
MELHORAMENTO DE PLANTAS PARA RESISTÊNCIA A VIROSES: DO TRADICIONAL AO MODERNO

Josias Correa de Faria¹

A observação de que as variedades de plantas de importância econômica diferem quanto ao grau de suscetibilidade a doenças provavelmente nem era novidade quando o fato foi registrado por Theophrastus (371-286 B.C.). Nos séculos que sucederam pouco se sabe sobre o uso que foi feito desta informação, mas acredita-se que muitas variedades foram descartadas devido à suscetibilidade a uma ou outra doença (WALKER, 1957). Embora a teoria sugira que os vírus podem ser tão antigos como a própria vida, a ciência dos vírus e viroses provavelmente tenha pouco mais de 100 anos. A Sociedade Brasileira de Virologia celebrou os 100 anos de Virologia em 1992, no VII Encontro Nacional de Virologia, em São Lourenço, MG. A American Phytopathological Society, brindou *Tobacco mosaic virus*, datado de 1886, como sendo, não o primeiro vírus descrito, mas o primeiro a ter nome definitivo, em um de seus clássicos (MAYER, 1942).

IMPORTÂNCIA DAS DOENÇAS VIRAIS

As grandes perdas de produção e qualidade causadas pelos vírus, além do fato de não haver medidas efetivas de controle direto, tornam as doenças

¹ Pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, josias.faria@embrapa.br

viróticas de importância especial. Não há dados precisos das perdas por viroses, mas estima-se que podem atingir a cifra de dois bilhões de dólares apenas nos Estados Unidos (SHUKLA et al., 1991) especialmente em culturas como tomate, batata e trigo. Estima-se que anualmente a produção de feijão perde cerca de 20% devido ao vírus do mosaico dourado, no Brasil. Na África tropical, *Maize streak virus* e *African cassava mosaic virus* causam perdas conservativamente estimadas em cem milhões de toneladas anualmente. Apenas geminiviruses (entre estas Cassava Mosaic Disease– ou CMD) causam cerca de 35 milhões de toneladas de perda do rendimento da raiz de mandioca na África, com um valor calculado de quase \$1 bilhão por ano (<http://www.danforthcenter.org/science/research_areas/disease_resistance.asp>- 08/07/2013). Em termos mundiais acredita-se que as fitoviruses causam perdas de 60 bilhões de dólares anuais. Há pelos menos 49 famílias de fitovírus distribuídos em 73 gêneros.

Não há nenhum método curativo para plantas infectadas por vírus, restando apenas as medidas preventivas, que, quando eficientemente e conjuntamente aplicadas, podem impedir grandes epidemias de viroses. Pode-se dizer que há três tipos de medidas úteis para reduzir as perdas por viroses: 1. Remoção ou eliminação de fontes de inoculo. Por exemplo, remoção de plantas voluntárias hospedeiras ou da própria lavoura, com o objetivo de impedir ou reduzir as chances de que a partir de plantas doentes um vetor possa disseminar ainda mais o vírus; 2. Métodos que possam prevenir a disseminação da virose tal como a utilização de material vegetal sadio. Exemplo: produção de bulbilhos de alho livres de vírus, batata semente produzida *in vitro* e multiplicada inicialmente em locais com ausência de vetores das viroses. Envolve a interferência com a atividade de vetores de viroses, podendo até mesmo ser pelo controle químico de insetos vetores, vazão sanitário, escolha de áreas e épocas de plantio; 3. Variedades resistentes aos vírus. É o método mais econômico para os produtores. Os métodos de cura existentes são limitados principalmente à limpeza clonal, por exemplo. Isto torna o melhoramento genético

para resistência de grande interesse. Sempre que há uma variedade resistente ela é preferida porque não adiciona nenhum custo de produção, além das vantagens em relação ao uso de pesticidas, que não podem ser aplicados se as condições meteorológicas não forem adequadas.

O melhoramento genético é a ciência que visa aumentar a frequência de alelos favoráveis em uma população de plantas. Melhorista é aquele que obtém novas cultivares. Porém, o melhoramento é um trabalho de equipe, onde encontram-se biometristas, geneticistas, biólogos moleculares, fitopatologistas, fitotecnistas, cientistas do solo, dentre outros, sempre com o objetivo final de obter novas cultivares. Todo e qualquer programa de melhoramento genético de plantas depende dos recursos genéticos existentes onde se busca a variabilidade para as perguntas formuladas, ou seja, os tratos buscados, tal como resistência a viroses. Quanto maior for a variabilidade disponível, maiores serão as chances de sucesso (PATERNIANI et al., 2000).

Os métodos de melhoramento clássicos continuam a ter aplicação nos tempos de biotecnologia, mas não se pode negar que cada etapa do programa é hoje adicionada de alguma novidade biotecnológica seja para acelerar o melhoramento, seja para ampliar o ganho genético com a seleção aplicada. Não é surpresa de que o sucesso da utilização da resistência depende de entender os mecanismos genéticos e bioquímicos envolvidos, assim como a natureza da interação planta-vírus. Isto não quer dizer que não se consegue ou nunca se conseguiu obter sucesso antes de entender os mecanismos acima.

TIPOS DE RESISTÊNCIA

Tradicionalmente a resistência a vírus tem sido classificada em dois tipos: resistência do hospedeiro e resistência de não hospedeira (FRASER, 1990). As plantas não hospedeiras são aquelas nas quais todos os genótipos da espécie se mostram resistentes quando inoculados por um certo vírus, ou seja não existe polimorfismo para a reação à virose em questão. A maioria das

espécies de plantas são resistentes a maioria das viroses. Este tipo de resistência (não hospedeira) é muito pouco estudado. Suscetibilidade é a exceção. Já a resistência do hospedeiro ocorre quando há o polimorfismo para a reação de suscetibilidade à inoculação com certos vírus. É mais fácil de ser estudada, porque é possível de ser tratada geneticamente. Este tipo de resistência é também chamado de resistência específica ou resistência genotípica. Neste tipo de resistência alguns genótipos apresentam resistência a certo vírus enquanto outros do mesmo *pool* gênico mostram suscetibilidade. Nos indivíduos resistentes pode haver ou não a multiplicação do vírus, mas quando ocorre, a mesma é restrita em relação aos hospedeiros suscetíveis. Esta restrição pode ser por maior lentidão na colonização do hospedeiro, ou mesmo pela localização completa que pode ser dramática, como no caso do mosaico comum necrótico do feijoeiro, causado pelo *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) em que a morte do hospedeiro ocorre.

Em todos os casos, para iniciar um programa de melhoramento para resistência com chances de sucesso no decorrer do tempo, é necessário embasá-lo em estudos da genética da resistência ou tolerância encontrada, caracterização do agente viral, entre outras etapas.

Embora haja controvérsias sobre terminologia, é útil definir patógeno, virulência, resistência, tolerância, resistência monogênica, resistência poligênica, resistência completa, resistência quantitativa.

Patógeno. Um patógeno que obtém sucesso ao penetrar os tecidos de seu hospedeiro e dele derivar parte ou todo o substrato para o seu desenvolvimento e/ou replicação é denominado de parasita e é dito que infecta o seu hospedeiro. Esta definição implica que uma entidade (e.g. vírus) não induzindo doença é um não patógeno e a planta é uma não hospedeira (ANDRIVON, 1993). Para não confundir, todos os membros da espécie devem ser não hospedeiros para que o agente seja não patógeno.

Virulência. O patógeno é dito ser virulento a um hospedeiro quando o infecta e usualmente se multiplica nele: o hospedeiro é dito ser suscetível. O oposto de virulência é avirulência. Diz-se que o vírus é virulento quando tem capacidade de “vencer” um gene específico de resistência e causar doença (FRASER, 1987).

Resistência. É a característica da planta que suprime o desenvolvimento do patógeno. Entretanto, esta supressão pode ser em graus de magnitude, podendo levar à completa imunidade da planta ou tornar a replicação do vírus mais lenta de modo que a doença possa ser manejada.

Tolerância. Eliminação ou redução, geneticamente determinada, do potencial de doença, sem a correspondente redução em colonização pelo patógeno; ou, geralmente definida pela capacidade do hospedeiro de, a despeito do desenvolvimento de sintomas semelhantes aos de um hospedeiro suscetível, manter a sua capacidade de produção.

Resistência monogênica. É o tipo de resistência conferida por apenas um gene no genoma da planta, e durante o melhoramento, do cruzamento entre a planta resistente e a suscetível, na geração F_2 ocorre a segregação entre dois fenótipos resistente e suscetível na proporção de 3R:1S.

Resistência poligênica. É controlada por diversos genes, cada um controla parte da resistência e a ação do conjunto dos genes resulta no fenótipo de resistência. A progênie do cruzamento deste tipo de planta resistente com outra suscetível resulta em modelo mais complexo. De 2 a 4 genes, nota-se uma distribuição bi-modal (oligogênico), e a partir de 5 genes (multigênica) a distribuição é contínua entre os dois fenótipos). A herdabilidade de resistência é conhecida para muitas viroses, em muitas espécies. O número de genes envolvidos é determinado por métodos de genética convencional, observando os padrões de segregação obtidos e ajustando com modelos vários.

Sempre é bom também falar em **resistência completa**, também chamada de qualitativa, quando se pode notar que o vírus não dissemina dentro da planta, ou **resistência quantitativa**, quando nota-se que o vírus é parcialmente restrito e pode haver um decréscimo da incidência de doença no campo. Geralmente resistência poligênica confere resistência parcial, e na análise genética são identificados os QTLs (quantitative trait loci). Há exceções. Lapidot e Friedmann (2002) mostram a resistência parcial de tomateiro a TYLCV conferida por apenas um gene - Ty-1. Igualmente complexa é a resistência de tomateiro a begomovirus estudados por García-Cano et al. (2008). Foi encontrado um gene recessivo com interações de epistasia controlando a reação na linhagem 468-1-1—12.

Métodos gerais de melhoramento

Os métodos de melhoramento para resistência a viroses não diferem de maneira fundamental daqueles utilizados para outras características, uma vez que os genes que conferem resistência tenham sido identificados. Quando há gene ou genes identificados, quaisquer dos métodos de melhoramento apropriados para a cultura em questão poderão ser utilizados (ALLARD, 1960): Linhas puras (plantas autógamias), Seleção massal, “Pedigree”, “Bulk”, Retrocruzamento, Seleção recorrente, Variedades sintéticas, clones propagados vegetativamente, dependendo de se trabalha com plantas de autopolinização (autógamas) ou de polinização cruzada (alógamas).

Fontes de Resistência

A resistência mais útil ao melhorista é aquela encontrada em variedades da mesma espécie. Nem sempre isto é possível, e a busca deve ser feita nos bancos de germoplasma ou mesmo em coletas ou na introdução de germoplasma, e finalmente nos cruzamentos interespecíficos, caso haja o gene de interesse, nas espécies próximas. Neste caso, pode ser necessária a utilização de cultura de células ou de tecidos como ferramenta para recuperar embriões com

incompatibilidade ao próprio endosperma que pode originar em cruzamentos inter específicos, ou no caso de fusão de protoplastos (PALLOIX; ORDON, 2011). Um exemplo pode ser encontrado para o gene de resistência Ryd4 efetivo contra o *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) que foi introgridido a partir de *Hordeum bulbosum* em aveia cultivada usando a técnica de cultivo de embrião (embryo rescue) (SCHOLZ et al., 2009). Outro exemplo, similar a este, resistência ao *Potato virus Y* (PVY) foi introduzida via fusão de protoplastos a partir de *Solanum tarrnii* (THIEME et al., 2008). Em tomateiro, a resistência a TYLCV, um geminivírus, foi incorporada a partir de cruzamentos interspecíficos entre *Solanum pimpinellifolium* e *Solanum lycopersicon*.

Mutações induzidas podem ter utilidade, mas os exemplos são raros: o gene de resistência rym3 ao *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV) é resultante de mutação induzida por raios gama da cultivar Chikurin Ibaraki 1 (UKAI, 1984); No Brasil, Tulmann Neto et al. (1976) mutagenizaram a variedade de feijão carioca com sulfonato de etil-metano (MES) objetivando obter resistência ao vírus do mosaico dourado (BGMV). Apesar do sucesso com a mutação *per se*, obtendo-se a linhagem TMD-1, os autores nunca obtiveram variedades resistentes aceitáveis.

Em alguns dos casos, o processo é mais tedioso tendo-se que proceder a etapas conhecidas como pré-melhoramento. Quando um dos pais é de um tipo completamente não adaptado, deve se escolher o método de retrocruzamento.

A seguir alguns Centros de Recursos Genéticos (internacionais e nacionais) nos quais podem ser obtidos germoplasmas para avaliação como fontes de resistência a viroses e outras doenças:

International Rice Research Institute (IRRI), Manila, The Philippines;

International Center for Tropical Agriculture (CIAT), Cali, Colombia;

International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), Hyderabad, India;

International Center for Maize and Wheat Improvement (CIMMYT), El Batam, México;

International Center for Agricultural Research in Dry Areas (ICARDA), Iran, Lebanon, e Siria;

International Potato Center (CIP), Lima, Peru;

International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadan, Nigéria;

Germplasm Resources Laboratory, Agriculture Research System (ARS-USDA), Beltsville, MD, USA;

National Seed Storage Laboratory, Fort Collins, CO, USA;

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

ESPECIFICIDADES DOS MÉTODOS EM RELAÇÃO A VIROSES

Fenotipagem da resistência

Independente do método de melhoramento é essencial correlacionar genótipo e fenótipo. Este é um fator crítico porque na ausência do agente causal da doença não se pode distinguir entre os genótipos com facilidade. Hoje, para grande número de doenças pode se usar a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM), que será discutida mais adiante. Quando a seleção é feita a campo, o nível de infecção, ou a sua distribuição espacial irregular, pode afetar a acurácia da distinção entre tipos resistentes e suscetíveis.

Estabilidade da resistência

Algumas vezes a herança da resistência é simples, e portanto facilmente introduzida em novas cultivares, porém, em poucos anos a nova variedade é perdida devido a se tornar suscetível. Sabe-se hoje, que o potencial de desenvolver novas formas, com novos genes de patogenicidade (presença de raças fisiológicas, em fungos) é fato estabelecido. Para os vírus isto não é diferente, embora aqui as modificações ocorram por mudanças em uma ou poucas bases do material genético. Em geral, a resistência a viroses é tida como estável que resistência a doenças causadas por outros fitopatógenos. Em alguns casos, a

resistência vem durando mais de meio século, como no caso do gene *I*, da cultivar de feijoeiro Corbett Refugee, o qual continua sendo importante até os nossos dias. A estabilidade deste gene pode ser adicionalmente protegida adicionando genes recessivos de resistência ao vírus do mosaico comum do feijoeiro (BCMV). Em todos os casos, para iniciar um programa de melhoramento para resistência com chances de sucesso no decorrer do tempo, é necessário embasar em estudos da genética da resistência ou tolerância encontrada.

Métodos biotecnológicos que auxiliam o melhoramento

A seguir é nomeada uma lista, parcial, de técnicas utilizadas na identificação e seleção de plantas utilizando marcadores de DNA. Algumas estão praticamente em desuso a favor de outros que vão substituindo-as. Não vamos descrever ou exemplificar todos. Random Amplified Polymorphic DNA –RAPD; Microsatelites – Simple Sequence Repeats – SSR; Amplified Fragment Length Polymorphism –AFLP; Marker Assisted Selection – MAS; Single Nucleotide Polymorphism – SNP; Sequence Characterized amplified regions – SCAR; Genotyping by sequencing – GBS.

Uma aplicação da utilização de seleção assistida por marcadores (MAS) no melhoramento de feijoeiro para resistência ao *Bean common mosaic necrosis virus* – BCMNV, piramidando os genes *I* e *bc3*: A resistência ao BCMNV é controlada pelo gene *I*, que confere resistência a todos os strains do vírus (BCMNV e BCMV). Entretanto, no caso de strains denominados de necróticos, as plantas que seriam as “resistentes” (na prática são hipersensíveis), morrem. Um dos genes recessivos (ex. *bc3*) que confere resistência ao BCMV protege à plantas contendo o gene *I* contra esta necrose, sendo portanto de grande utilidade. Entretanto, fazer seleção fenotípica para acumular os dois genes torna-se difícil, ou não prático devido ao efeito de mascaramento (epistasia) da reação pelo *bc-3* sobre o gene *I*. Assim, pode se fazer seleção para a presença do gene *bc-3*, com inoculação – portanto fenotipicamente - e seleção indireta através de um SCAR que é ligado ao gene *I* (Tabela 1, Figura 1). Esta

possibilidade foi usada por (HALEY et al., 1994; KELLY; MIKLAS, 1998; KELLY et al., 2003).

Tabela 1 – Qui-quadrado e análise de ligação de cinco populações de F_2 de feijão comum segregando para resistência ao mosaico comum conferida pelo alelo no locus *I*.

População	Relação esperada	Frequencia observada	Locus <i>I</i>		OW13 ₆₉₀		cM (r±SE) ^b
			χ^2	P	χ^2	P	
Seafarer/UI-114	9;3:3:1	163:2:1:57	0,07	0,79	0,18	0,67	1,3 ± 0,8
N84004/UI-114	9;3:3:1	172:3:3:49	0,42	0,51	0,42	0,51	2,8 ± 1,1
Seafarer/Michelite	9;3:3:1	175:4:1:42	3,46	0,06	1,95	0,16	2,5 ± 1,1
N84004/Michelite	9;3:3:1	140:5:0:51	0,06	0,80	1,15	0,28	2,5 ± 1,1
G91201/Alpine	3:6:3:1:2:1	32:43:3:0:2;25	2,45	0,29	0,00	1,00	5,0 ± 2,2

Relações esperadas: 9:3:3: 1,9 *I*/- +OW 13₆₉₀: 3 *I*/- -OW13₆₉₀: 3 *i*/*i* +OW13₆₉₀: 1 *i*/*i* -OW13₆₉₀: 3:6:3:1 :2: 1,3 *I*/*I* +OW 13₆₉₀: 6 *I*/*I* +OW 13₆₉₀: 3 *i*/*i* +OW13₆₉₀: 1 *I*/*I* -OW13₆₉₀: 2 *I*/- -OW13₆₉₀: 1 *i*/*i* -OW 13₆₉₀.

Fonte: Adaptado de Haley et al. (1994).

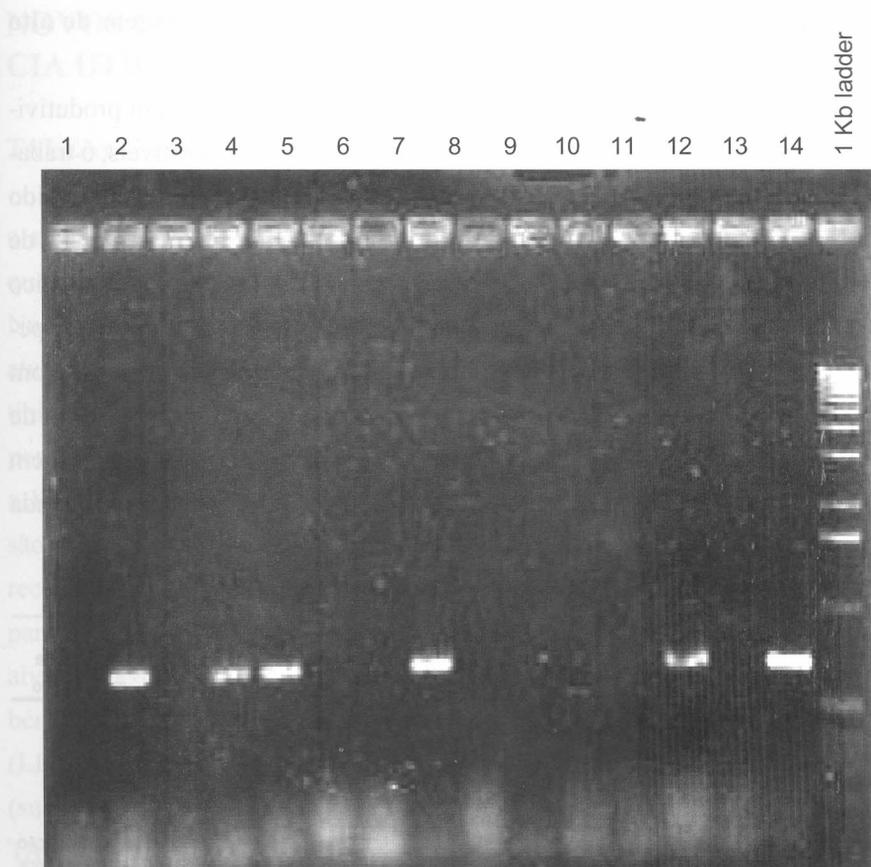


Figura 1 – Exemplo de gel para caracterizar o gene I (II ou Ii), em cruzamento de Jalo Precoce (i/i Bc3/Bc3) com Raven (I/I bc3/bc3), na geração F₂. Poços: 1 a 10 plantas segregantes, geração F₂; 11- Água; 12- Diamante Negro; 13- Jalo Precoce; 14- Raven. A banda tem 690pb. Primers: W13.7 XP (5' CACAGCGACATTAATTTTCCTTTC 3') e W13.4 RP (5' CACAGCGACAGGAGGAGCTTATTA 3').

Ganho genético esperado utilizando tecnologias de fenotipagem de alto rendimento.

Embora seja difícil quantificar os ganhos em rapidez ou em produtividade, devido à utilização das tecnologias de fenotipagem disponíveis, o trabalho de Sebastian et al. (2010) é ilustrativo. O ganho de produtividade obtido com soja chegou a 5,8%, utilizando o cruzamento entre cultivares elites de soja, dos quais não se podia esperar grandes ganhos. No caso de ser um único gene recessivo de resistência a virose o procedimento de seleção usando apenas métodos tradicionais de melhoramento se torna tedioso, e demorado. Com a ajuda de marcador ligado ao gene recessivo pode se acelerar o processo de retrocruzamento com a seleção assistida (Figura 2). Neste caso o ganho em tempo pode chegar a uma redução de até 50% daquele necessário sem a ajuda da seleção assistida.

Método de retrocruzamento tradicional		ANO		Retrocruzamento com ajuda de marcadores			% do pai recorrente recuperado		
P	bc3/bc3 (r)	X	Bc3/Bc3(s) pai recorrente	0	P	bc3/bc315 (r)	X	Bc3/Bc3 (s) pai recorrente	50,00
F ₁	bc3/Bc3	AUTOFECUNDAÇÃO		1	F1RC1	bc3/Bc3	X	Bc3/Bc3 (s)	75,00
F ₂	Bc3/Bc3 (s):2 Bc3bc3(s); 1 bc3/bc3(r)	teste de resistencia		2	F1RC2	bc3/Bc3	X	Bc3/Bc3 (s)	87,50
F2RC1	bc3/bc3(r)/Bc3/Bc3	AUTOFECUNDAÇÃO		3	F1RC3	bc3/Bc3	X	Bc3/Bc3 (s)	93,75
	Bc3/bc3(s)	teste de resistencia		4	F1RC4	bc3/Bc3	X	Bc3/Bc3 (s)	96,88
	1 Bc3/Bc3 (s):2 Bc3bc3(s); 1 bc3/bc3(r)	teste de resistencia		5	F1RC4	bc3/Bc3	AUTOFECUNDAÇÃO		
				6	F2RC4	1 Bc3/Bc3 (s):2 Bc3bc3(s); 1 bc3/bc3(r)	teste de resistencia		
						bc3/bc3			

Figura 2 – Comparação de esquemas de retrocruzamento tradicional e assistido por marcadores na transferência de gene de resistência recessivo bc3 de um genótipo resistente, porém com características agrônomicas indesejáveis a outro com características agrônomicas desejáveis, porém suscetível ao mosaico comum do feijoeiro. À esquerda, o fenótipo desejado precisa ser identificado por teste de resistência, e por se tratar de gene recessivo, tem que se ter a geração F₂. À direita, com a ajuda de marcadores, pode se caracterizar as plantas com o alelo de resistência e continuar os retrocruzamento, adiando o teste de resistência até a geração F₂ do RC₄.

NOVOS MÉTODOS DE INTRODUÇÃO DE RESISTÊNCIA UTILIZANDO A BIOLOGIA MOLECULAR

TALENs - Transcription activator–like effector nucleases.

Por esta metodologia é necessário conhecer o gene de suscetibilidade e sua sequência correta para promover uma modificação pontual ou como querem alguns uma correção para criar ou corrigir uma sequência de DNA. Nucleases ativadoras (TAL) contribuem para a virulência de um patógeno por atuar transcricionalmente ativando (potencializando) genes específicos de suscetibilidade. O autor não encontrou exemplo em resistência a vírus desenvolvidos por esta importante metodologia, e por isto mostra um exemplo de resistência a *Xanthomonas oryzae pv oryzae* (Xoo), como ilustração. As nucleases TALENs são proteínas fusionadas derivadas de “ativadoras” nativas ou customizadas que reconhecem certos DNAs repetitivos e o domínio de clivagem da nuclease FokI, para criar modificação sitio-específica em células de plantas (ou outros seres). O alvo foi modificar o gene de suscetibilidade à bacteriose citada -*OsIIN3* - (também chamado *OsSWEET14*) para interromper a função baseado em TALEN (LI et al., 2012). Este gene codifica um membro da família da sacarose SWEET (sucrose efflux transporter) que é utilizado por Xoo, usando a sua ativadora TAL endógena AvrXa7 ou PthXo3 para ativar o gene e assim disponibilizar os açúcares da célula para satisfazer as necessidades nutricionais do patógeno e aumentar a sua persistência. O promotor do *OsIIN3* contém o elemento ativador de ligação (Effector-binding-element- EBE) para o AvrXa7, sobrepondo com outro EBE para PthXo3 e com a caixa TATA. Finalizando, ao induzir mutações nos EBE, ocorre interferência com o local de ligação dos ativadores e por conseguinte com a capacidade de causar doença por Xoo (Figura 3).

EXZACT- Zinc finger nuclease-mediated transgene deletion/EXZACT- Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases.

A tecnologia conhecida como Zinc finger nuclease - ZFN technology utiliza enzimas que contem motivos zinc finger (motivos) e cortam o DNA em sítios específicos para a edição (adição, deleção, modificação) de sequências (Tecnologia patenteada pela Dow AgroSciences).

Transformação genética

Por este método um ou mais genes de determinada espécie podem ser introduzidos em outra espécie não relacionada. Não há limitação sobre a origem do gene, embora possa haver necessidade de ajustes do código genético preferencial. Uma vez introduzido, na maioria dos casos o gene é herdado de modo simples mendeliano.

Integração/Excisão mediada por Recombinases

Dentre os problemas associados com a transformação genética, seja via *Agrobacterium tumefaciens*, ou métodos diretos, a inserção do transgene ao acaso, múltiplas cópias do transgene e o problema imprevisível de expressão no genoma recipiente são grandes desafios. Embora não tenha alcançado grande uso, o método usando recombinase para inserir gene num locus previamente caracterizado é altamente desejável. A recombinação homóloga faz exatamente isto. O processo foi denominado em inglês de “Recombinase Mediated Cassete Exchange” - RCME. Há vários sistemas de recombinação sítio específicas, sendo os mais comuns o sistema *cre-lox* de bacteriófago e FLP-FRT de levedura (LI et al., 2009). A Figura 4 ilustra dois plasmídeos desenhados. Para construir uma planta de feijoeiro com o gene *dreB2A* usando o gene *ahas* de resistência ao herbicida imazapyr e depois remover o gene de resistência ao imazapyr deixando apenas o cassete do gene *dreB2A*. Para tanto é necessário ter um feijoeiro expressando a recombinase FLP para depois ser

cruzado com o feijão contendo o sítio FRT que permite a retirada do cassete do gene *ahas*, por recombinação homóloga, exemplificado aqui. Este projeto encontra-se em andamento.

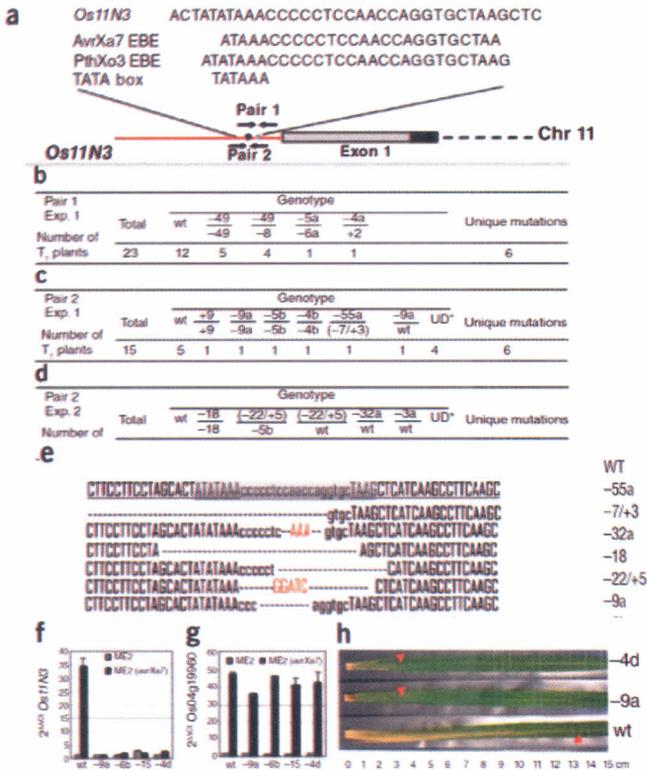


Figura 3 – Edição de gene usando a tecnologia TALEN. (a) elementos sobrepostos (overlapping) alvo de dois pares (1 e 2) de TALENs no promotor. (b–d) genótipos da progênie (T1) das plantas primárias (T0) derivadas das células embrionárias primárias expressando TALEN de três experimentos de transformação independentes (Exp.). Cada um dos dois alelos de uma planta individual são designados como sendo do tipo selvagem (wt) ou como tendo a inserção de UM nucleotídeo (+) ou a deleção (-) e estão separados no alto e embaixo

por linha divisora. A designação “-55/(-7/+3)” indica que um alelo contém uma deleção de 55 bp e que o outro alelo tem os dois – deleção de 7 bp e inserção de 3 bp. (e) Sequências de mutações em *Os11N3* induzidas pelos par 2 de TALENs com deleções (traços) e inserções (letras vermelhas). Sequência de ligações do TALE estão sublinhas no wt e aquelas sobrepondo EBEs sombreadas em cinza. (f, g) Expressão de *Os11N3* e Os04g19960 induzidas pelo AvrXa7 em plantas de diferentes genótipos. Transcrição reversa - PCR foi realizado com RNA derivado dos tratamentos de cepa não patogênica Xoo ME2 e patogênica ME2 (*avrXa7*). 2DDCt é a medida de abundancia do transcrito produzido por gene constitutivamente expresso (*Os11N3* em f ou Os04g19960 em g) relativo a (*OsTFIIAg5*), conforme determinado pelo (*Ct*). (h) fenótipo resistente mostrado pelas duas plantas mutantes T2 comparadas com o fenótipo suscetível à doença de uma planta convencional de arroz do tipo wt.

Fonte: Li et al. (2012).

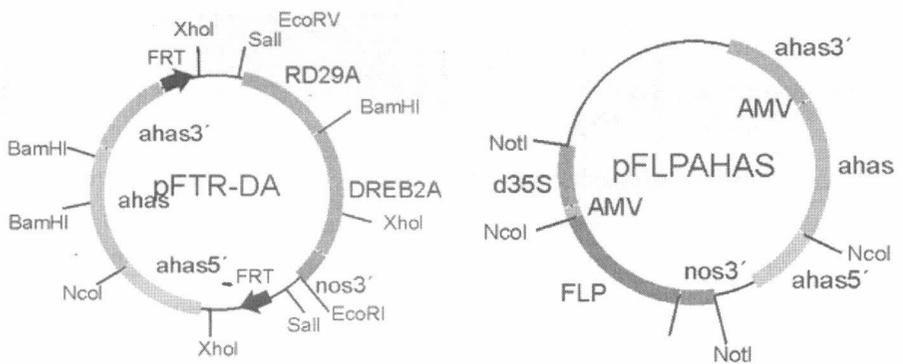


Figura 4 – Plasmídeos com as sequencias FRT (pFTR-DA) e o gene da recombinase FLP (pFLPAHAS), à esquerda e direita, respectivamente. A recombinase FLP deve ser produzida em uma linhagem de feijão,

que ao ser cruzado com outro contendo os elementos ou sequencias FRT, deverá promover a excisão do gene *ahas* (no presente caso) contido entre os dois elementos. Metodologia semelhante pode ser utilizada para inserir um gene em lócus previamente caracterizado.

Desenho racional de genoma

Engenharia genética do genoma é a atividade que envolve modificações de no mínimo duas regiões distintas do genoma, simultaneamente. O objetivo final seria a construção de um organismo útil que não pode ser obtido facilmente apenas por favorecer a evolução e seleção. Envolve desenhar, modelar, construir e testar o novo organismo. A engenharia genômica é, neste sentido, a arte de construir um genótipo que dá origem a um fenótipo desejado, uma tarefa que hoje ainda parece não muito factível de ser alcançada (ESVELT; WANG, 2013). Contudo, obviamente o grau de dificuldade a ser enfrentado depende do número de alterações que se propõem de ser feitas no genoma existente de modo a alcançar o novo fenótipo, ou seja passar do genoma com uma simples mudança para o genoma com múltiplas mudanças. Um conjunto de tecnologias e ferramentas entre as já disponíveis e outras a serem desenvolvidas terão de ser usadas, tais como: Transformação genética, TALENs, Recombinases (RCME), Transposons, Sequenciamento de última geração, GBS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD, R. W. Principles of plant breeding. New York: J. Willey, 1960. 485 p.
- ANDRIVON, D. Nomenclature for pathogenicity and virulence: the need for precision. *Phytopathology*, St. Paul, v. 83, n. 9, p. 889-890, Sept. 1993.
- ESVELT, K. M.; WANG, H. H. Genome-scale engineering for systems and synthetic biology. *Molecular Systems Biology*, v. 9, n. 1641, p. 1-17, Jan. 2013.

FRASER, R. S. S. Genetics of plant resistance to viruses. In: EVERED, D.; HARNETT, S. (Ed.). Plant resistance to viruses. Chichester: J. Wiley, 1987. p. 6-22. (CIBA Foundation Symposium, v. 133).

FRASER, R. S. S. The genetics of resistance to plant viruses. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, v. 28, p. 179–200, 1990.

GARCÍA-CANO, E.; RESENDE, R. O.; BOITEUX, L. S.; GIORDANO, L. B.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; MORIONES, E. Phenotypic expression, stability, and inheritance of a recessive resistance to monopartite begomoviruses associated with tomato yellow leaf curl disease in tomato. Phytopathology, St. Paul, v. 98, n. 5, p. 618-627, May 2008.

HALEY, S. D.; AFANADOR, L.; KELLY, J. D. Identification and application of a random amplified polymorphic DNA marker for the I gene (potyvirus resistance) in common bean. Phytopathology, St. Paul, v. 84, n. 2, p. 157-160, Feb. 1994.

KELLY, J. D.; GEPTS, P.; MIKLAS, P. N.; COYNE, D. P. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. Field Crops Research, Amsterdam, v. 82, n. 2/3, p. 135-154, May 2003.

KELLY, J. D.; MIKLAS, P. N. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. Molecular Breeding, Dordrecht, v. 4, n. 1, p. 1–11, 1998.

LAPIDOT, M.; FRIEDMANN, M. Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses. Annals of Applied Biology, Warwick, v. 140, n. 2, p. 109–127, 2002.

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

LI, Z.; XING, A.; MOON, B. P.; McCARDELL, R. P.; MILLS, K.; FALCO, S. C. Site-specific integration of transgenes in soybean via recombinase-mediated DNA cassette exchange. *Plant Physiology*, Minneapolis, v. 151, n. 3, p. 1087–1095, May 2009.

MAYER, A. Concerning the mosaic disease of tobacco. *Phytopathological Classics*, Ithaca, n. 7, p. 9-24, 1942.

PALLOIX, A.; ORDON, F. Advanced breeding for virus resistance in plants. In: CARANTA, C.; ARANDA, M. A.; TEPFER, M.; LOPEZ-MOYA, J. J. (Ed.). *Recent advances in plant virology*. Norfolk: Academic Press, 2011. p. 195-218.

PATERNIANI, E.; NASS, L. L.; SANTOS, M. X. dos. O valor dos recursos genéticos de milho para ao Brasil: uma abordagem histórica da utilização de germoplasma. In: UDRY, C. V.; DUARTE, W. (Ed.). *Uma história brasileira do milho: o valor dos recursos genéticos*. Brasília, DF: Paralelo 15, 2000. p. 11-41.

SCHOLZ, M.; RUGE-WEHLING, B.; HABEKUSS, A.; SCHRADER, O.; PENDINEN, G.; FISCHER, K.; WEHLING, P. Ryd4Hb: a novel resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum* into barley and conferring complete and dominant resistance to the barley yellow dwarf virus. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 119, n. 5, p. 837-849, Sept. 2009.

SEBASTIAN, S. A.; STREIT, L. G.; STEPHENS, P. A.; THOMPSON, J. A.; HEDGES, B. R.; FABRIZIUS, M. A.; SOPER, J. F.; SCHMIDT, D. H.; KALLEM, R. L.; HINDS, M. A.; FENG, L.; HOECK, J. A. Context-specific marker-assisted selection for improved grain yield in elite soybean populations. *Crop Science*, Madison, v. 50, n. 4, p. 1196–1206, July/Aug. 2010.

SHUKLA, D. D.; GOUGH, K. H.; XIAOWEN, X.; FRENKEL, M. J.; WARD, C. W. Genetically engineered resistance in plants against viral infection. In: PRAKASH, J.; PIERIK, J. L. M. (Ed.). *Horticulture: new technologies and applications*. Dordrecht: Kluwer, 1991. p. 107-113.

THIEME, R.; RAKOSKY-TICAN, E.; GAVRILENKO, T.; ANTONOVA, O.; SCHUBERT, J.; NACHTIGALL, M.; HEIMBACH, U.; THIEME, T. Novel somatic hybrids (*Solanum tuberosum* L + *Solanum tarnii*) and their fertile BC1 progenies express extreme resistance to potato virus Y and late blight. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 116, n. 5, p. 691-700, Mar. 2008.

TULMANN NETO, A.; ANDO, A.; COSTA, A. S. Induced mutation in beans (*Phaseolus vulgaris*) to obtain varieties resistant to Golden Mosaic Virus. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, Geneva, v. 19, p. 86, Mar. 1976.

UKAI, Y. Genetic analysis of a mutant resistant to Barley yellow mosaic virus. *Barley Genetics Newsletter*, Fort Collins, v. 14, p. 31-33, 1984.

WALKER, J. C. *Plant pathology*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1957. 707 p.

MELHORAMENTO GENÉTICO NO MANEJO DE DOENÇAS DE PLANTAS

Grupo de Estudos Avançados em Fitopatologia

2013

Melhoramento Genético no Manejo de Doenças de Plantas

