogo ao gene de interesse, o que leva a sua substituição. Por fim, o plasmídeo pcp20 é inserido e produzirá enzimas que atuarão nos sítios de restrição FRT, eliminando o cassete de resistência ao antimicrobiano. Posteriormente, por possuírem replicação termossensível, a cultura bacteriana é cultivada sob alta temperatura, de modo a expulsar os plasmídeos utilizados durante a execução da técnica. Dessa forma, o procedimento de deleção do gene-alvo é finalizado (Figura 1).

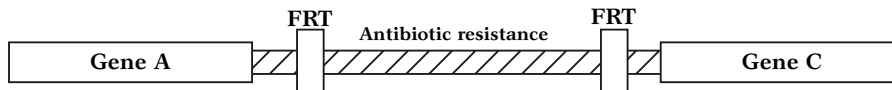
Step 1. PCR amplify FRT-flanked resistance gene



Step 2. Transform strain expressing λ Red recombinase



Step 3. Select antibiotic-resistant transformants



Step 4. Eliminate resistance cassette using a FLP expression plasmid

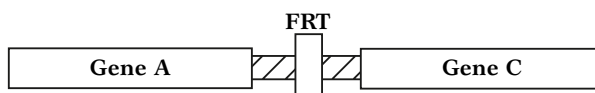


Figura 1. Estratégia simples de interrupção de genes. **H1 e H2:** Regiões homólogas; **P1 e P2:** Regiões de anelamento dos iniciadores.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica do *Lambda-Red* pode ser utilizada para fazer uma variedade de modificações: inserção, exclusão de sequências selecionáveis e não selecionáveis, mutações pontuais ou outras pequenas mudanças de pares de bases além da adição de *tags* proteicos. Também tem a flexibilidade para modificar o cromossomo bacteriano, DNA plasmidial ou cromossomo artificial bacteriano. Mesmo com o advento de novas técnicas de engenharia genética, a mutagenese sítio-dirigida por *Lambda-Red* é uma ferramenta confiável e amplamente utilizada.

REFERÊNCIAS

AUERBACH, C.; ROBSON, J. M.; CARR, J. G. The Chemical Production of Mutations. **Science**, v. 105, n. 2.723, p. 243-247, 1947. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/science.105.2723.243>

BARBOSA, F. O.; FREITAS NETO, O. C.; BATISTA, D. F. A.; ALMEIDA, A. M.; RUBIO, M. S.; RODRIGUES ALVES, L. B.; VASCONCELOS, R. O.; BARROW, P. A.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Contribution of flagella and motility to gut colonisation and pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis in the chicken. **Braz. J. Microbiol.**, v. 48, n. 4, p. 754-759, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.012>.

BATISTA, D. F. A.; FREITAS NETO, O. C.; ALMEIDA, A. M.; MABONI, G.; CARVALHO, T. F.; CARVALHO, T. P.; BARROW, P. A.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Evaluation of pathogenicity of *Salmonella* Gallinarum strains harbouring deletions in genes whose orthologues are conserved pseudogenes in *S. Pullorum*. **PLoS One**, v. 13, n. 7, e0200585, 2018.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; MURPHY, C. K.; MARSTON, K.; BARROW, P. A. Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. **Avian Pathology**, London, v. 30, n. 3, p. 221-231, 2001. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/03079450120054631> > .

BERCHIERI JÚNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J. D.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. (Eds.). **Doenças das Aves**. 2. ed. Campinas: FACTA, 2009, p. 435-453.

DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 12, p.6.640- 6.645, 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.120163297>.

FOOD AND FEED SAFETY ALERTS (RASFF). **RASFF Portal**. Disponível em: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/>. Acesso em: 19 mar. 2019.

FREITAS NETO, O. C.; SETTA, A.; IMRE, A.; BUKOVINSKI, A.; ELAZOMI, A.; KAISER, P.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; BARROW, P.; JONES, M. A flagellated motile *Salmonella* Gallinarum mutant (SG Fla+) elicits a pro-inflammatory response from avian epithelial cells and macrophages and is less virulent to chickens. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 164, n. 3-4, p. 425-433, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.015>.

HUTCHISON III, C. A.; EDGELL, M. H. Genetic Assay for Small Fragments of Bacteriophage ϕ X174 Deoxyribonucleic Acid. **Journal of Virology**, v. 8, n. 2, p. 181-189, 1971.

MULLER, H. J. The measurement of gene mutation rate in drosophila, its high variability, and its dependence upon temperature. **Genetics**, v. 13, n. 4, p. 279-357, 1928.

MÜLLER, W.; WEBER, H.; MEYER, F.; WEISSMANN, C. Site-directed mutagenesis in DNA: Generation of point mutations in cloned β globin complementary DNA at the positions corresponding to amino acids 121 to 123. **J. Mol. Biol.**, v. 124, n. 2, p. 343-358, 1978. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(78\)90303-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(78)90303-0).

MURPHY, K. λ Recombination and Recombineering. **EcoSal Plus**, v. 7, n. 1, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/ecosalplus>.

RODRIGUES ALVES, L. B.; FREITAS NETO, O. C.; BATISTA, D. F. A.; BARBOSA, F. O.; RUBIO, M. S.; SOUZA, A. I. S.; ALMEIDA, A. M.; BARROW, P. A.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Inactivation of *phoPQ* genes attenuates *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum to susceptible chickens. **Braz. J. Microbiol.**, v. 49, n. 3, p. 601-606, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2017.09.006>.

SERRA-MORENO, S.; ACOSTA, S.; HERNALSTEENS, J.P.; JOFRE, J.; MUNIESA, M. Use of the lambda Red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes. **BMC Molecular Biology**. v. 7, n. 31, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2199-7-31>.

THOMASON, L. C.; SAWITZKE, J. A.; LI, X.; COSTANTINO, N.; COURT, D. L. Recombineering: Genetic Engineering in Bacteria Using Homologous Recombination. **Current Protocols in Molecular Biology**. v. 106, n. 1.16, p. 1- 39, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/0471142727.mb0116s106>.

CAPÍTULO XI

BIOTECNOLOGIAS GENÉTICAS APLICADAS AO MELHORAMENTO DE PEIXES

Milena Vieira de Freitas

Raquel Belini Ariede

Lieschen Valeria Guerra Lira

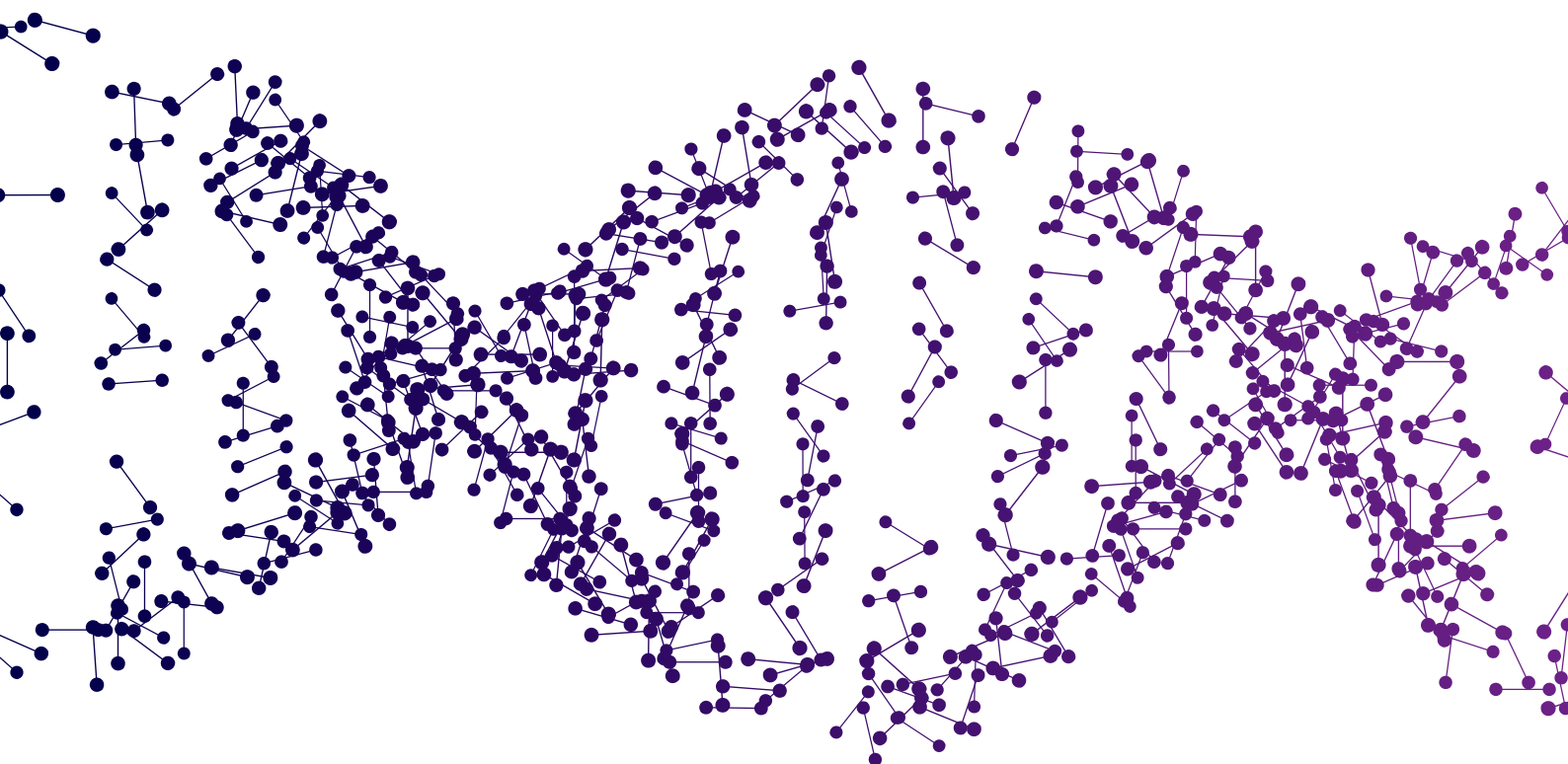
Carolina Heloisa Borges

Diogo Teruo Hashimoto



CONTEÚDO

1	Introdução	124
2	Estudos da variabilidade genética em programas de pré-melhoramento	124
3	Seleção genética assistida por marcadores moleculares (MAS)....	125
4	Biotecnologia genética aplicada à produção de peixes	127
4.1	Reversão sexual em peixes	127
4.2	Manipulação cromossômica (triploides e ginogenéticos).....	127
5	Conclusão	128
	Referências	129



1 INTRODUÇÃO

A demanda de produtos de origem animal, principalmente de pescado, tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2016), o consumo foi em torno de 20 kg *per capita* no ano de 2014, o que representa um dos maiores valores já registrados.

A maior parte do pescado consumido mundialmente ainda tem sua origem na pesca predatória (FAO, 2018). Entretanto, diante do cenário de sobre-exploração dos recursos naturais e de uma população mais consciente ecologicamente, a aquicultura mostra-se como a principal alternativa para suprir a demanda comercial e para garantir uma produção mais sustentável (BURBRIDGE et al., 2001). Em 2016, a produção global da aquicultura foi em torno de 110,2 milhões de toneladas, sendo 54,1 milhões de toneladas devidas apenas à produção de peixes (FAO, 2018).

O Brasil acompanha o desenvolvimento observado no âmbito internacional. O País produziu em torno de 507,12 mil toneladas de pescado no ano de 2016, representando um aumento de 4,4% em comparação ao ano anterior. A maior parte da produção é destinada a espécies exóticas, como a tilápia (239.090 ton). Entretanto, espécies nativas, como tambaqui (136.991 ton), pacu e seus híbridos (58.023 ton) têm ganhado destaque na produção (IBGE, 2016).

A crescente busca pelos produtos provenientes da aquicultura exigiu maior investimento do País neste setor, especialmente na utilização da genética para a melhoria do sistema de produção. Diversos são os estudos que apontam a utilização de marcadores moleculares e biotecnologias na piscicultura, principalmente em estudos de variabilidade genética e para a manutenção dos estoques cultivados (AGUIAR et al., 2013; JORGE et al., 2018; FREITAS et al., 2017).

Contudo, com as novas tecnologias de sequenciamento, a partir de 2005, a genética passou a atuar diretamente na aquicultura, favorecendo a elucidação de maior número de marcadores microssatélites e SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*); além disso, proporcionando estudos de associação genômica (GWAS) e identificação de loci quantitativos de interesse comercial (QTL) (KUMAR; KOCOUR, 2017).

Portanto, este capítulo abordará os principais avanços da genética na aquicultura, indicando as principais biotecnologias empregadas no melhoramento genético de peixes.

2 ESTUDOS DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM PROGRAMAS DE PRÉ-MELHORAMENTO

Inúmeras são as vantagens da produção de indivíduos geneticamente melhorados, e isto já tem sido observado em diversos setores da agropecuária. Na produção aquícola, o melhoramento genético tem obtido valores consideráveis para seleção de fenótipos superiores, especialmente na produção de salmo-

nídeos, carpa e tilápia (HULATA et al., 2001).

A iniciação de um programa de melhoramento deve levar em consideração a maior variabilidade genética possível em seu plantel de reprodutores (HILSDORF; ORFÃO, 2011). A utilização de reprodutores com baixa variabilidade genética culmina na formação de lotes endogâmicos, perdendo grande parte do potencial genético da espécie. Portanto, a caracterização dos lotes cultivados torna-se uma etapa fundamental para a iniciação de programas de melhoramento genético (HILSDORF; DERGAM, 1999; MELO et al., 2006).

Diversas metodologias têm sido utilizadas neste âmbito, as principais delas voltadas para a utilização de marcadores moleculares, tais como microsatélites (MOREIRA et al., 2007; PETERSEN et al., 2012) e marcadores mitocondriais (AGUIAR et al., 20013; FREITAS et al., 2017).

Estudos recentes em espécies nativas, como o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), evidenciaram elevada diversidade genética dos lotes cultivados, indicando que existe uma base genética significativa para iniciar um programa de melhoramento para estas espécies (LOPES et al., 2009; AGUIAR et al., 2013; FREITAS et al., 2017). Similarmente, elevada diversidade foi encontrada em lotes de tilápia do Nilo, por meio de marcadores microsatélites, demonstrando que o manejo correto dos reprodutores tende a diminuir as pressões por endogamia (MOREIRA et al., 2007).

Consequentemente, os estudos de variabilidade genética mostram-se fundamentais, tanto para a iniciação de um programa de melhoramento, indicando os reprodutores mais aptos para formação de famílias, como também para a manutenção e o acompanhamento de estoques em processo de seleção, evitando o gargalo genético.

3 SELEÇÃO GENÉTICA ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES (MAS)

A seleção genética de plantas e animais terrestres tem sido praticada desde que a agricultura começou (BRANDER, 2007). Em peixes, a seleção iniciou-se apenas recentemente, sendo que a maioria da produção aquícola (mais de 90%) ainda é baseada em unidades geneticamente não tratadas (GJEDREM et al., 2012). Se toda a produção da aquicultura fosse resultante de produtos melhorados geneticamente, estima-se que o volume de produção dobraria em seis gerações de seleção, levando em consideração apenas o valor de ganho genético. Atualmente, características de crescimento são os principais alvos de seleção para espécies da aquicultura. De 105 estimativas de ganho genético em programas de seleção para crescimento, 67 são para a seleção de aumento de peso corporal, o que evidencia a importância econômica do crescimento rápido (GJEDREM; RYE, 2018). Um dos exemplos é o projeto GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*) para a tilápia, que demonstrou a eficiência da reprodução seletiva para melhorar o desempenho da produção dessa espécie (PONZONI et al., 2011). Após cinco gerações, o crescimento resultou em ganhos, na ordem superior a 80% (WORLD FISH CENTER, 2004). As estimativas de ganho genéti-

co para peso corporal em espécies aquáticas variam de 2,3% a 42% por geração, correspondendo a uma resposta de seleção maior do que para ovinos e suínos (2,5% e 4,5%, respectivamente) (GJEDREM; RYE, 2018).

Outra característica de interesse na aquicultura é a resistência a patógenos. Estudos atuais em salmonídeos têm relatado ganhos genéticos altos para esta característica (19%). No entanto, de modo geral, a estimativa média dos ganhos genéticos para sobrevivência por geração é baixa (4,9%), o que pode ser explicado pelo fato de essa característica ser influenciada por inúmeros fatores (GJEDREM; RYE, 2018). Porém, o alto ganho genético apresentado em salmões é muito promissor, já que mostra a possibilidade do desenvolvimento de linhagens tolerantes ou resistentes a patógenos específicos.

Embora progresso tenha sido alcançado no melhoramento de peixes por abordagens genéticas tradicionais, várias inovações biotecnológicas têm sido desenvolvidas, permitindo um aumento da produtividade. Por meio de informações de marcadores moleculares ligados a *Quantitative Trait Loci* (ou QTL), é possível realizar a seleção assistida por marcadores (MAS). Esta metodologia busca localizar regiões genômicas relacionadas a variações em fenótipos economicamente importantes (SOUZA, 2001), indicando sua localização no genoma e a intensidade com que estes loci afetam a característica (GUTIERREZ et al., 2015). Com isso, a descoberta e a caracterização de marcadores moleculares são o primeiro passo para a implantação desta metodologia.

Na aquicultura, a aplicação de MAS pode ter grande impacto em programas de seleção, melhorando a precisão da seleção e, por conseguinte, o ganho genético (SONESSON, 2007). O uso de MAS pode auxiliar a melhorar geneticamente a espécie em cerca de 25 a 50%, em comparação com as técnicas tradicionais de reprodução seletiva artificial, pois centra-se principalmente na análise de genótipos-alvo combinados com fenótipos. Um exemplo bem-sucedido de MAS em peixes é a detecção de um QTL em salmão, que está associado em cerca de 80% da variação genética de peixes resistentes a infecção da necrose pancreática (HOUSTON et al., 2008; HOUSTON et al., 2012). Devido à eficácia, estes marcadores foram incorporados com sucesso no melhoramento genético do salmão do Atlântico, na Noruega e na Escócia e, em cinco anos, reduziu dezena de milhões de mortalidades para um valor próximo a zero (MOEN et al., 2009; HOUSTON et al., 2010; YÁÑEZ et al., 2014). Isto foi possível porque o QTL identificado está provavelmente localizado em um único locus, o que facilita a aplicação de MAS. Entretanto, em geral, estudos atuais têm revelado que a resistência a patógenos específicos é uma característica poligênica em peixes (HOUSTON et al., 2014; YÁÑEZ et al., 2014), o que impede que MAS seja utilizado com frequência nos programas de melhoramento.

Esta limitação pode ser suprida por meio de técnicas recentes, utilizando marcadores SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) de alta densidade e seleção genômica (TSAI et al., 2015), o que permite explorar a arquitetura genética e identificar regiões genômicas associadas com a variância genética de características poligênicas e de difícil mensuração, como já tem sido descrito para espécies modelos, como catfish, salmão e carpa (GONZALEZ-PENA et al., 2016).

Portanto, atualmente, a seleção genômica está sendo implementada e já é considerada uma abordagem promissora em programas de seleção para características de difícil mensuração sobre os candidatos de seleção, como observado em resistência à doença (TSAI et al., 2016; GONZALEZ-PENA et al., 2016).

4 BIOTECNOLOGIA GENÉTICA APLICADA À PRODUÇÃO DE PEIXES

4.1 Reversão sexual em peixes

Algumas espécies cultivadas apresentam dimorfismo sexual em relação às características de interesse zootécnico, como crescimento, por exemplo. Por isso, é desejável a produção de estoques monosssexo (100% fêmeas ou 100% machos, dependendo de qual apresente características mais vantajosas), e a reversão sexual pode ser utilizada para este propósito.

A tilápia-do-nylo é a segunda espécie mais produzida mundialmente (FAO, 2018), sendo que o controle do sexo foi uma das tecnologias aplicadas para aumentar a produção desta espécie. Atualmente, para obtenção de populações exclusivas de macho, o método mais utilizado é o tratamento com 17 α -metiltestosterona na dieta de larvas (MARTINEZ et al., 2014).

Os revertidos, denominados neomachos ou neofêmeas, também podem ser cruzados com espécimes normais, visando à obtenção de progênies com genótipo de interesse. Em espécies com sistema sexual XX/XY, como no caso dos salmonídeos (MARTINEZ et al., 2014), um neomacho (fêmea genética revertida, genótipo XX e fenótipo de macho) pode ser acasalado com fêmea natural (genótipo XX e fenótipo de fêmea) e assim gerar prole 100% fêmea (XX).

4.2 Manipulação cromossômica (triploides e ginogenéticos)

Os triploides são denominados indivíduos com três conjuntos cromossômicos (3n). O benefício de sua utilização é que, por apresentarem esta ploidia, exibem desenvolvimento gonadal restrito devido a falhas na segregação gamética, sendo teoricamente estéreis. A triploidia pode ser induzida por meio de choque de temperatura, pressão ou tratamento químico dos ovócitos, logo após a fertilização, impedindo assim a expulsão do segundo corpúsculo polar (PIFERRER et al., 2009).

Os triploides, por serem estéreis, direcionam as reservas energéticas que seriam utilizadas para o desenvolvimento/maturação de gônadas para outros processos fisiológicos, como crescimento. Dessa maneira, tem sido reportado que apresentam maior taxa de crescimento após a maturação sexual, quando comparados aos diploides, especialmente no caso de peixes de água doce e bivalves (PIFERRER et al., 2009). Nos Estados Unidos, desde a década de 70, triploides de carpa-capim são utilizados como controle biológico de plantas aquáticas (HANLON et al., 2000).

Os ginogenéticos são indivíduos que possuem somente material genético materno. Para isto, o espermatozoide é irradiado com UV para degeneração

de seu DNA e, posteriormente, é realizada a fertilização seguida de choque térmico, que tem a função de impedir a saída do segundo corpúsculo polar (da mesma maneira que nos triploides), duplicando o material genético da fêmea. Esta técnica também consiste em uma estratégia para o controle do sexo em aquicultura.

5 CONCLUSÃO

Como visto, a aquicultura é um setor de expansão mundial, tornando-se um dos mais promissores para o suprimento alimentar global, de forma eficiente e sustentável. Contudo, para o aprimoramento da produção e para a garantia de produtos de alto valor, o uso da genética neste setor torna-se uma etapa indispensável.

Embora esforços e avanços tenham sido alcançados por meio da seleção genética clássica, a utilização das novas ferramentas biotecnológicas só tende a aumentar a eficiência da produção, alavancando este setor em larga escala.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, J.; SCHNEIDER, H.; GOMES, F.; CARNEIRO, J.; SANTOS, S.; RODRIGUES, L. R.; SAMPAIO, I. Genetic variation in native and farmed populations of Tambaqui (*Colossoma macropomum*) in the Brazilian Amazon : regional discrepancies in farming systems. **Anais da academia brasileira de ciências**, v.85, p. 1.439-1.447, 2013.

BRANDER, K.M. Global fish production and climate change. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 50, p. 19.709-19.714, 2007.

BURBRIDGE, P.; HENDRICK, V.; ROTH, E.; ROSENTHAL, H. Social and economic policy issues relevant to marine aquaculture. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 17, n. 4, p. 194-206, 2001.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016 : Contributing to food security and nutrition for all. Rome, 2016. 200p.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018: Meeting the sustainable development goals. Rome, 2018. 211p. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

FREITAS, M.V. **Análise do DNA mitocondrial como subsídio para o pré-melhoramento genético do pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2017. Dissertação (Mestrado em ciências biológicas A/C zoologia) – Instituto de biociências, UNESP, Botucatu, 2017.

GJEDREM, T.; BARANSKI, M. **Selective breeding in aquaculture: an introduction**. Springer Science & Business Media, 2010.

GJEDREM, T., RYE, M. Selection response in fish and shellfish: a review. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 1, p. 168-179, 2018.

GJEDREM, T.; ROBINSON, N.; RYE, M. The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: a review. **Aquaculture**, v. 350, p. 117-129, 2012.

GONZALEZ-PENA, D. D.; NIXON, S. E.; O'CONNOR, J. C.; SOUTHEY, B. R.; LAWSON, M. A.; MCCUSKER, R. H.; KELLEY, K. W. Microglia transcriptome changes in a model of depressive behavior after immune challenge. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0150.858, 2016.

GUTIERREZ, A.P.; YÁÑEZ, J. M.; FUKUI, S.; SWIFT, B.; DAVIDSON, W. S. Genome-wide association study (GWAS) for growth rate and age at sexual maturation in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0119.730, 2015.

HANLON, S. G.; HOYER, M. V.; CICHRA, C. E.; CANFIELD, D. E. Evaluation of macrophyte control in 38 Florida lakes using triploid grass carp. **Journal of Aquatic Plant Management**, v.38, p. 48-54, 2000.

HILSDORF, A.W.S.; DERGAM, J. A. Depressão por endogamia: somente uma terminologia genética ou um fato na aquicultura. **Panorama da Aquicultura**, v. 9, p. 34-36, 1999.

HILSDORF, A.W.S.; ORFÃO L.H. Aspectos gerais do melhoramento genético em peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia** , v.40, p.317-324, 2011.

HOUSTON, R. D.; GHEYAS, A.; HAMILTON, A.; GUY, D. R.; TINCH, A. E.; TAGGART, J. B.; BISHOP, S. C. Detection and confirmation of a major QTL affecting resistance to infectious pancreatic necrosis (IPN) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). In: **Animal Genomics for Animal Health**. Karger Publishers, 2008. p. 199-204.

HOUSTON, R.D; HALEY, C. S.; HAMILTON, A.; GUY, D. R.; MOTA-VELASCO, J. C.; GHEYAS, A. A.; MCANDREW, B. J. The susceptibility of Atlantic salmon fry to freshwater infectious pancreatic necrosis is largely explained by a major QTL. **Heredity**, v. 105, n. 3, p. 318, 2010.

HOUSTON, R.D.; DAVEY, J. W.; BISHOP, S. C.; LOWE, N. R.; MOTA-VELASCO, J. C.; HAMILTON, A.; GHARBI, K. Characterization of QTL-linked and genome-wide restriction site-associated DNA (RAD) markers in farmed Atlantic salmon. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 244, 2012.

HOUSTON, R.D.; TAGGART, J. B.; CÉZARD, T.; BEKAERT, M.; LOWE, N. R.; DOWNING, A.; PENMAN, D. J. Development and validation of a high density SNP genotyping array for Atlantic salmon (*Salmo salar*). **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 90, 2014.

HULATA, G. Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. **Genetica**, v.111, p.155-173, 2001.

IBGE (2016) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro: **Produção da Pecuária Municipal**, 2015. v. 43

JORGE, P.H.; MASTROCHIRICO-FILHO, V. A.; HATA, M. E.; MENDES, N. J.; ARIEDE, R. B.; FREITAS, M. V. D.; HASHIMOTO, D. T. Genetic Characterization of the Fish *Piaractus brachipomus* by Microsatellites Derived from Transcriptome Sequencing. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 46, 2018.

KUMAR, G.; KOCOUR, M. Applications of next-generation sequencing in fisheries research: A review. **Fisheries Research**, v. 186, n. 1, p. 11-22, 2017.

LOPES, T.S. et al. Diversidade genética de estoques de reprodutores de *Colosoma macropomum*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.3, p.728-735, 2009.

MARTÍNEZ, P.; STREIT JÚNIOR, D. P.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; LOPERA-BARRERO, N. M.; VARGAS, L. D. M.; PINTO FILHO, C. Genetic architecture of sex determination in fish: applications to sex ratio control in aquaculture. **Frontiers in Genetics**, v.340, p.1-13, 2014.

MELO, D.C.; OLIVEIRA, D. A. A.; RIBEIRO, L. P.; TEIXEIRA, C. S.; SOUSA, A. B.; COELHO, E. G. A.; TEIXEIRA, E. A. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.87-93, 2006.

MOEN, T.; BARANSKI, M.; SONESSON, A. K.; KJØGLUM, S. Confirmation and fine-mapping of a major QTL for resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*): population-level associations between markers and trait. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, p. 368, 2009.

MOREIRA, A. A.; HILSDORF, A. W. S.; DA SILVA, J. V., & DE SOUZA, V. R. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.521-526, 2007.

PETERSEN, R. L. et al. Análise da diversidade genética de tilápias cultivadas no Estado de Santa Catarina (Brasil) utilizando marcadores microssatélites. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 38, n. 4, p. 313-321, 2012.

PIFERRER, F.; et al. The use of induced polyploidy in the aquaculture of bivalves and fish for performance improvement and genetic containment. **Aquaculture** 293, p. 125-156, 2009.

PONZONI, R. W. et al. Genetic improvement of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with special reference to the work conducted by the WorldFish Center with the GIFT strain. **Reviews in Aquaculture**, v. 3, n. 1, p. 27-41, 2011.

SONESSON, A.K. Within-family marker-assisted selection for aquaculture species. **Genetics Selection Evolution**, v. 39, n. 3, p. 301, 2007.

SOUZA, A.P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. **Recursos genéticos e melhoramento-plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, p. 939-966, 2001.

TSAI, H.; HAMILTON, A.; TINCH, A. E.; GUY, D. R.; GHARBI, K.; STEAR, M. J.; HOUSTON, R. D. Genome wide association and genomic prediction for growth traits in juvenile farmed Atlantic salmon using a high density SNP array. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 969, 2015.

TSAI, H.; HAMILTON, A.; GUY, D.; TINCH, A.; BISHOP, S.; HOUSTON, R. Verification of SNPs associated with growth traits in two populations of farmed Atlantic salmon. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 1, p.5, 2016.

YÁÑEZ, J.M.; HOUSTON, R. D.; NEWMAN, S. Genetics and genomics of disease resistance in salmonid species. **Frontiers in genetics**, v. 5, p. 415, 2014.