

Biologia Molecular e Engenharia Genética Aplicadas à Fitopatologia

A Biologia Molecular e Engenharia Genética são áreas inseridas dentro da Fitopatologia Molecular que caminham comitadamente. A Biologia Molecular funciona alimentando o conhecimento genético e constitui a base da diagnose, sendo indiretamente responsável por medidas de controle eficaz. Isto porque, a Engenharia Genética racionaliza o conhecimento gerado na Biologia Molecular e traduz na prática medidas eficazes de controle genético, por meio do substrato sólido da imunidade das plantas proposto por Jones e Dang (2006), sobre a teoria gene A, gene desenvolvida por Flor (1971), além de elucidações funcionais de genes (segmento de DNA que pode ser traduzido em uma polipeptídeo). A Fitopatologia Molecular possui como papel principal, a diagnose. Na década de 1980, na qual já se tinha o conhecimento do Dogma Central da Biologia Molecular, o método comumente aplicado na diagnose eram técnicas sorológicas, baseadas na interação Antígeno - Anticorpo. Entretanto, com a

2

DESCOBERTA / INVENÇÃO DA REACÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERAS POR KARY MULLIS EM 1980, A DIAGNOSE DEU UM SALTO GIGANTESCO, POIS A TÉCNICA APRESENTAVA ALTÍSSIMA SENSIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE NA QUAL SE BASEIA, NA AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR MEIO DE Taq POLIMERASE (TERMINUS AQUATICUS), ONDE É CAPAZ DE REPRODUZIR ESTRATÉGIAS MOLECULARES "IN SITU". PARA ISTO UTILIZA-SE PRIMEIRA (INICIADOR), Taq POLIMERASE, MgCl₂, TEMPERAS, OLIGONUCLEOTÍDEOS (A, C, T, G) e DNA MOLDE, ONDE POR MEIO DE GRADIENTES DE TEMPERATURA É POSSÍVEL DESNATURAR (95°C), REALIZAR O ANELAMENTO DOS PRIMERS (55°C) e A EXTENSÃO DA FITA (72°C), GARANTINDO UMA PRODUÇÃO EXPONENCIAL DA FITA MOLDE (2ⁿ). ESSA TÉCNICA, ALIADA AO "TAXON" SEQUENCIAMENTO DE PRIMEIRA GERAÇÃO DESENVOLVIDO POR GARGRE, PROMOVEU UM AVANÇO NA TAXONOMIA.

ALTERNATIVAMENTE, MÉTODOS FORAM ADAPTADOS CONFORME FINALIDADE, POR EXEMPLO. MÉTODOS ALTERNATIVOS COMO NESTED-PCR PROMOVEU MAIOR ESPECIFICIDADE E AUMENTO DO NÚMERO DE CÓPIAS. A RT-PCR, POSSIBILITOU GERAR cDNA, A PARTIR DE RNA, INTENSIFICANDO O CONHECIMENTO DE VÍRUS E COMEÇANDO EM 2023, NA TAXONOMIA BINOMIAL, "E" PELO ICTV.

O DESENVOLVIMENTO DE LAMP, AMPLIFICAÇÃO MEDIADA POR LOOP "ALÇA", POSSIBILITOU

3

A AMPLIFICAÇÃO SEM A NECESSIDADE DE UM TERMOCICLADOR, COM AMPLIFICAÇÃO REALIZADA EM TEMPERATURA CONSTANTES. Entretanto, o ponto de inflexão na Biologia Molecular, ocorreu com o desenvolvimento da PCR em Tempo Real (qPCR). Por meio de sondas tipo TaqMan, e o fluoróforo Syber Green, foi possível quantificar o número de cópias (carga DNA ou RNA (RT-qPCR), aumentando a sensibilidade em comparação a PCR tradicional, onde a cada ciclo de amplificação, aumenta a intensidade luminosa emitida pelo fluoróforo. Essa tecnologia abriu portas para estudos de expressão gênica, quantificação de DNA/RNA, etc.

Simultaneamente, técnicas de PCR fingerprinting, foram desenvolvidas em conjunto com PCR tradicional e separação de bandas por gel de agarose, utilizando marcadores, para realizar identificação intraespecífica, como utilizado em *Xanthomonas*, *Ralstonia* e outras bactérias, bem como *Fusarium* e outros fungos. Entre essa técnica destaca, o RAPD, porém com baixa reprodutibilidade com os padrões de banda sendo substituído por AFLP, BOX-PCR, ERIC-PCR, REP-PCR.

Com o desenvolvimento de técnicas

DE SEQUENCIAMENTO DE SEGUNDA GERAÇÃO
 COMO A PLATAFORMA ILLUMINA, FOI POSSÍVEL
 SEQUENCIAR GENÔMAS COMPLETOS, COMO
 A *Xylella fastidiosa*, PRIMEIRA BACTÉRIA
 SEQUENCIADA COMPLETAMENTE, COM A GA SC,
 NA QUAL RENNIN 116 PESQUISADORES E
 34 LABORATÓRIOS, PUBLICADO POR SIMPSON ET AL
 NA NATURE EM 2000. O SEQUENCIA-
 MENTO DE TERCEIRA GERAÇÃO AMPLIFICOU MAIS
 NOSSA COMPREENSÃO, POR MEIO DA PLATAFORMA
 OXFORD NANOPE, POSSIBILITANDO SEQUENCIAR
 EM CURTO ESPAÇO DE TEMPO GENÔMAS
 COMPLETOS. AMBAS AS GERAÇÕES ABRIAM
 PORTAS PARA ANÁLISES DO MICROBIOMA,
 FORNECENDO BASE SÓLIDA PARA DECODIR
 DO HOLOBIONTE, POR MEIO DE ANÁLISES
 METATRANSÔMICAS E METAGENÔMICAS. ANÁLISE
 PROTEÔMICA E METABOLÔMICA NOS
 FORNECERAM O ENTENDIMENTO DA
 REGULAÇÃO GÊNICA E EXPRESSÃO DURANTE
 PROCESSOS INFECTIVOS, E ENTENDIMENTO
 COMO OS PATÓGENOS ATACAM E COMO
 AS PLANTAS SE DEFENDEM A NÍVEL
 "CELULAR" MOLECULAR.

SEMELHANTEMENTE, PORÉM COM BAIXO
 CUSTO, QUANDO COMPARADAS POR ANÁLISES
 DE SEQUENCIAMENTO COMPLETO, A TÉCNICA
 DE RNA-SEQ, APROFUNDOU O CONHE-
 CIMENTO DA EXPRESSÃO GÊNICA NO
 MOMENTO DO PROCESSO INFECTIVO, SENDO
 CONFIRMADA POR qPCR.

A descoberta do sistema de regulação mediada por RNA de interferência (RNAi), promoveu o entendimento de como os patógenos regulam a expressão gênica e destacou o modo de controle genético de vírus. Desta forma, melhoristas puderam programar a síntese de RNAi para controlar patógenos, ou aplicar via pulverização, aumentando a eficácia de controle, entretanto, com limitações devido a instabilidade de RNAi de forma exógena.

Diante deste profundo conhecimento durante décadas de descoberta, fitopatologista / melhorista, aprenderam a utilizar a Biologia Molecular ao nosso favor.

Tecnologias do DNA Recombinante, geram modificações pontuais no genomas dos fitopatógenos, na qual possibilitou entender a função dos genes, por meio de mutagênese insercional e edição genética. Uma das primeiras tecnologias foi a utilização de *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) na qual, obtiveram transgênicos por meio do DNA-T, plasmidial. Essa tecnologia possibilitou introduzir DNA exógeno em fungos, marcados por genes resistentes a higromicina ou com fluoróforos.

A FIM DE VALIDAR O SUCESSO DA TRANSFORMAÇÃO, CULTIVANDO O FUNGO EM MEIO RESTRITO COM ANTIBIÓTICOS.

Outra ferramenta insercional em fungos foi o REM - INJECÇÃO MEDIADA POR ENZIMA DE RESTRIÇÃO, QUE ATRAVÉS DE UM PLASMÍDIO, MARCADO COM UM GENE RESISTENTE A FUNGICIDA, FOI POSSÍVEL CRIAR MUTANTES REALIZANDO NOCAUTE GÊNICO. SENDO INTRODUZIDO POR MEIO DA PROTOPLASTIZAÇÃO, POR MEIO DA PEG E ELETROPORAÇÃO.

EM BACTÉRIAS, A DESCOBERTA DE ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS POR BARBARA McClinck, EM MILHO, E GANHADORA DE PRÊMIO NOBEL, POSSIBILITOU, MUTAÇÕES INSERCIONAIS. OS ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS POSSIBILITOU A ELUCIDAÇÃO DO TWO-SPECIES GENOME, ENTENDENDO COMO O GENOMA POSSUI ALTA PLASTICIDADE ADAPTATIVA. POR MEIO DO GENE TNS (TRANSPOSON), JUNTAMENTE COM ENZIMA TRANSPONASE, INTEGRADO EM PLASMÍDEO MARCADO COM ANTIBIÓTICO (EX: CANAMICINA, STREPTOMICINA, ETC), FOI POSSÍVEL INSERIR GENES EM BACTÉRIAS. ESSES ELEMENTOS POSSUEM A CAPACIDADE DE SALTAR NO GENOMA E POR MEIO DA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA MEDIADA PELA RECA, PODE OCORRER O SINGLE CROSSOVER OU DUPLA CROSSOVER, A DEPENDER DO OBJETIVO GÊNICO.

QUE SE DESEJA OUTRA. TODAS AS TÉCNICAS DE ENGENHARIA GÊNICA DESCRITAS ANTERIORMENTE, COM FOCO NA MUTAGÊNESE, UTILIZA REPARAÇÃO CELULAR POR HOMOLOGIA (HDR) OU POR REPARAÇÃO NÃO HOMÓLOGA (NHEJ), A DEPENDER DO ORGANISMO E TÉCNICA, APLICADA.

ENTRETANTO, ESSA É A BASE PARA ENTENDER COMO OCORRE A EDIÇÃO GÊNICA. A PRIMEIRA GERAÇÃO DE EDIÇÃO UTILIZAVA A TÉCNICA MEDIADA POR ZENCO DE ZINCO (ZFN), QUE RECONHECE TRIPLOS DE AMINOÁCIDOS EM TÂNDEN, UTILIZANDO PROTEÍNAS. A TÉCNICA FOI SUBSTITUÍDA POR TALEN, DERIVADO DO SISTEMA TAL DE XANTHOMONAS, CARACTERIZANDO TÉCNICA DE SEGUNDA GERAÇÃO, QUE DESTA VEZ IDENTIFICAVA 1 AMINOÁCIDO, TAMBÉM CONSTITUÍDO EM TÂNDEN, POR PROTEÍNAS. ESSAS TÉCNICAS ERAM CARAS, DEVIDO À SÍNTESE DE PROTEÍNA, ALÉM DE MUITO TRABALHOSA, NECESSITANDO DE PRIMEROS EM AMBAS AS FITAS, PARA CORTE DO DNA ALVO E POSTERIORMENTE EDIÇÃO. PORÉM, EM 2012, A EDIÇÃO GÊNICA FEZ UM SALTO AVANÇADO COM O DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA CRISPR-CAS EM BACTÉRIAS, ONDE DESCOBRIU O SISTEMA DE DEFESA CONTRA FAGOS, NA QUAL REPROGRAMAMOS

8

AO NOSSO FAVOR. A TÉCNICA, DE FORMA
RECURVADA, UTILIZA UMA PROTEÍNA
CAS (EX: CAS 9), QUE REALIZA A CLIAGEM
DO DNA, MEDIADO POR UM RNA
guia (sgRNA), COMPLEMENTAR A ^{região} Região
de CLIAGEM. O COMPLEXO RNA guia e
CAS IDENTIFICAM O SITO ALVO E
REALIZA A CLIAGEM AO ENCONTRAR
UMA SEQUÊNCIA PAM (EX: NGG PARA
CAS 9), GARANTINDO ESTABILIDADE. ESSA
TECNOLOGIA REVOLUCIONOU, DEVIDO A
EDIÇÃO SEM A ADIÇÃO DE DNA EXÓGENO,
ALÉM DA SUA ESPECIFICIDADE NA
EDIÇÃO. APÓS O CORTAR, A FITA
PODE SER REPARADA POR HDR OU
NHEJ, PODENDO ADICIONAR UM DNA
SINTETIZADO IN SILICO, OU APENAS
OCASIONANDO INDEL OU DENATURAÇÃO
COMPLETA DO GENE.

AS FERRAMENTAS DE BIOLOGIA MOLECULAR
E ENGENHARIA GÊNICA SÃO ATUALMENTE
FERRAMENTAS PODEROSAS, ESPECÍFICAS E COM
ALTO PODER DISCRIMINATÓRIO. FERRAMENTAS
DE qPCR SÃO UTILIZADAS CONSTANTEMENTE
EM CENTRO DE INDEXAÇÃO, DIAGNÓSE DE
DOENÇAS QUARENTENÁRIAS PRESENTES E
AUSENTES, ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA E
QUANTIFICAÇÃO DE PARTÍCULAS. NA FUNDERCITRUS
PRODUTOS ESPECIALIZADOS GARANTE A
DIAGNÓSE DO Huanglongbing (Candidatus
Liberibacter asiaticus), EM MUDAS

DE CÍTRUS E INÍFETO VETOR; PCR TRADICIONAL POR MEIO DE ANÁLISE MULTILOCUS COM GENES housekeeping GARANTE TAXONOMIA DE GÊNERO / ESPÉCIE; ANÁLISE DE GENÔMA COMPLETO POR MEIO DE HIBRIDIZAÇÃO DNA-DNA (CHAD) E IDENTIDADE MÉDIA DE NUCLEOTÍDEO (ANI), GARANTE A DESCRIÇÃO CORRETA DE BACTÉRIAS E FUNGOS; PCR-FINGERPRINTING AUXILIA NA AGRUPAMENTO DE ISOLADOS GENETICAMENTE SIMILARES POR MEIO DE ANÁLISE DE DISTÂNCIA (EX: UPGMA); CONTANTEMENTE, A ENGENHARIA GENÉTICA, ELUCIDA OS CONHECIMENTOS GERADOS POR MEIO DE MUTAGÊNESE E EDIÇÃO GENÔMICA, OBSERVANDO AS FUNCIONALIDADES, GERANDO ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS (OGMs), NA MUTAGÊNESE, ALÉM DE ORGANISMOS EDITADOS, COM CRISPR. AMBOS REGULAMENTADOS PELA NORMATIVA 16/2005 E LEI 11.105/2005 DO CTNBio.

APESAR DE INÚMERAS TÉCNICAS RELATADAS, ELAS NÃO SUBSTITUEM AS TÉCNICAS BIOLÓGICAS E SOROLÓGICAS NA DIAGNOSE, DEVIDO SEREM FÁCEIS, DE BAIXO CUSTO E DA NECESSIDADE DE COMPROVAR A RELAÇÃO PATÓGENO-DOENÇA, PROPOSTO NOS POSTULADOS DE KOCH. ALÉM DISSO, AS TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR E ENGENHARIA GENÉTICA, REQUER ALTO CONHECIMENTO PRÉVIO E EQUIPAMENTOS SOFISTICADOS. ENTRETANTO, ESPERA-SE QUE NAS PRÓXIMAS

DÉCADAS, HAJA UMA EVOLUÇÃO NA
INTEGRAÇÃO DE ANÁLISES AUTOMATIZADAS,
CUSTOS DE SEQUENCIAMENTO E PACOTES
DE TÉCNICAS REDUZIDOS, PARA O
DESENVOLVIMENTO DA FITOPATOLOGIA, E
CONSEQUENTEMENTE MAIS ELUCIDACÃO DE
MECANISMOS DESCONHECIDOS QUE AUXILIEM
O REPROGRAMAMENTO MOLECULAR A FAVOR
DA PROTEÇÃO DE CULTIVOS.