

CAPÍTULO 2: MELHORAMENTO DE PLANTAS VISANDO À RESISTÊNCIA A PATÓGENOS

Liane Bahr Thurow^{1,2}
Caroline Marques Castro¹
Arione da Silva Pereira¹

¹EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

²UFPEL - Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

INTRODUÇÃO

A população mundial mais do que dobrou nos últimos 50 anos e estima-se que passará de nove bilhões em 2050 (FAO 2010). O crescente aumento populacional exige um aumento constante da produção agrícola, a qual vem sendo dificultada pelas alterações climáticas e o surgimento de novas doenças, assim como alterações genéticas nos patógenos, resultando na perda de fontes de resistência anteriormente eficazes.

Perdas substanciais decorrentes da incidência de fungos e oomicetos, como, por exemplo, a brusone (*Magnaporthe oryzae*) em arroz, a ferrugem do colmo (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) em trigo, o carvão (*Ustilago maydis*) em milho, a requeima (*Phytophthora infestans*) em batata e a ferrugem asiática (*Phakospora pachyrhizi*) em soja, representam uma ameaça atual e crescente à segurança alimentar. Estima-se que estas perdas seriam suficientes para alimentar, no mínimo, 8,5% da população atual estimada em mais de sete bilhões de pessoas (FISHER et al., 2012).

Problemas sérios podem ocorrer quando cultivares suscetíveis de uma cultura são atacadas por patógenos agressivos e virulentos, em condições favoráveis para o desenvolvimento da doença. Em circunstâncias extremas, podem ocorrer epidemias devastadoras como aconteceu na Irlanda em 1845, quando cerca de 80% dos campos de batata foram perdidos devido à epidemia da requeima causada pelo oomiceto *Phytophthora infestans*. Devido a este desastre, mais de dois milhões de pessoas morreram de fome e muitos outros foram forçados a migrar para outras regiões (BORÉM; FRITSCHÉ-NETO 2012).

Em 1999, uma nova raça altamente virulenta do fungo *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, denominada Ug99, foi encontrada em Uganda. A raça Ug99 é capaz de suplantar todos os genes de resistência das cultivares comerciais de trigo atualmente cultivadas e tem se disseminado rapidamente no continente Africano e na Ásia (AYLIFFE et al., 2008; SINGH et al., 2015). Outra séria ameaça à segurança alimentar, especialmente nos países em desenvolvimento, é o mal-do-Panamá, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, uma doença endêmica de todas as regiões produtoras de banana do mundo e o melhor meio para o controle consiste na utilização de cultivares resistentes (BUTLER 2013).

Recentemente, alguns estudos têm mostrado que, no Brasil, a ferrugem asiática da soja foi responsável por 37-67% da redução da produção (KUMUDINI et al., 2008). Desde o seu surgimento em 2001, esta doença causou perda de rendimento de mais de 10 bilhões de dólares para os produtores de soja no Brasil (LANGENBACH et al., 2016). Na Ásia, as perdas devido à ferrugem asiática da soja chegaram a 80%. Uma grande quantidade de fungicidas, com efeitos econômicos e ambientais negativos, seria economizada, nos campos de soja, se cultivares resistentes estivessem disponíveis (BORÉM; FRITSCHÉ-NETO 2012).

Esses exemplos destacam a necessidade sempre presente de uma melhor compreensão das interações planta-patógeno e a maneira pela qual este conhecimento pode ser aplicado em estratégias de melhoramento visando à uma resistência durável e efetiva.

Talvez a mais reconhecida contribuição do melhoramento à agricultura seja a criação de cultivares resistentes a doenças. Em algumas culturas este é o único meio de controle disponível, além de ser o mais econômico, de baixo impacto ambiental e fácil adoção pelos produtores (LOPES; BOITEUX 2012). Algumas viroses de grande importância, pelos elevados prejuízos que causam, somente são controladas pelo uso de cultivares resistentes. Fungos fitopatogênicos, de grande capacidade virulenta e alta variabilidade genética, somente puderam ser controlados após a descoberta de fontes de resistência às diversas raças do patógeno (BUENO et al., 2006).

No entanto, antes de iniciar um programa para o desenvolvimento

de cultivares resistentes é necessário estabelecer seus objetivos, fazer um levantamento prévio das doenças que ocorrem na cultura e priorizá-las segundo os danos econômicos causados. Para se obter sucesso, é fundamental ter variabilidade genética e fontes de resistência disponíveis, conhecer a complexidade da herança da resistência, além de dispor de um processo eficiente de melhoramento onde ensaios para a resistência a doenças estão integrados com outros caracteres agronômicos importantes (BROWN 2015).

Este capítulo não pretende esgotar o tema proposto, mas contribuir para um maior conhecimento sobre as etapas básicas de um programa de melhoramento, visando à obtenção e utilização de cultivares resistentes, compreendendo a identificação de fontes de resistência disponíveis no germoplasma da espécie, a seleção do método de melhoramento para incorporação da resistência em cultivares comerciais, assim como as melhores estratégias de incorporação destes genes de resistência, traçadas a partir do conhecimento da estrutura genética e do potencial evolucionário das populações patogênicas. Este capítulo aborda também avanços e progressos em relação à utilização de seleção assistida por marcadores, o desenvolvimento de cultivares transgênicas, cisgênicas e o início de uma promissora nova era para o desenvolvimento de resistência a fitopatógenos através do uso de tecnologias de edição genômica.

1 FONTES DE RESISTÊNCIA

A disponibilidade de fontes adequadas de genes de resistência é um pré-requisito básico para programas de melhoramento que têm como objetivo desenvolver cultivares mais resistentes a patógenos. A escolha dos genótipos a serem utilizados como doadores está diretamente relacionada com o sucesso do programa e, por isso, é fundamental uma escolha criteriosa dos genitores a serem recombinados (cruzados). Em plantas cultivadas há quatro importantes grupos de fontes de genes de resistência: cultivares elite, coleções de germoplasma, espécies silvestres e mutações.

1.1 Cultivares elite

Genes de resistência a patógenos encontrados em linhagens e/ou cultivares de alto potencial produtivo são os mais visados. Estas fontes de resistência apresentam a vantagem de já serem adaptadas, possuírem características agronômicas favoráveis e baixa frequência de alelos indesejáveis.

1.2 Coleções de germoplasma

Uma das principais fontes potenciais de genes de resistência em espécies cultivadas são as coleções de germoplasma. Quando aparecem novas doenças ou novas raças de um patógeno já consolidado, a busca na diversidade do germoplasma, representada nas coleções mundiais de plantas cultivadas, tem conseguido localizar fontes adequadas de resistência (ALLARD 1999).

Há muito tempo que os programas de melhoramento fazem uso de bancos de germoplasma, especialmente na introgressão de características qualitativas de interesse econômico. Dentre os exemplos mais conhecidos, grande parte refere-se à introgressão de genes de resistência de plantas a patógenos, oriundos de cultivares tradicionais ou de parentes silvestres, para linhagens elite agronomicamente adaptadas (FERREIRA; RANGEL 2011). Como exemplo, a resistência para o nematoide de cisto da soja (*Heterodera glycines*), atualmente incorporada em diversas cultivares comerciais, é predominantemente derivada de dois genótipos, ‘Peking’ e PI 88788 (MITCHUM 2016). Além disso, o acesso PI 88788 também foi identificado com resistência ao vírus do mosaico da soja (*Soybean mosaic virus* - SMV) (GUNDUZ et al., 2004).

A conservação da variabilidade genética em bancos de germoplasma é muito importante para garantir que genes de resistência não sejam perdidos. Além da conservação, também é importante a caracterização das diferentes fontes de germoplasma para a resistência aos mais diversos patógenos da cultura.

Graças aos avanços na área de biotecnologia e genética molecular,

novas fontes de resistência e marcadores moleculares associados à resistência genética de plantas têm sido identificados e, conseqüentemente, melhor explorados. Estudos de associação genômica ampla (*genome-wide association studies* - GWAS) têm possibilitado avaliar o germoplasma a nível global a fim de explorar a variabilidade genética disponível em programas de melhoramento. Alguns exemplos de genes e regiões genômicas associados com resistência identificados através de GWAS incluem: resistência à ferrugem do colmo em trigo (YU et al., 2011; BAJGAIN et al., 2015); resistência à helmintosporiose (*Exserohilum turcicum*) (DING et al., 2015) e ferrugem comum em milho (*Puccinia sorghi*) (OLUKOLU et al., 2016); resistência à brusone (RABOIN et al., 2016) e a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* em arroz (DILLA-ERMITA et al., 2017), assim como a caracterização de locos de resistência a várias patógenos em soja (CHANG et al., 2016).

1.3 Espécies silvestres

As espécies silvestres afins às plantas cultivadas constituem o que se denomina parentes silvestres de tais plantas. Estas espécies, por estarem distribuídas e se desenvolverem em uma ampla diversidade de habitats, são fontes importantes de genes de resistência a diferentes estresses bióticos e abióticos.

No entanto, a utilização de fontes silvestres não é tão direta, principalmente em função de problemas relacionados com a incompatibilidade de cruzamento, esterilidade do híbrido, além da ligação de diversos caracteres indesejáveis com os desejáveis (*linkage drag*), o que dificulta o seu uso.

Mesmo com esta potencial dificuldade de uso direto desse germoplasma, as espécies silvestres são protagonistas como fontes de resistência a importantes patógenos. Um exemplo clássico de característica transferida de espécie silvestre para uma cultivada foi a resistência a *Phytophthora infestans* em batata, obtida pela introgressão de genes de *Solanum demissum*, uma espécie silvestre encontrada no México. Desde a grande fome causada por este patógeno na Europa na metade do século XIX, a espécie silvestre *S. demissum* tem sido extensivamente utilizada como fonte de resistência à requeima em programas de melhoramento, baseada na resistência raça-

específica dos genes *R1* a *R11* (PEREIRA et al., 2012). Além de *S. demissum*, uma ampla gama de espécies silvestres de batata tem sido identificada como fontes potenciais de genes de resistência.

Cientistas do CIMMYT (*International Maize and Wheat Improvement Center*) têm feito cruzamentos envolvendo *Triticum durum* e parentes silvestres desde o início da década de 1990. Tais cruzamentos têm resultado em materiais sintéticos, que podem ser facilmente cruzados com cultivares melhoradas para que novos genes úteis sejam incorporados, garantindo, por exemplo, resistência à septoriose (*Parastagonospora nodorum*) e à giberela ou fusariose da espiga do trigo (*Fusarium graminearum* species complex) (CIMMYT 2004). Outros exemplos de alelos de resistência identificados em germoplasma silvestre e utilizados com sucesso no melhoramento de cereais, como o trigo, a cevada e o centeio, são encontrados em Feuillet et al. (2008).

1.4 Mutações

Quando fontes de resistência não estão disponíveis no germoplasma, uma alternativa consiste na indução de resistência mediante agentes mutagênicos em plantas.

A baixa taxa de ocorrência da mutação natural pode ser superada através da exposição de material vegetal (sementes, estacas, pólen, calos provenientes da cultura de tecidos) a agentes mutagênicos (XIONG et al., 2015). Vários agentes mutagênicos são utilizados para este propósito e podem ser divididos em dois grupos principais: mutagênicos físicos (raios X, radiações gama, radiação ultravioleta) e mutagênicos químicos (colchicina, EMS (etilmetanossulfonato), MMS (metilmetanossulfonato)) (HUSSAIN 2015).

Um exemplo clássico de mutação identificando uma valiosa fonte de resistência é o gene *MLO*, que confere resistência de amplo espectro à *Blumeria graminis* f.sp *hordei* em cevada. O primeiro mutante de cevada identificado com resistência à oídio foi induzido artificialmente por raios X e descrito em 1942. Posteriormente, foi identificada a ocorrência de mutantes espontâneos em *landraces* de cevada coletadas na Etiópia (JORGENSEN 1992).

O gene *MLO* é amplamente conservado em vegetais e regula negativamente as respostas de defesa da planta. Mutantes recessivos para o gene *MLO* conferem resistência durável e de amplo espectro para todos isolados do fungo *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (ACEVEDO-GARCIA et al., 2014). O alelo *MLO-11* introgridido no pool gênico de cevada na Europa confere resistência raça não específica à *B. graminis* f.sp. *hordei*, que tem se mantido robusta e durável há mais de 30 anos (JORGENSEN 1992).

2 EVOLUÇÃO DO PATÓGENO EM RESPOSTA A GENES DE RESISTÊNCIA DE PLANTAS A DOENÇAS

A supressão da resistência genética por populações de patógenos é um dos maiores desafios no controle genético de doenças (PALLOIX et al., 2009).

Para compreender os processos que levam à suplantação de genes de resistência, é necessário um melhor entendimento dos processos que governam a evolução do patógeno. Populações de patógenos com um alto potencial evolucionário são mais propensas a suplantarem genes de resistência em relação a populações de patógenos com um baixo potencial evolucionário. Além disso, oferecem os maiores riscos de evoluir e neutralizar outras medidas de controle, tais como aplicações de fungicidas.

O potencial evolutivo de uma população do patógeno se reflete em sua estrutura genética populacional, ou seja, na quantidade e distribuição da variação genética entre e dentro de populações (McDONALD; LINDE 2002a).

A estrutura genética de uma população é determinada pela sua história evolutiva, consequência das interações entre as cinco forças evolucionárias que afetam as populações do patógeno: mutação, tamanho de população e deriva genética, fluxo gênico, reprodução e sistema de acasalamento, e seleção. Assim, para o desenvolvimento de estratégias de uso de genes de resistência visando à resistência durável, é fundamental o entendimento da genética de populações do patógeno (McDONALD 2014).

A seguir serão descritas as cinco forças evolucionárias. Para

exemplificação, cada força será considerada individualmente. Porém, na natureza, todas interagem para determinar o curso da evolução e para gerar a estrutura genética de populações de patógenos.

2.1 Mutação

Dentre as forças evolutivas, a mutação é a única capaz de criar variabilidade genética. Mutações são alterações na sequência de bases do DNA por meio de substituição de uma base por outra, ou por meio de adição ou deleção de um ou muitos pares de bases. Mutações adicionais podem ocorrer por amplificação de um segmento particular de DNA em múltiplas cópias, por inserção ou excisão de elementos transponíveis e por inversão de um segmento de DNA (AGRIOS 2005).

As mutações ocorrem devido a erros na replicação do DNA, os quais podem ocorrer tanto na meiose (indivíduos de reprodução sexuada), quanto na mitose (indivíduos de reprodução assexuada). Desta forma, a mutação é a fonte de introdução de novos alelos em populações patogênicas. É o processo que origina novas estirpes virulentas do patógeno que suplantam a resistência de genes maiores, assim como origina estirpes com maior agressividade que podem erodir a resistência quantitativa (McDONALD; LINDE 2002b).

Taxas de mutação são geralmente baixas, embora possam diferir entre regiões genômicas e patógenos (STUKENBROCK; McDONALD 2008). Uma mutação que ocorre isoladamente de outras forças evolutivas, provavelmente não ocorreria a uma taxa suficientemente alta para produzir alterações detectáveis nas frequências alélicas, ou seja, não seria capaz de causar suplantação da resistência. No entanto, quando a mutação é acompanhada de seleção direcional, mutantes virulentos aumentam rapidamente em frequência e provocam a perda da eficácia do gene de resistência.

Tamanhos populacionais maiores tornam mais prováveis o aparecimento de mutantes com maior aptidão dentro do hospedeiro, com capacidade de multiplicar-se e assim se espalhar para novos hospedeiros antes que a mutação seja perdida por deriva genética. Além disso, patógenos

com altas taxas de mutação apresentam maior risco de suplantarem genes de resistência do que patógenos com baixas taxas de mutação, devido à maior probabilidade da presença de mutação de avirulência para virulência (McDONALD; LINDE 2002a).

2.2 Tamanho de população e deriva genética

O tamanho da população afeta a frequência de sobrevivência dos indivíduos mutantes e, conseqüentemente, a diversidade de genes na população. Populações de patógenos em uma determinada área geográfica muitas vezes não são suficientemente grandes para garantir que cada indivíduo possua progênie na próxima geração. Desta forma, ocorrem eventos aleatórios que influenciam a frequência alélica, processo este conhecido como deriva genética (AGRIOS 2005).

Quanto menor o tamanho da população, maior o efeito da deriva. Eventos de deriva são numerosos em fitopatógenos, especialmente quando infectam culturas anuais, uma vez que ocorrem reduções severas no tamanho da população do patógeno quando a sua fonte de alimento desaparece, processo denominado efeito de gargalo (*bottlenecks*). Além disso, também podem ocorrer eventos fundadores, onde uma nova população tem início a partir de um pequeno número de indivíduos (LINDE 2010).

A deriva genética leva à fixação de alelos ou genótipos nas populações e, portanto, tende a diminuir os níveis de variação genética total disponível. Populações de patógenos com grande tamanho efetivo tendem a apresentar menor deriva genética e, como consequência, maior variabilidade genética (mais alelos) e maior estabilidade ao longo do tempo (ZHAN 2016).

Com relação ao efeito de fundador, este ocorre frequentemente quando um patógeno é introduzido em uma nova área acidentalmente ou como resultado de uma violação de quarentena (McDONALD; LINDE 2002b).

2.3 Fluxo gênico

Similar à mutação, o fluxo gênico é uma fonte direta de variação genética, introduzindo novos alelos e/ou combinação de alelos de populações

vizinhas, além de, indiretamente, reduzir as chances de acasalamento de indivíduos relacionados e, conseqüentemente, aumentar o tamanho efetivo de populações patogênicas e a capacidade evolucionária de patógenos (ZHAN et al., 2015).

O fluxo gênico é um processo no qual alelos particulares (genes), ou indivíduos (genótipos), são trocados entre populações geograficamente separadas. Para patógenos estritamente assexuados, ou seja, aqueles que não recombinam genes, genótipos inteiros podem ser trocados entre as populações (McDONALD; LINDE 2002b; AGRIOS 2005). O fluxo gênico rompe as barreiras que poderiam isolar populações, sendo de grande relevância para introdução de novas variações genéticas em campos agrícolas distantes do local da mutação inicial.

Fluxo gênico e/ou fluxo de genótipos é o processo que move alelos mutantes virulentos e genótipos entre diferentes populações no campo. Patógenos com elevado fluxo gênico representam maior risco do que patógenos com baixo fluxo de genes, devido ao aumento do tamanho efetivo da população pelo fluxo de genes entre populações vizinhas (AGRIOS 2005).

O fluxo de genes envolvendo propágulos assexuados (fluxo de genótipos) representa maior risco do que o movimento de propágulos sexuais (fluxo de genes). Propágulos assexuais representam um conjunto de genes coadaptados que apresentam elevado nível de aptidão ao ambiente de origem da cultura. Por outro lado, propágulos sexuais representam novas combinações de alelos que ainda não foram testados no ambiente onde serão introduzidas por fluxo gênico (McDONALD; LINDE 2002a). Um exemplo drástico de fluxo gênico foi o movimento de um ou alguns clones do patógeno *Phytophthora infestans* do México para os Estados Unidos em 1843, em seguida, para a Europa em 1845 e, posteriormente, por todo o mundo na década de 1850 (GOODWIN et al., 1994).

2.4 Reprodução e sistema de acasalamento

Reprodução e sistema de acasalamento afetam a forma como a diversidade genética é distribuída dentro e entre indivíduos de uma população. A reprodução pode ser sexuada, assexuada ou mista (McDONALD; LINDE 2002a; CROLL et al., 2015).

O potencial evolucionário de uma população está fortemente correlacionado com a extensão da recombinação. Patógenos com reprodução sexuada obtêm rapidamente novas combinações de alelos, levando a muitos genótipos diferentes nas populações e, assim, apresentam maior capacidade de suplantar os mecanismos de resistência do hospedeiro. Em contrapartida, patógenos que possuem reprodução assexuada tendem a manter combinações existentes de genes, levando a uma menor diversidade genotípica nas populações (BARRET et al., 2008). A reprodução assexuada, assim como a endogamia regular, também apresenta vantagens para o patógeno, pois tendem a produzir linhagens clonais, com blocos de alelos ligados formando um complexo de genes coadaptados, que permanecem unidos e podem ser amplamente disseminados (McDONALD; LINDE 2002b).

Patógenos com sistema de reprodução misto apresentam riscos mais elevados, pois potencialmente se beneficiam das vantagens inerentes aos dois tipos de reprodução (sexuada e assexuada). Durante o ciclo sexual, várias novas combinações de alelos (genótipos) são originadas por recombinação. A recombinação permite que novas combinações de alelos sejam agrupadas e testadas em novos ambientes. Combinações de alelos mais adaptadas são mantidas através de reprodução assexuada e podem aumentar sua frequência em clones selecionados. A distribuição espacial e temporal das linhagens clonais dentro e entre populações dependerá principalmente do potencial de dispersão dos propágulos assexuados, desta forma, se o esporo assexual ou propágulo é capaz de dispersão de longa distância, os clones com maior aptidão podem ser distribuídos por uma ampla área através do fluxo de genótipos, causando epidemias (McDONALD; LINDE 2002a).

2.5 Seleção

Seleção é a principal força que impulsiona mudanças nas frequências de alelos mutantes. A forte seleção direcional, que ocorre quando um gene de resistência principal (receptor) torna-se amplamente distribuído por uma grande área geográfica, leva a um aumento na frequência do mutante virulento que perdeu o elicitor (alelo de avirulência), até que ocorra a supressão do gene de resistência (McDONALD; LINDE 2002b).

Populações de patógenos que são expostas à forte seleção direcional ao longo de várias gerações representam um risco maior do que as populações que, devido à resistência parcial, são expostas à seleção mais fraca. Os agroecossistemas compostos por genes de resistência individuais, como as monoculturas geneticamente uniformes, exercem forte seleção direcional na população do patógeno. Por outro lado, os agroecossistemas formados por misturas de genes de resistência, ou rotação de genes através do tempo e espaço, irão reduzir a eficiência de seleção e diminuir a frequência de mutantes virulentos (McDONALD; LINDE 2002b; ZHAN et al., 2015).

3 MÉTODOS DE MELHORAMENTO DE PLANTAS PARA RESISTÊNCIA A DOENÇAS

O melhoramento para resistência a doenças não difere fundamentalmente do melhoramento para outros caracteres. Conseqüentemente, qualquer dos diversos métodos de melhoramento apropriados para a espécie em questão podem ser utilizados para desenvolver cultivares com resistência a doenças (ALLARD 1999). A escolha do melhor método de seleção leva em consideração, principalmente, a natureza genética da resistência, se qualitativa ou quantitativa, e o tipo de reprodução do hospedeiro, se autógama ou alógama (AGRIOS 2005; CAMARGO 2011).

3.1 Melhoramento visando à resistência qualitativa

A resistência qualitativa está associada com a habilidade de genes maiores controlarem a infecção causada por raças específicas do patógeno. Para transferência de resistência qualitativa, o retrocruzamento é o método de melhoramento mais utilizado. Consiste na introgressão de um caráter alvo (resistência à doença) controlado por um ou poucos genes, geralmente provenientes de uma espécie silvestre (doador) para um genótipo elite altamente adaptado (receptor), denominado genitor recorrente (FAROKHZADEH; ALIFAKHERI 2014).

O objetivo do retrocruzamento é recuperar o genótipo do genitor

recorrente, exceto para uma ou poucas características consideradas insatisfatórias, as quais o melhorista procura transferir a partir do genitor doador. O esquema clássico deste método inicia-se com o cruzamento entre o genitor recorrente e o doador, resultando no híbrido F1. Indivíduos F1 que possuem a resistência do genitor doador são selecionados e retrocruzados com o genitor recorrente em sucessivas gerações (BORÉM; MIRANDA 2013).

A cada ciclo de seleção, a proporção do genoma do genitor doador na progênie vai diminuindo, até que após vários ciclos, em geral cinco a seis, o genótipo resultante possua as características desejáveis do genitor recorrente e a resistência do genitor doador.

A transferência de alelos dominantes é realizada mais diretamente do que a de alelos recessivos. Se o alelo em transferência for dominante, há duas classes fenotípicas: resistente e suscetível, neste caso, somente é necessária a autofecundação da progênie do último retrocruzamento para identificar os genótipos não segregantes. Se o alelo a ser transferido for recessivo, há apenas fenótipos suscetíveis, sendo necessárias autofecundações intercaladas aos retrocruzamentos, para identificar as plantas que serão descartadas e quais serão retrocruzadas ao genitor recorrente (CAIXETA; ZAMBOLIM 2014).

Mais recentemente, marcadores moleculares associados a genes de resistência têm sido utilizados na seleção. Assumindo que marcadores de DNA podem prever com segurança o fenótipo, a seleção assistida por marcadores (MAS – *marker-assisted selection*) pode substituir ou assistir no *screening* de germoplasma para resistência a doenças. Ao determinar o alelo do marcador de DNA, plantas que possuem determinados genes podem ser identificadas baseadas no genótipo em vez do fenótipo (RAGIMEKULA et al., 2013).

O uso de marcadores moleculares para selecionar um loco alvo minimiza o arraste de ligação (*linkage drag*) e acelera a recuperação do genoma do genitor recorrente durante o retrocruzamento (ASHKANI et al., 2015).

Existem três níveis de seleção em que marcadores podem ser aplicados

no melhoramento por retrocruzamento. A cada ciclo de retrocruzamento, marcadores moleculares podem ser utilizados para identificar o genótipo com o caráter desejado (*foreground selection*), ou para acelerar a reconstrução do genótipo do genitor recorrente (*background selection*), e ainda para selecionar a progênie de retrocruzamento com o gene alvo com marcadores flanqueadores fortemente ligados a fim de minimizar o arraste de ligação (*recombinant selection*) (RAGIMEKULA et al., 2013).

Exemplos de retrocruzamento assistido por marcadores, visando à resistência a doenças em cereais, como cevada, arroz e trigo, podem ser encontrados em Collard & Mackil (2008). O retrocruzamento também pode ser utilizado para a transferência de mais de um gene simultaneamente. Um exemplo é o piramidamento de genes (ver item 4.3).

Para a piramidação de genes, vários cruzamentos são feitos e os híbridos F1 resultantes são cruzados entre si. A descendência deste cruzamento é novamente cruzada entre si e este processo é assim continuado até que os genes de interesse estejam combinados em um único genótipo. Desta forma, genes de resistência de várias fontes são combinados em cultivares individuais (HUSSAIN 2015).

Piramidar múltiplos genes de resistência através do melhoramento convencional é possível, mas extremamente difícil. Quando dois ou mais genes são introgrididos, com avaliação fenotípica convencional, não é possível distinguir com precisão o efeito individual de gene, uma vez que cada gene pode conferir resistência para múltiplas raças do patógeno. Além disso, na presença de um alelo dominante e um recessivo, o efeito do gene recessivo é mascarado (COLLARD; MACKILL 2008).

Com o uso de marcadores de DNA estreitamente associados a cada um dos genes de resistência é possível facilmente identificar as plantas com múltiplos genes, resultando em economia de tempo e recursos (SHANTI et al., 2010). Em teoria, MAS pode também ser utilizada para piramidação de genes de múltiplos genitores (ex: populações derivadas de múltiplos cruzamentos). Outra estratégia promissora para o desenvolvimento de resistência durável é a introgressão de resistência quantitativa controlada por QTLs (*quantitative trait loci*).

Fatores como o número de genes a ser transferido, a distância entre os genes alvo e marcadores flanqueadores, o número de genótipos selecionados em cada geração de melhoramento e a natureza do germoplasma são cruciais para obter sucesso na piramidação de genes de resistência (ASHKANI et al., 2015). Alguns exemplos de piramidação baseada em MAS em cereais podem ser encontrados em Collard & Mackil (2008).

Quando, através do retrocruzamento, os genes são transferidos independentemente para uma mesma cultivar recorrente, obtém-se linhagens quase isogênicas, cada uma contendo um gene diferente de resistência. Estes genes podem ser combinados em uma única cultivar (piramidamento), mas também podem ser mantidos em linhagens separadas, que serão plantadas em misturas, dando origem às multilinhas (ver item 4.4).

3.2 Melhoramento visando à resistência quantitativa

A resistência quantitativa é controlada por múltiplos genes de efeito menor na planta, promovendo resistência parcial ao patógeno e uma diminuição na severidade de sintomas e/ou no progresso das epidemias ao longo do tempo (St. CLAIR 2010).

Os métodos de melhoramento para resistência quantitativa não diferem dos demais métodos para outros caracteres agronômicos de herança quantitativa. O melhoramento é obtido através do acúmulo gradual de alelos favoráveis nos vários genes que controlam o caráter. Por ser controlado por muitos genes, qualquer método adotado prevê a seleção com baixa herdabilidade e com influência do ambiente, especialmente quando não há presença de genes maiores (CAMARGO 2011).

Para seleção em espécies alógamas, os métodos de seleção massal e de famílias são os mais utilizados visando a acumular genes de resistência. A seleção massal é o método de introdução mais simples, onde os indivíduos mais resistentes são selecionados e suas sementes são colhidas, misturadas, dando origem a uma nova população (AGRIOS 2005). O processo é repetido até alcançar o nível de resistência desejado. As plantas são selecionadas baseadas em suas reações individuais à doença. Para ocorrer progresso é necessário que o caráter ou gene de interesse esteja presente em alta

frequência, já que a seleção é feita apenas com base no fenótipo (CARVALHO et al., 2008). Na seleção de famílias (progênies), ao contrário, as plantas são selecionadas baseadas nas reações de suas progênies. As sementes de plantas cujas progênies mostraram-se mais resistentes são usadas no próximo ciclo de seleção.

Em espécies autógamas, os métodos de seleção mais utilizados para resistência quantitativa são o genealógico (*Pedigree*) e o populacional (*Bulk*).

No método genealógico, uma população F_2 é estabelecida e os melhores indivíduos são selecionados para os caracteres desejados, incluindo resistência a doenças. Estas plantas são autofecundadas, gerando famílias F_3 , que serão avaliadas no campo. A seleção, a partir desta geração, é feita tanto dentro de famílias, como entre famílias. As sementes selecionadas irão compor a geração F_4 . A seleção entre e dentro de famílias é repetida até que o nível de homozigose desejado seja obtido. Quanto aos tipos de seleção, nas gerações iniciais a seleção é com ênfase em caracteres qualitativos facilmente visualizados, enquanto nas gerações mais avançadas, à medida que aumenta a homozigose, a seleção tem ênfase em caracteres quantitativos (BORÉM; MIRANDA 2013).

O método populacional difere do genealógico, pois nenhuma seleção artificial é feita nas gerações segregantes iniciais e a colheita é realizada em *bulk*. Em gerações avançadas, quando a maioria das plantas está em homozigose, plantas individuais são selecionadas para resistência e as suas progênies avaliadas da mesma forma que no método genealógico (CARVALHO et al., 2008).

Dada à extensão e complexidade da seleção requerida, bem como o número e o tamanho de populações a serem avaliadas, marcadores moleculares podem ser utilizados em qualquer fase do programa de melhoramento. Consequentemente, MAS apresenta grande vantagem em gerações iniciais, porque plantas com combinações de genes indesejáveis, especialmente as que não apresentam genes de resistência, podem ser eliminadas. Plantas com genes ou QTLs de resistência são selecionadas e alelos podem ser fixados em homozigose, assim melhoristas podem focar em um menor número de linhas que apresentam a combinação de genes ou alelos desejados (COLLARD;

MACKILL 2008; RAGIMEKULA et al., 2013).

Ribaut & Betran (1999) propuseram o uso de MAS em gerações iniciais, F_2 ou F_3 , originadas de genitores elite, através de uma estratégia denominada “seleção única em larga escala”. Esta abordagem utiliza marcadores que flanqueiam até três QTLs. Estes QTLs devem explicar ampla proporção da variação fenotípica, além de serem estáveis em diferentes ambientes (COLLARD; MACKILL 2008).

Dentre as vantagens da seleção precoce assistida por marcadores está a que os alelos favoráveis dos QTLs de interesse são fixados nas gerações iniciais (F_2/F_3). Como a seleção ocorre somente nas regiões genômicas alvo, grande variação alélica ainda estará presente no restante do genoma dos genótipos selecionados, para ser explorada por seleção fenotípica. Além disso, alelos dos QTLs de maior efeito podem também ser utilizados na piramidação de genes (RIBAUT; BETRAN 1999).

4 ESTRATÉGIAS DE UTILIZAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA DE PLANTAS A DOENÇAS

Para retardar a evolução do patógeno, as estratégias de uso dos genes de resistência de plantas visando à resistência durável focam tanto no aumento da diversidade de genes, como de genótipos.

A disponibilidade de mais de uma fonte de resistência possibilita o uso de estratégias de implantação tanto em escala temporal quanto espacial. Dentre estas estratégias, destacam-se o uso do gene de resistência até a ruptura da resistência conferida e sua substituição por um novo gene de resistência (genes *R* individuais); a alternância periódica de diferentes genes de resistência no mesmo local (rotação de genes); a introgressão de vários genes de resistência na mesma planta (piramidação) e o uso de diferentes genes de resistência em diferentes genótipos no mesmo local (multilinhas ou mistura de cultivares) ou implantação em diferentes locais (diversificação espacial).

4.1 Um gene de cada vez (Genes *R* individuais)

Células de plantas mantêm constante vigilância contra patógenos através da expressão de uma ampla gama de genes *R*, os quais codificam proteínas capazes de detectar a presença de patógenos. Em muitos casos, um único gene *R* pode conferir resistência completa a uma ou mais raças de um patógeno, quando transferido para uma cultivar anteriormente suscetível. Por esta razão, genes *R* têm sido utilizados há décadas em programas de melhoramento visando à resistência de plantas a doenças (MCDOWELL; WOFFENDEN 2003).

Embora em um programa de melhoramento seja mais fácil manipular genes *R* individuais, a desvantagem está na vulnerabilidade a diferentes ou novas raças do patógeno. Análises epidemiológicas e de patogenicidade de patógenos para um grande número de culturas onde genes *R* individuais controlam doenças fúngicas, como para a ferrugem do colmo em trigo, a requeima em batata, o oídio em cevada e a canela-preta em canola, mostram uma tendência do uso desta estratégia em promover a proteção por um período limitado de tempo (BURDON et al., 2014). Porém, em ambientes em que a doença ocorre em severidade baixa à moderada um único gene de resistência pode ser adequado por um longo período de tempo, economizando recursos para melhoramento de resistência durável para doenças mais severas/ frequentes (MUNDT 2014).

Quando genes *R* são implantados individualmente em um ambiente onde uma população significativamente grande do patógeno é mantida pela presença de cultivares suscetíveis, sejam cultivares que não apresentam resistência, ou cultivares contendo genes de resistência que tenham sido previamente superados, e/ou hospedeiros alternativos, a proteção em longo prazo fornecida será determinada pelo produto do tamanho efetivo da população, a taxa de mutação do patógeno e a probabilidade de que um novo mutante sobreviva e aumente em frequência na população (BARRETT et al., 2008). Por outro lado, devido à forte seleção direcional que uma cultivar altamente resistente imprime na população do patógeno existente, levando à morte imediata de propágulos não infecciosos, um novo mutante capaz de infectar esta cultivar apresenta uma maior vantagem seletiva (BURDON et al., 2014).

4.2 Rotação de genes

Rotação de genes envolve a implantação de um gene de resistência efetiva, com a sua posterior substituição por um gene diferente após o aparecimento de uma raça virulenta do patógeno e, no futuro, a reutilização da resistência original após o declínio da frequência da correspondente raça virulenta (MUNDT 2014).

Mesmo que as rotações de genes sejam simplesmente restringidas a diferentes cultivares da mesma espécie (diferentes genes *R*), em algumas circunstâncias, esta estratégia resulta em níveis inferiores da doença, aumentando a longevidade de genes *R* específicos e apresenta alterações significativas na estrutura de população do patógeno (BURDON et al., 2014).

O princípio deste método é o mesmo da rotação de culturas. Neste caso, as cultivares que serão utilizadas na rotação possuem genes de resistência a diferentes raças do patógeno. É possível rotacionar genes *R* no tempo (cada ano ou dois anos realizar a troca do gene *R*) e no espaço (diferentes regiões de cultivo). A rotação de genes apresenta como principais dificuldades a logística necessária para monitorar a virulência de forma precisa, a concordância entre todos os agricultores para substituir cultivares, assim como a disponibilidade de sementes em quantidades adequadas para tal (MUNDT 2014).

4.3 Piramidação de genes

A piramidação de genes consiste na introgressão de múltiplos genes de resistência em um único genótipo de modo a diversificar a pressão de seleção sobre o patógeno. A piramidação pode ser estabelecida com a introdução de genes maiores e menores, genes específicos e não específicos, ou qualquer outro tipo de gene que confira resistência ao patógeno (BORÉM; MIRANDA 2013).

Os mecanismos pelo qual a piramidação aumenta a durabilidade da resistência não estão claros. O dogma padrão tem sido que, caso os genes de resistência não tenham sido previamente implantados individualmente ou em combinações menos complexas, a probabilidade de um patógeno

assexuado sofrer mutação para virulência contra todos os genes de resistência piramidados seria o produto das probabilidades para cada gene individualmente, assim a probabilidade de surgimento de uma super-raça virulenta seria baixa (MUNDT 2014).

Teoricamente, múltiplos genes *R* apresentariam maiores obstáculos na evolução do patógeno. No entanto, a extensão com que isto ocorre dependerá, entre outros fatores, do tamanho efetivo da população do patógeno e da frequência de mutação dos genes envolvidos (BURDON et al., 2014).

4.4 Multilinhas

Multilinhas são uma mistura, em proporções previamente estabelecidas, de isolinhas (linhagens quase isogênicas), as quais diferem entre si por possuírem diferentes genes de resistência vertical (genes *R*) a determinado patógeno.

As isolinhas são obtidas através do método de retrocruzamento, sendo que cada isolinha recebe genes de resistência a uma ou algumas raças predominantes do patógeno. Estas isolinhas são então misturadas (*bulk*) e a linha resultante é denominada multilinha (HUSSAIN 2015), resultando assim em um mosaico que previne a cultura de adquirir um único isolado patogênico predominante (FAWKE et al., 2015).

Para que a diversidade seja funcional, deve haver uma correspondência adequada entre os genes de resistência incorporados em multilinhas e os genes de avirulência presentes na população do patógeno alvo. Assim, uma matriz de genótipos do hospedeiro e patógeno é geralmente considerada, numa tentativa de minimizar a porcentagem da população do hospedeiro para a qual uma determinada raça será virulenta (MUNDT 2002).

As multilinhas foram sugeridas como uma alternativa para minimização das perdas decorrentes de doenças causadas por patógenos que apresentam raças, cuja prevalência se modifica de ano para ano. Nas multilinhas as plantas resistentes à determinada raça se constituem em uma barreira para a dispersão de esporos das plantas suscetíveis. Apesar das plantas suscetíveis serem infectadas, há uma diminuição na concentração e dispersão dos esporos. Isto atrasa o desenvolvimento da epidemia e faz com

que os prejuízos com a doença sejam diminuídos.

Os melhoristas têm desenvolvido muitas cultivares através deste método, como, por exemplo, o desenvolvimento de multilinhas para resistência à brusone no arroz (ASHKANI et al., 2015). Além disso, o melhoramento de multilinhas tem sido relatado como promissor para o desenvolvimento de resistência horizontal (MUNDT 2014).

4.5 Mistura de cultivares

Mistura de cultivares refere-se a uma mistura espacial homogênea de diferentes genótipos de uma cultura no campo, com um princípio similar às multilinhas, visando à diminuição potencial do inóculo e constituindo uma barreira para dispersão do patógeno.

A maior dificuldade no uso de misturas é encontrar uma adequada combinação de cultivares, com ciclo, estágio de desenvolvimento, tratos culturais e caracteres agrônômicos semelhantes, que permita seu plantio conjunto (CAMARGO 2011).

Em geral há uma maior adesão em favor de mistura de cultivares do que uso de multilinhas (MUNDT 2002). A mistura de cultivares apresenta vantagem de não necessitar esforço adicional de melhoramento, permitindo a incorporação de cultivares agronomicamente superiores assim que estas estejam disponíveis.

4.6 Diversificação espacial de genes de resistência

A estratégia de diversificação espacial de genes de resistência promove a diversidade entre campos de cultivo e não dentro de campos, como é o caso das misturas. Segundo esta estratégia, o plantio de cultivares contendo diferentes genes de resistência segue um padrão planejado de distribuição geográfica (CAMARGO 2011).

A implantação regional de genes de resistência é recomendada como meio de controle para agentes patogênicos que se dispersam em escala continental durante um ciclo de cultivo, como é o caso da ferrugem de cereais nos Estados Unidos, assim como de oídio em cevada e da requeima em batata, na Europa (BURDON et al., 2014).

5 ENGENHARIA GENÉTICA VISANDO À RESISTÊNCIA DE PLANTAS A DOENÇAS

Nas últimas décadas, os avanços obtidos na área da engenharia genética foram significativos. Desde o desenvolvimento da primeira geração de plantas geneticamente modificadas (plantas transgênicas) até, mais recentemente, a automação do sequenciamento, um novo horizonte se abre com grande potencial para desenvolvimento de plantas resistentes a doenças. Genomas inteiros, tanto de plantas, quanto de patógenos, são sequenciados a um baixo custo e em curto período de tempo. Estratégias genômicas, como a identificação de efetores conservados no patógeno, assim como dos genes *R* do hospedeiro ativados por estes efetores, têm sido possíveis (DANGL et al., 2013). Através do conhecimento do modo de herança e do controle genético de caracteres desejáveis ou indesejáveis, melhoristas têm conseguido manipular com precisão o gene que codifica o caráter, criando novos fenótipos através do uso de tecnologias de DNA recombinante, assim como o uso de ferramentas de edição do genoma, pela alteração direcionada e precisa do DNA, tem revolucionado o melhoramento genético de plantas.

5.1 Transgenia

A transgenia permite a inserção de genes de espécies não relacionadas em um hospedeiro de interesse. Métodos de transgenia podem transferir múltiplos genes simultaneamente, sem o problema do arraste de ligação (*linkage drag*). Além disso, a transgenia possibilita a transferência de uma pirâmide de genes de uma cultivar elite para outra de forma direta (WULFF et al., 2011).

Através da transgenia, melhoristas podem manipular com precisão o gene que codifica um caráter de interesse através da tecnologia do DNA recombinante. Os principais métodos utilizados para transformação de plantas são: transformação via *Agrobacterium*, bombardeamento de partículas e eletroporação de protoplastos (XIONG et al., 2015).

Atualmente, três estratégias principais de transgenia são utilizadas visando ao controle de doenças: a) uso de genes que interfiram na fisiologia

do patógeno, inibindo sua patogenicidade; b) transferência de genes *R* envolvidos no reconhecimento do patógeno; c) transferência de genes do próprio patógeno que, uma vez expressos, ativam o sistema de defesa da planta (CAMARGO 2011).

A clonagem de genes *R* tem permitido a transferência de genes *R* funcionais entre espécies sexualmente incompatíveis. Em geral, a maioria tende a funcionar em espécies pertencentes à mesma família de origem, como é o caso do gene *Bs2* em pimenta (*Capsicum annuum*), que confere resistência efetiva a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, agente causal da mancha bacteriana em tomate. A maioria dos exemplos funcionais de transferência de genes, disponíveis na literatura, são da família *Solanaceae* (WULFF et al., 2011).

A transferência de genes *R* entre plantas sexualmente incompatíveis por meio de transgenia tem sido proposta como uma alternativa de obter resistência durável a patógenos. Esta abordagem permite que diferentes alelos do gene *R* sejam combinados em pirâmide (*stacks*). No entanto, a transferência de genes *R* entre espécies sexualmente incompatíveis pode apresentar alguns problemas. A maioria dos genes *R* efetivamente expressos na espécie doadora é perdida no receptor devido à supressão do gene *R* (BOYD et al., 2013). Estudos utilizando transgenia para transferência de genes *R* revelaram reações de defesa desencadeadas por genes *R* na ausência do patógeno ou aumento específico de suscetibilidade a outros patógenos (WULFF et al., 2011). Genes *R* provavelmente necessitam de genes adicionais para desencadear a sua função, como os que atuam no modelo guarda, os quais não são encontrados na espécie receptora (BOYD et al., 2013).

Outro exemplo do uso de transgenia visando à resistência é o feijão geneticamente modificado desenvolvido pela Embrapa, que é resistente ao vírus do mosaico dourado (*Bean golden mosaic virus*), um grande problema da cultura no Brasil e na América do Sul. Em linhas gerais, a planta foi geneticamente modificada para que produzisse pequenos fragmentos de RNA, chamados de RNAi (RNA interferente), responsáveis pela ativação de seu mecanismo de defesa contra o vírus do mosaico dourado. Além disso,

os fragmentos de RNA podem causar resistência a várias estirpes do mesmo vírus (BONFIM et al., 2007; ARAGÃO et al., 2013).

5.2 Cisgenia e Intragenia

Uma das principais preocupações em relação ao uso de cultivares transgênicas se refere à transferência de genes entre espécies não relacionadas, ou até mesmo microorganismos. Visando a atender a esta preocupação, o desenvolvimento da cisgenia e da intragenia surgem como alternativas à transgenia.

A cisgenia e a intragenia se baseiam no uso exclusivo de sequências de DNA da mesma espécie ou de espécies sexualmente compatíveis (HOLME et al., 2013). No caso da cisgenia, o gene inserido é uma cópia completa do DNA de um gene natural, contendo seus *introns* e regiões regulatórias como o promotor e terminador nativos, na orientação *sense* (SCHOUTEN et al., 2006; SCHOUTEN; JACOBSEN 2008). Já na intragenia, novas composições são feitas isolando sequências codificadoras e regulatórias específicas, as quais são rearranjadas *in vitro* e esta nova combinação inserida na planta, na orientação *sense* ou *antisense*, nesta última se o objetivo for o silenciamento gênico através de RNAi (ROMMENS et al., 2007; CARDI 2016).

O *pool* gênico explorado tanto pela cisgenia quanto pela intragenia é o mesmo disponível para o melhoramento genético tradicional (HOLME et al., 2013). No entanto, alguns autores defendem que a cisgenia pode ser considerada mais próxima do melhoramento tradicional em comparação com a intragenia, uma vez que cultivares cisgênicas não possuem genes ou caracteres diferentes dos já disponíveis no germoplasma para uso no melhoramento genético tradicional. Já “intragenes” são novas combinações de partes funcionais de genes deste *pool* gênico, as quais não ocorrem naturalmente ou como resultado de hibridação (SCHOUTEN; JACOBSEN 2008).

Culturas comercialmente difundidas através da propagação vegetativa (clones), a exemplo da batata, macieira, morangueiro e videira, apresentam grande dificuldade para transferência de genes através de métodos clássicos devido à elevada heterozigose e estão entre as primeiras culturas a utilizarem

abordagens cisgênicas/intragênicas com o objetivo de desenvolver plantas com maior resistência a patógenos (HOLME et al. 2013).

Plantas de batata cisgênicas (*Solanum tuberosum*) expressando os genes de resistência introduzidos a partir de *S. venturii* e *S. stoloniferum* apresentaram resistência de amplo espectro a *Phytophthora infestans* (JO et al. 2014).

Em macieira, foram desenvolvidas plantas cisgênicas visando à resistência a *Venturia inaequalis*, agente causal da sarna da macieira. A cultivar Gala foi geneticamente modificada através da inserção do gene de resistência *Rvi6* derivado da cultivar Florina e originalmente encontrado no acesso silvestre (clone 821) de *Malus floribunda*, conferindo resistência à sarna da macieira (VANBLAERE et al., 2011; VANBLAERE et al., 2014). Em outro estudo, foram desenvolvidas linhagens intragênicas de macieira resistentes à sarna, utilizando o gene *HcrVf2*, combinado com sequências regulatórias do gene da Rubisco, ao invés de utilizar o promotor e terminador nativos do gene *HcrVf2* e são, portanto, referidos como intragenes (JOSHI et al., 2011). Ainda em macieira, foram desenvolvidas plantas cisgênicas com resistência para a queima bacteriana das rosáceas, causada por *Erwinia amylovora* (KOST et al., 2015).

Em arroz, melhoristas e fitopatologistas têm iniciado o desenvolvimento de linhagens resistentes à brusone (*Magnaporthe oryzae*) através de cisgenia (DELWAIDE et al., 2015).

Mesmo com as inúmeras vantagens do uso de cisgenia/intragenia para o desenvolvimento de plantas com maior resistência a patógenos, o desenvolvimento e comercialização de cultivares cisgênicas/intragênicas, assim como das transgênicas, ainda dependem em grande parte da aceitação do consumidor.

5.3 Edição Genômica

Tecnologias de edição genômica ou edição de genes podem acelerar o melhoramento genético de plantas através da introdução de mutações sítio-específicas em genes de interesse. Desta forma, a edição genômica tem permitido modular a resistência de plantas a patógenos, modificando

componentes importantes, envolvidos no sistema de defesa da planta (ANDOLFO et al., 2016).

A edição genômica é baseada na quebra da dupla fita de DNA (*double-strand breaks* - DSBs) em um loco predeterminado, utilizando nucleases artificiais que reconhecem sequências genômicas específicas (HUANG et al., 2016).

A quebra da dupla fita de DNA, conseqüentemente, estimula os mecanismos celulares de reparo, incluindo reparo por união de extremidades não homólogas (*non-homologous end joining* – NHEJ) e recombinação homóloga (*homologous recombination* – HR), os quais podem acumular diferentes modificações no genoma (XIONG et al., 2015). Após a quebra da dupla fita de DNA e na ausência de sequências de DNA exógeno, ambas as extremidades tendem a se ligar novamente através do reparo NHEJ. Porém, como este processo é propenso a erros, frequentemente acontecem pequenas inserções e deleções (*indels*) que podem resultar em mutações na sequência de leitura quando ocorrem na região codificante do gene e, conseqüentemente, em perda de função ou silenciamento gênico (*knockout*). Quando fragmentos de DNA homólogos à sequência alvo são inseridos dentro da célula, o mecanismo de reparo por recombinação homóloga pode substituir alguns nucleotídeos na sequência do gene a ser modificado, ou inserir novos genes ou elementos regulatórios em posição predeterminada do genoma (BORTESI; FISCHER 2015; CARDI 2016).

Nucleases artificiais como ZFNs (*zinc finger nucleases*) e TALENs (*transcription activator-like effector nucleases*) podem ser criadas para reconhecer e clivar a dupla fita de DNA em locais específicos no genoma (LLOYD et al., 2005; CHRISTIAN et al., 2010). Mais recentemente, uma nova tecnologia de edição genômica, denominada CRISPR/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat - associated protein9*) foi desenvolvida utilizando como base o sistema imune adaptativo tipo II descoberto em bactérias. CRISPR/Cas9 utiliza uma pequena sequência de RNA (gRNA) para guiar a nuclease Cas9 até a sequência específica de DNA a ser clivada (DNA-alvo), resultando em modificações no gene (BELHAJ et al., 2013).

CRISPR/Cas9 apresenta inúmeras vantagens em termos de simplicidade, eficiência, versatilidade e custo (BELHAJ et al., 2015; MA et al., 2016; NEJAT et al., 2016). Diferentemente de ZFNs e TALENs, onde a especificidade é determinada pela interação proteína-DNA, o sistema CRISPR/Cas9 identifica sequências de DNA-alvo através do pareamento de bases com o gRNA (BORTESI; FISCHER 2015). Além disso, CRISPR/Cas9 permite a introdução simultânea de DSBs em múltiplos sítios, possibilitando a edição de vários genes ao mesmo tempo (LI et al., 2013; XING et al., 2014). A edição multiplex com CRISPR/Cas9 requer apenas a modificação da sequência de nucleotídeos do gRNA, sequências estas sintetizadas em complementaridade aos genes de interesse e, desta forma, múltiplos gRNAs podem ser testados para cada gene alvo de uma forma simples e rápida. Já ZFNs e TALENs requerem proteínas “engenheiradas” separadamente para cada sítio alvo específico, tornando o processo oneroso e muitas vezes inviável (BORTESI; FISCHER 2015).

Tecnologias de edição genômica vêm sendo utilizadas com sucesso em diversas espécies vegetais. Genes que conferem suscetibilidade ao hospedeiro têm sido manipulados a fim de promover resistência a patógenos (ANDOLFO et al., 2016). As tecnologias de edição genômica TALEN e CRISPR/Cas9 foram ambas utilizadas em trigo hexaplóide para introduzir mutações simultâneas nos três alelos homólogos que codificam proteínas *MLO*, as quais são responsáveis por reprimir as defesas da planta contra oídio. A modificação (*knockout*) das três cópias *MLO* na mesma planta conferiu resistência herdável de amplo espectro à *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (WANG et al., 2014).

Em arroz, plantas que superexpressam o gene *OsERF922*, fator de transcrição envolvido na rota do etileno, apresentam redução na expressão de genes relacionados à defesa e aumento da suscetibilidade a *Magnaporthe oryzae* (LIU et al., 2012). Uma mutação específica no gene *OsERF922* via CRISPR/Cas9 causou a supressão de fatores de resposta ao etileno (ERF) e foi efetiva para o aumento da resistência a brusone em arroz (WANG et al., 2016).

A possibilidade de editar genes do patógeno também foi comprovada,

através da edição do gene efetor *Avr4/6* secretado por *Phytophthora sojae*. A interrupção do gene, ou substituição do gene efetor através dos mecanismos de reparo de DSBs induzidos por Cas9, contribuiu para o reconhecimento de *Avr4/6* pelos genes *R* da soja, ativando os mecanismos de defesa da planta (FANG; TYLER 2016).

Um sítio de reconhecimento do patógeno não funcional pode ser modificado através de tecnologias de edição genômica, obtendo um gene *R* sintético funcional. Além disso, outro potencial uso da edição de genes consiste em explorar a combinação de vários sítios de reconhecimento do patógeno de diferentes genes *R* em um único novo gene *R*, capaz de ativar resistência a efetores conservados do patógeno e/ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (ANDOLFO et al., 2016). Desta forma, tecnologias de edição genômica marcam o início de uma nova era, visando a fortalecer o sistema de defesa da planta e aumentar a resistência a fitopatógenos diversos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os rápidos avanços na área da genômica estão revolucionando as formas como a resistência de plantas a doenças pode ser manipulada em programas de melhoramento genético. Estas possibilidades fortalecem ainda mais a necessidade de ampliar o conhecimento sobre os princípios evolucionários do patógeno às estratégias de implantação, com foco no aumento da diversidade de genes ou no aumento da diversidade de genótipos, em diferentes contextos espaciais e temporais, visando retardar a evolução do patógeno.

Progresso no melhoramento de plantas para resistência a doenças pode ser relativamente rápido quando o melhoramento para resistência for o principal objetivo. No entanto, resistência de plantas a doenças é um dos vários objetivos do melhoramento, que de outro lado necessita de níveis aceitáveis de produtividade, adaptação, qualidade e outros caracteres agrônômicos favoráveis.

É necessário ressaltar que os vários métodos de melhoramento

disponíveis para o desenvolvimento de cultivares resistentes apresentam benefícios e limitações, e a escolha do método mais adequado irá depender, entre outros fatores, do tipo de planta, do patógeno, assim como dos recursos disponíveis. Métodos tradicionais fornecerão a base de genótipos que contêm importantes combinações de caracteres enquanto a engenharia genética auxiliará na transferência ou manipulação dos genes de interesse, de forma mais precisa.

Como perspectivas futuras, o melhoramento de plantas para resistência a doenças deve considerar duas abordagens principais que são igualmente válidas e complementares. A primeira centra-se na identificação de PAMPs e efetores que são conservados no patógeno e essenciais para a sua sobrevivência. Os genes de plantas que reconhecem estas moléculas conservadas, teoricamente têm uma maior possibilidade de permanecer eficazes ao longo do tempo, devido às limitações evolutivas sobre o patógeno. A segunda abordagem está relacionada à planta. Estudos têm mostrado que muitos QTLs que conferem resistência parcial e muitas vezes durável codificam genes diretamente envolvidos na resistência. Através da clonagem destes QTLs é possível determinar os mecanismos de resistência e, assim, acumular genes de resistência com mecanismos diferentes e contrastantes que podem ser utilizados em conjunto visando à resistência durável.

Por fim, a diminuição dos custos do sequenciamento de genomas e a variabilidade genética presente no germoplasma, extensivamente manipulado por melhoristas de plantas por mais de um século, encontram agora novos meios para o desenvolvimento de resistência durável através da identificação e edição de genes, visando reduzir a infecção por patógenos e o desenvolvimento de sintomas. Embora os desafios sejam grandes, as perspectivas de sucesso são ainda maiores.

REFERÊNCIAS

ACEVEDO-GARCIA, J.; KUSCH, S.; PANSTRUGA, R. Magical mystery tour: MLO proteins in plant immunity and beyond. *New Phytologist*, v. 204, p. 273-281, 2014.

- AGRIOS, G. N. Plant pathology. 5. Ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005, 922 p.
- ALLARD, R. W. Principles of plant breeding. New York: J. Wiley, 1999. 254 p.
- ANDOLFO, G. et al. Genome-editing technologies for enhancing plant disease resistance. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, p. 1813, 2016.
- ARAGÃO, F. J. L. et al. Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the *Bean golden mosaic virus*. *Journal of Biotechnology*, v. 166, p. 42-50, 2013.
- ASHKANI, S. et al. Molecular breeding strategy and challenges towards improvement of blast disease resistance in rice crop. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, p. 886, 2015.
- AYLIFFE, M.; SINGH, R.; LAGUDAH, E. Durable resistance to wheat stem rust needed. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 11, p.187-192, 2008.
- BAJGAIN, P. et al. Association mapping of North American spring wheat breeding germplasm reveals loci conferring resistance to Ug99 and other African stem rust races. *BMC Plant Biology*, v. 15, p. 249, 2015.
- BARRETT, L. G. et al. Life history determines genetic structure and evolutionary potential of host-parasite interactions. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 23, p. 678-685, 2008.
- BELHAJ, K. et al. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods*, v. 9, p. 39, 2013.
- BELHAJ, K. et al. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 32, p. 76-84, 2015.
- BONFIM, K. et al. RNAi-Mediated resistance to *bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 20, n. 6, p. 717-726, 2007.

- BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. Challenges for plant breeding to develop biotic-resistant cultivars. In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. Plant breeding for biotic stress resistance. Berlin - Heidelberg: Springer-Verlag, 2012. p. 1-11.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. B. V. Melhoramento de plantas. 6. ed. rev. ampl. Viçosa: UFV, 2013. 523 p.
- BORTESI, L.; FISCHER, R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, v. 33, p. 41-52, 2015.
- BOYD, L. A. et al. Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends in Genetics*, v. 29, n. 4, p. 233-240, 2013.
- BROWN, J. K. M. Durable resistance of crops to disease: a Darwinian perspective. *Annual Review of Phytopathology*, v. 53, p. 513-539, 2015.
- BUENO, L. C. de S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. Melhoramento genético de plantas: princípios e procedimentos. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. 319 p.
- BURDON, J. J. et al. Guiding deployment of resistance in cereals using evolutionary principles. *Evolutionary Applications*, v. 7, p. 609-624, 2014.
- BUTLER, D. Fungus threatens top banana. *Nature*, v. 504, p. 195-196, 2013.
- CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M. Melhoramento genético de plantas visando resistência a doenças. In: ZAMBOLIM, E. M.; JESUS JUNIOR, W. C.; RODRIGUES, F. A (eds.). O essencial da fitopatologia: controle genético de plantas. Viçosa: Suprema, 2014. p. 553-576.
- CAMARGO, L. E. A. Controle genético. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 4. ed. Volume 1 Piracicaba: Ceres, 2011. p. 325-341.
- CARDI, T. Cisgenesis and genome editing: combining concepts and efforts for a smarter use of genetic resources in crop breeding. *Plant Breeding*, v. 135, p. 139–147, 2016.

- CARVALHO, F. I. F. et al. *Condução de populações no melhoramento genético de plantas*. 2.ed. rev. e ampl. Pelotas: UFPel Editora Universitária, 2008. 288 p.
- CHANG, H. X. et al. Characterization of disease resistance loci in the USDA soybean germplasm collection using genome-wide association studies. *Phytopathology*, v. 106, n. 10, p. 1139-1151, 2016.
- CHRISTIAN, M. et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, v. 186, p. 757-761, 2010.
- CIMMYT. International Maize and Wheat Improvement Center. Wild wheat relatives help boost genetic diversity. Mexico: CIMMYT, 2004.
- COLLARD, B. C. Y.; MACKILL, D. J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, v. 363, p. 557-572, 2008.
- CROLL, D. et al. The impact of recombination hotspots on genome evolution of a fungal plant pathogen. *Genetics*, v. 201, p. 1213-1228, 2015.
- DANGL, J. L.; HORVATH, D. M.; STASKAWICZ, B. J. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*, v. 341, p. 746-751, 2013.
- DELWAIDE, A. et al. Revisiting GMOs: Are there differences in European consumers' acceptance and valuation for cisgenically vs transgenically bred rice?. *Plos One*, v. 10, n. 5, p. e0126060, 2015.
- DILLA-ERMITA, C. J. et al. Genome-wide association analysis tracks bacterial leaf blight resistance loci in rice diverse germplasm. *Rice*, v. 10, p. 8, 2017.
- DING, J. et al. Genome-wide association mapping reveals novel sources of resistance to northern corn leaf blight in maize. *BMC Plant Biology*, v. 15, p. 206, 2015.
- FANG, Y.; TYLER, B. Efficient disruption and replacement of an effector

gene in the oomycete *Phytophthora sojae* using CRISPR/Cas9. *Molecular Plant Pathology*, v. 17, n. 1, p. 127-139, 2016.

FAO. The state of food security in the world: addressing food insecurity in protracted crises, food and agriculture organization of the United Nations. Rome: FAO, 2010.

FAROKHZADEH, S.; ALIFAKHERI, B. Marker-assisted selection for disease resistance: applications in breeding (Review). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, v. 7, n. 14, p. 1392-1405, 2014.

FAWKE, S.; DOUMANE, M.; SCHORNACK, S. Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 79, n. 3, p. 263-280, 2015.

FERREIRA, M. E.; RANGEL, P. H. N. Aporte biotecnológico ao pré-melhoramento vegetal. In: LOPES, M. A.; FÁVERO, A. P.; FERREIRA, M. A. J. F.; FALEIRO, F. G.; FOLLE, S. M.; GUIMARÃES, E. P. Pré-melhoramento de plantas: estado da arte e experiências de sucesso. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. p. 59-84.

FEUILLET, C.; LANGRIDGE, P.; WAUGH, R. Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends in Genetics*, v. 24, n. 1, p. 24-32, 2008.

FISHER, M. C. et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, v. 484, 2012.

GOODWIN, S. B.; COHEN, B. A.; FRY, W. A. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 91, p. 11591-11595, 1994.

GUNDUZ, I. et al. Genetic and phenotypic analysis of Soybean mosaic virus resistance in PI 88788 soybean. *Phytopathology*, v. 94, p. 687-692, 2004.

HOLME, I. B.; WENDT, T.; HOLM, P. B. Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnology Journal*, v. 11, p. 395-407, 2013.

- HUANG, S.; WEIGEL, D.; BEACHY, R.; LI, J. A proposed regulatory framework for genome-edited crops. *Nature Genetics*, v. 48, n. 2, p. 109-111, 2016.
- HUSSAIN, B. Modernization in plant breeding approaches for improving biotic stress resistance in crop plants. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, v. 39, p. 515-530, 2015.
- JO, K. et al. Development of late blight resistant potatoes by cisgene stacking. *BMC Biotechnology*, v. 14, p. 50, 2014.
- JORGENSEN, I. H. Discovery, characterization and exploitation of *Mlo* powdery mildew resistance in barley. *Euphytica*, v. 63, p. 141-152, 1992.
- JOSHI, S. G. et al. Functional analysis and expression profiling of *HcrVf1* and *HcrVf2* for development of scab resistant cisgenic and intragenic apples. *Plant Molecular Biology*, v. 75, p. 579-591, 2011.
- KOST, T. D. et al. Development of the first cisgenic apple with increased resistance to fire blight. *Plos One*, v. 10, n. 12, p. e0143980, 2015.
- KUMUDINI, S. et al. Mechanisms involved in soybean rust-induced yield reduction. *Crop Science, Madison*, v. 48, p. 2334-2342, 2008.
- LANGENBACH, C. et al. Fighting Asian soybean rust. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, 2016.
- LI, J. et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*, v. 31, n. 8, p. 688-691, 2013.
- LINDE, C. C. Population genetic analyses of plant pathogens: new challenges and opportunities. *Australasian Plant Pathology*, v. 39, p. 23-28, 2010.
- LIU, D. et al. The rice ERF transcription factor *OsERF922* negatively regulates resistance to *Magnaporthe oryzae* and salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, v. 63, p. 3899-3911, 2012.

- LLOYD, A. et al. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of United State of America, v. 102, p. 2232-2237, 2005.
- LOPES, C. A.; BOITEUX, L. S. Breeding for resistance bacterial diseases. In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. Plant breeding for biotic stress resistance. Berlin – Heidelberg: Springer-Verlag, 2012. p. 37-55.
- MA, X. et al. CRISPR/Cas9 Platforms for genome editing in plants: developments and applications. Molecular Plant, v. 9, p. 961-974, 2016.
- McDOWELL, J. M.; WOFFENDEN, B. J. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. Trends in Biotechnology, v. 21, p. 178-183, 2003.
- McDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. Annual Review of Phytopathology, v. 40, p. 349-379, 2002a.
- McDONALD, B. A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. Euphytica, v. 124, p. 163-180, 2002b.
- McDONALD, B. A. Using dynamic diversity to achieve durable disease resistance in agricultural ecosystems. Tropical Plant Pathology, v. 39, p. 191-196, 2014.
- MITCHUM, M. G. Soybean resistance to the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*: an update. Phytopathology, v. 106, p. 1444-1450, 2016.
- MUNDT, C. C. Durable resistance: a key to sustainable management of pathogens and pests. Infection, Genetics and Evolution, v. 27, p. 446-455, 2014.
- MUNDT, C. C. Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management. Annual Review of Phytopathology, v. 40, p. 381-410, 2002.

- NEJAT, N. et al. Plant-pathogen interactions: toward development of next generation disease-resistant plants. *Critical Reviews in Biotechnology*, p. 1-9, 2016.
- OLUKOLU, B. A. et al. Genome-wide association study for partial resistance to maize common rust. *Phytopathology*, v. 106, p. 745-751, 2016.
- PALLOIX, A.; AYME, V.; MOURY, B. Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytologist*, v. 183, p. 190-199, 2009.
- PEREIRA, A. et al. Breeding for fungus resistance. In: FRITSCHENETO, R.; BORÉM, A. *Plant breeding for biotic stress resistance*. Berlin – Heidelberg: Springer-Verlag, 2012. p. 13-35.
- RABOIN, L. M. et al. Association mapping of resistance to rice blast in upland field conditions. *Rice*, v. 9, p. 59, 2016.
- RAGIMEKULA, N. et al. Marker assisted selection in disease resistance breeding. *Journal of Plant Breeding and Genetics*, v. 1, p. 90-109, 2013.
- RIBAUT, J. M.; BETRÁN, J. Single large-scale marker-assisted selection (SLS–MAS). *Molecular Breeding*, v. 5, p. 531-541, 1999.
- ROMMENS, C. M. et al. The intragenic approach as a new extension to traditional plant breeding. *Trends in Plant Science*, v. 12, p. 397-403, 2007.
- SCHOUTEN, H. J.; JACOBSEN, E. Cisgenesis and intragenesis, sisters in innovative plant breeding. *Trends in Plant Science*, v. 13, p. 260-261, 2008.
- SCHOUTEN, H. J.; KRENS, F. A.; JACOBSEN, E. Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. *EMBO reports*, v. 7, p. 750-753, 2006.
- SHANTI, M. L. et al. Marker-Assisted breeding for resistance to bacterial leaf blight in popular cultivar and parental lines of hybrid rice. *Journal of Plant Pathology*, v. 92, p. 495-501, 2010.

- SINGH, R. P. et al. Emergence and spread of new races of wheat stem rust fungus: continued threat to food security and prospects of genetic control. *Phytopathology*, v. 105, p. 872-884, 2015.
- ST.CLAIR, D. A. Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. *Annual Review of Phytopathology*, v. 48, p. 247-68, 2010.
- STUKENBROCK, E. H.; McDONALD, B. A. The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annual Review of Phytopathology*, v. 46, p. 75-100, 2008.
- VANBLAERE, T. et al. The development of a cisgenic apple plant. *Journal of Biotechnology*, v. 154, p. 304-311, 2011.
- VANBLAERE, T. et al. Molecular characterization of cisgenic lines of apple 'Gala' carrying the *Rvi6* scab resistance gene. *Plant Biotechnology Journal*, v. 12, p. 2-9, 2014.
- WANG, Y. et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology*, v. 32, p. 947-952, 2014.
- WANG, F. et al. Enhanced rice blast resistance by CRISPR/ Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene *OsERF922*. *Plos One*, v. 11, p. e0154027, 2016.
- WULFF, B. B. H.; HORVATH, D. M.; WARD, E. R. Improving immunity in crops: new tactics in an old game. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 14, p. 468-476, 2011.
- XING, H. et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology*, v. 14, p. 327, 2014.
- XIONG, J.; DING, J.; LI, Y. Genome-editing technologies and their potential application in horticultural crop breeding. *Horticulture Research*, v. 2, n. 15019, 2015.

YU, L. et al. Association mapping and gene-gene interaction for stem rust resistance in CIMMYT spring wheat germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 123, p. 1257-1268, 2011.

ZHAN, J. Population genetics of plant pathogens. *Encyclopedia of Life Sciences*, p. 1-7, 2016.

ZHAN, J. et al. Playing on a pathogen's weakness: using evolution to guide sustainable plant disease control strategies. *Annual Review of Phytopathology*, v. 53, p. 19-43, 2015.