

Tema: Conte 8 - Biologia Molecular e Engenharia Genética Aplicadas à Fitopatologia

Introdução

As plantas cultivadas estão sujeitas a doenças causadas por fitopatógenos, que afetam a fisiologia e consequentemente o funcionamento normal das células. Estima-se que 14% dos perdas de produção agrícola está correlacionada com as doenças de plantas no mundo. Entre os agentes causadores de doenças de plantas, temos os fungos; Oomycetes; Bactérias; Vírus e Vírus-like; Fitoplasmas e Espiroplasmas e os (PM) Nematóides.

Desta ampla gama de agentes causais, técnicas de identificação e diagnose são importantes para compreender essas relações, fazer a diagnose correta e propor medidas de manejo integrado dessas doenças. Na fitopatologia clássica, técnicas atreladas à morfologia eram amplamente empregadas na diagnose para a identificação do agente causal, sendo elas: tamanho e morfologia das estruturas reprodutivas, coloração de colônias, variações das colônias entre meios de cultura, temperatura, luminosidade e outras características.

Com o avanço das pesquisas, a biologia molecular surgiu, não para substituir, mas para complementar as análises morfológicas, tornando os resultados mais rápidos e com uma maior precisão. Essas técnicas nem sendo implementadas ao longo do tempo, apresentando resultados mais precisos, devido à alta sensibilidade de detecção dos organismos, mas ainda apresenta alguns pontos que dificultam a aplicação em testes de rotina, que é o custo elevado.

Após o avanço dos fermentos aplicados na biologia molecular, a engenharia genética também apresentou avanços significativos na fitopatologia, especificamente na aplicação de marcadores mole-

culares para a detecção de caracteres de interesse em plantas selecionadas / e ou melhoradas geneticamente.

Diante do exposto, este texto está dividido nos (seguintes) seguintes tópicos: Técnicas de Biologia Molecular Aplicadas à Fitopatologia, onde serão apresentados os instrumentos e métodos utilizados, citando exemplos; Engenharia genética Aplicada à Fitopatologia - Resistência Genética a doenças de plantas, mostrando técnicas de melhoramento vegetal e aplicação (das) de marcadores moleculares e transgênicos para a obtenção de materiais geneticamente melhorados e por fim as conclusões gerais.

Técnicas de Biologia Molecular Aplicadas à Fitopatologia

Desde o advento da biologia molecular, técnicas estão sendo aplicadas / adaptadas para a fitopatologia, visando maior precisão na identificação e diagnose de doenças e trazendo uma melhor compreensão para áreas mais específicas, onde essas técnicas se tornam necessários, como por exemplo a virologia, sendo os vírus, organismos que não crescem em meio de cultura e de difícil visualização, utilizando técnicas rotineiras de laboratório. Para (compre) uma melhor compreensão, iremos apresentar as técnicas utilizadas nesta área.

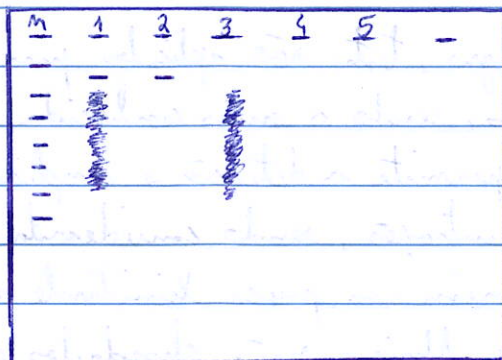
Extração de DNA / RNA

O primeiro e importante passo para trabalhar com biologia molecular é a obtenção do DNA / RNA (puro) puro e íntegro para a aplicação dos instrumentos. Pensando em material genético, temos duas formas para a obtenção, a primeira extração de DNA (RNA) total, onde o tecido sintomático é moído e todo o material genético é extraído (Planta / Fitopatógeno), muito útil em casos que não é possível o isolamento do agente causal, como por exemplo vírus e micróbios,

fiteplasma e os espiroplasma. A seguir, uma vez o agente causal isolado, procede-se com a extração de DNA/RNA do próprio organismo. Para ambos os casos, algumas etapas devem ser seguidas para a obtenção de material genético de qualidade.

Para a extração, diversos métodos podem ser empregados, a fim de extrair o material genético dos células vegetais (e ou de ~~outras~~) microrganismos em questão. Basicamente, para extrações são utilizados reagentes para romper a célula e liberação de material genético, separação de fases, eliminando resto de paredes e proteínas que não serão usados nos testes e também aplicação de enzimas específicas, como RNases, proteinase K e outras.

Uma vez o DNA/RNA extraído, deve-se testar a qualidade/integridade do mesmo. Para isso, procede-se a corrida da (ele) eletroforese que irá fornecer bandas marcadas com um buffer de corrida + gel red e a leitura feita em um transiluminador analisando o gel como mostrado na imagem abaixo:



Como pode-se observar, acima temos a amostra M, que é a (som) o marcador padrão, representando bandas em Kb ou pb, a amostra 1, que indica DNA/RNA na amostra, banda bem marcada no início do gel, porém mostra também algum grau de contaminação. A amostra 2 apresentou DNA/RNA na amostra, com uma banda bem marcada no início e comparado com a amostra 1, nenhuma contaminação, podendo ser utilizada nos testes posteriores. Já a

e 4 não apresentaram presença de DNA/RNA indicando degradação ou falha no processo de extração e ausência da amostra, respectivamente, sendo necessária recondução da extração e/ou ajuste no protocolo utilizado. E por fim a amostra 5 segue o gel somente com água utilizada para resuspende o DNA/RNA extraído + os marcadores, sendo indicada como controle (positivo) negativo.

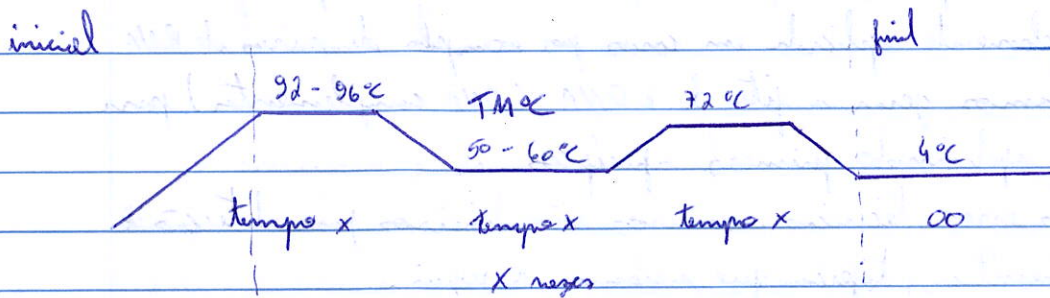
Complementar à visualização do (gel) gel, os amostras são submetidos a outro teste, um teste quantitativo no nanodrop, que analisa a quantidade de DNA/RNA na (amostra) amostra que será diluída para uma amostra de trabalho. Além da informação quantitativa, temos também a presença de uma curva, que deve ser analisada a cerca da qualidade do material genético e também mais dois parâmetros numéricos acerca do comprimento de onda, indicando a presença de fenol ou outro contaminante na amostra.

Técnica de PCR (Polimerase chain Reaction)

Obtido o material genético íntegro, testes são aplicados para detecção e (~~estudos~~) estudos posteriores, sendo a mais conhecida e empregada, a PCR. Esta técnica permite a detecção e ampliação do material genético em baixas concentrações, sendo considerada uma técnica com alta sensibilidade, porém um pouco limitante ainda devido aos custos mais elevados. Mais serão abordados aspectos e processos para o desenvolvimento das técnicas. Vale ressaltar que a PCR convencional e a PCR em tempo real são bem próximas no quesito de análise dos resultados, o que muda é a etapa de eletroforese aplicada após a primeira (PCR convencional) e não na segunda (PCR em tempo real) a fim de quantificação.

Para o processo são empregados primers de regiões específicas, que ao se anelarem nos fitos ~~intra~~ (amplifica-bis) amplificam os. Na reação ainda deve ser adicionados os dNTPs (~~ATG, C, T~~), a

Tag DNA polimerase, tempos para manter a reação estável ao longo dos ciclos, primers e o material genético de interesse. Após o preparo do mix de reação a amostra é submetida ao termociclador onde temperaturas e tempos específicos serão aplicados a fim de amplificar o material, como exemplificado no gráfico abaixo:



As temperaturas e tempos são próximos dos utilizados nas reações, porém são fictícios, devendo ser ajustados de acordo com cada (rea) reação / primers. De maneira geral o mix de reação é submetido a uma etapa inicial de abertura da dupla fita de DNA / RNA e posteriormente a vários ciclos de abertura dos fitos, anelamento do primer e amplificação. (fo) Finalizados esses ciclos a amostra permanece no termociclador por tempo indeterminado até a retirada para testes posteriores ou armazenamento. Para análise dos resultados (rea) estes são submetidos à análise de eletroforese seguindo o mesmo princípio apresentado na imagem do tópico de extração de DNA / RNA.

Após a amplificação do material, este passa por um processo de purificação e segue para o sequenciamento, que visa (ampl) fazer a leitura do material amplificado, para que este seja analisado, alertas das bases introduzidas presentes e comparados com sequências similares, onde posteriormente são realizadas análises filogenéticas para a identificação das (esta) espécies.

Outras técnicas moleculares aplicadas à Fitopatologia

Além das técnicas apresentadas, outras técnicas nem sempre empregadas para casos mais específicos, sendo elas a eletroforese de enzimas para a detecção de espécies de nematoides, hibridização, utilizada para analisar a afinidade de DNA + uma sonda (~~radioativa~~) radioativa ou não para detecção de genes de interesse e por fim a RT-PCR, amplamente aplicada em casos por exemplo de vírus de RNA em que precisamos gerar a fita de cDNA (DNA complementar) para amplificação, aplicando primers específicos.

Visto todos esses técnicas, os usos são diversos para detecção e na Engenharia Genética, tópico que veremos a seguir.

Engenharia Genética aplicada à Fitopatologia

Com o avanço das técnicas moleculares, (~~marcadores~~) iniciou-se a aplicação destes no melhoramento vegetal, na Fitopatologia, especificamente na parte de resistência (~~a~~ de) de plantas a doenças, através da aplicação de marcadores moleculares para a detecção de genes de resistência, facilitando e encurtando os programas de melhoramento em alguns casos.

Resistência em doenças, temos dois processos conhecidos, sendo eles a piramidagem de genes e o plantio em multilinhas, visando reduzir a resistência a campo. Na piramidagem de genes, vários genes de resistência são inseridos no mesmo material e multilinhas são materiais que apresentam genes de (~~resistência~~) resistência específicos, plantados alternadamente.

Outra ferramenta aplicada na fitopatologia é a transgênia, que consiste na inserção de genes de interesse de outra espécie em uma espécie a ser melhorada, também visando resistência. Adicionalmente a essas ferramentas, temos também a técnica de RNA interfe-

rente que visa a inativação de funções essenciais uma vez que o agente entra em contato com o hospedeiro.

Um exemplo de sucesso de engenharia (genética) genética aplicada à fitopatologia foi o desenvolvimento da tecnologia ShikI pela Embrapa e seus parceiros, visando a resistência de plantas de soja à ferrugem asiática.

Considerações finais

O aprofundamento e avanço da biologia molecular e engenharia genética tem auxiliado os trabalhos de identificação, diagnose e geração de materiais com níveis de resistência e ou características de interesse na fitopatologia, reduzindo o tempo de geração de dados e contribuindo para um manejo integrado dessas doenças mais assertivo.