

ÍNDICE

INTEGRAÇÃO DE TÉCNICAS CONVENCIONAIS E MOLECULARES NO MELHORAMENTO GENÉTICO DE HORTALIÇAS

Dr. Leonardo Silva Boiteux
Dra. Maria Esther de Noronha Fonseca
Embrapa Hortaliças

Introdução

A revolução da ciência genômica observada nos últimos 15 anos ampliou o conhecimento sobre a estrutura genética de diversas espécies de plantas (THRO *et al.*, 2004). O principal resultado destes avanços foi o desenvolvimento de uma ampla plataforma de recursos para a análise de genomas vegetais, incluindo modernas ferramentas de sequenciamento, bioinformática e vetores para clonagem de grandes fragmentos cromossômicos (ORTIZ, 1998; THRO *et al.*, 2004). Estes desenvolvimentos culminaram com a elucidação completa dos genomas nucleares de duas espécies modelos: uma dicotiledônea (*Arabidopsis thaliana*, família Brassicaceae) e uma monocotiledônea (*Oryza sativa*, família Poaceae) (GOFF *et al.*, 2002). Toda esta informação, associada a sistemas de marcadores e a técnicas para análise em larga escala de transcritos, proteínas, mutantes naturais, insercionais e químicos, tem permitido definir melhor a função dos genes e, principalmente, a associação destes genes e suas variantes alélicas com fenótipos de interesse (THRO *et al.*, 2004). Estas ferramentas não só auxiliam o melhoramento genético convencional na identificação de genes e/ou marcadores moleculares associados com diversas características de interesse, mas servem também como fontes de genes para mobilização em sistemas de transformação genética de plantas (“transgenia”).

Diversas técnicas moleculares foram apresentadas como potenciais ferramentas para aumentar a eficiência dos programas de melhoramento clássico, acelerando o ritmo de liberação de cultivares convencionais e/ou transgênicos com características qualitativas e quantitativas de interesse. De fato, este conjunto de técnicas vem paulatinamente aumentando sua importância nos programas de melhoramento e contribuindo para estabelecer sistemas ainda mais criteriosos para a produção de sementes de hortaliças com níveis mais elevados de qualidade sanitária e genética. Uma questão central ainda permanece: a relação custo/benefício é favorável ou ainda não é competitiva? Este questionamento é feito, especialmente, em situações onde a seleção fenotípica pode, isoladamente, proporcionar ganhos genéticos consideráveis. Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo ilustrar exemplos onde a integração da genômica com os métodos tradicionais de melhoramento tem se mostrado vantajosa e quais os níveis de impacto em programas de melhoramento genético de hortaliças.

Entres os principais exemplos da integração entre melhoramento clássico e estratégias moleculares no melhoramento cita-se:

1. Determinação de pureza genética de cultivares e identificação de misturas físicas de sementes e de materiais de propagação vegetativa;
2. Estabelecimento de sistemas de caracterização molecular (“fingerprinting”) que podem subsidiar e/ou fornecer amparo legal para proteção de cultivares;
3. Organização de germoplasma permitindo identificar duplicatas e/ou selecionar acessos mais representativos em termos de variabilidade genética dentro das coleções (“core collections”);
4. Determinação de potenciais grupos heteróticos e predição de heterose de acordo com a estimativa das distâncias genéticas entre acessos de germoplasma e de cultivares elites;
5. Diagnose molecular de fitopatógenos de importância econômica e/ou associados com sementes permitindo aumentar a qualidade sanitária de lotes comerciais;
6. Caracterização de variabilidade de patógenos permitindo desenvolver métodos para seleção de fontes com amplo espectro de resistência;

7. Seleção assistida por marcadores (SAM) visando aumentar a frequência de alelos de interesse ou restringir o tamanho dos segmentos genômicos de espécies selvagens no processo de introgressão de genes após cruzamentos interespecíficos. Exemplos bem sucedidos de SAM incluem incorporação simultânea de distintos genes de resistência a doenças em linhagens, seleção precoce para qualidade de frutos e raízes; incorporação de fatores de macho-esterilidade em linhagens parentais de híbridos; recuperação mais rápida do genoma de parentais recorrentes em retrocruzamentos assistidos por marcadores (STAM, 2003; CAHILL & SCHMIDT, 2004);
8. Monitoramento da incorporação de fatores genéticos controlando a expressão de características quantitativas (“quantitative trait loci” - QTL) via SAM;
9. Isolamento de regiões cromossômicas contendo genes e QTLs possibilitando a transferência destes fatores genéticos via estratégias transgênicas para diferentes cultivares e espécies de planta (FRARY *et al.*, 2000);
10. Desenvolvimento, via sequenciamento em larga escala, de extensos catálogos de genes em plantas submetidas a diferentes tipos de estresses bióticos e abióticos;
11. Obtenção da seqüência completa de genomas de plantas e de diversos microorganismos. Esta informação sobre estruturas completas e/ou parciais de distintos genomas vegetais permite refinadas estimativas de relações filogenéticas e de sintonia entre grupos de ligação entre espécies de importância agrícola;
12. Desenvolvimento de projetos genomas funcionais em combinação com sistemas que permitem análise em larga escala de padrões de expressão gênica (“DNA chips” / “microarrays”) gerando os chamados transcriptomas;
13. Utilização de informações de genoma estrutural e funcional de espécies modelo para a busca e isolamento de genes análogos em espécies de interesse agrônomico e
14. Desenvolvimento de “novos” fenótipos (ex. “golden rice” e “blue rose”) via mobilização de genes em sistemas de transformação de plantas (transgenia), que podem, posteriormente, serem incorporados, via técnicas convencionais, em diferentes cultivares elites.

Sistemas de marcadores para resistência a doenças

Diversos mapas locais para regiões cromossômicas foram construídos para diversas espécies vegetais, incluindo hortaliças (Mohan *et al.*, 1997; Cahill & Schmidt, 2004). Estes mapas têm servido como âncoras para isolar genes de resistência via mapeamento (“map based-cloning” ou “positional cloning”). O primeiro isolamento de um gene de resistência, o Pto (resistência a *Pseudomonas* tomato), foi conduzido via mapeamento e clonagem da região cromossômica contendo o marcador em estreita ligação com o gene de interesse. A análise de seqüência indicou que Pto codifica uma proteína quinase (Martin *et al.*, 1993). Diversos genes de resistência foram posteriormente isolados via mapeamento ou via mutagênese insercional com transposons (Baker *et al.*, 1997). Entre as hortaliças, o tomateiro é a espécie que apresenta o maior número de genes de resistência clonados. Após o isolamento de Pto, diversos genes de resistência incluindo Cf-2, Cf-5 e Cf-9 (raças de *Cladosporium*) Ve (*Verticillium dahliae*); I-2 (*Fusarium* raça 2); Mi (*Meloidogyne* spp., afídeos e tolerância a mosca-branca); Sw-5 (*Tospovirus*) e Asc (*Alternaria alternata*) foram isolados (Hammond-Kosack & Jones, 1997). A comparação das seqüências destes genes indicou, de maneira surpreendente, que diversas regiões gênicas estavam conservadas ao longo da evolução, mesmo representando fatores de resistência a patógenos tão díspares quanto fungos, bactérias, nematóides e vírus (Staskawicz *et al.*, 1995; Bent, 1996). Esta conservação de seqüências entre distintos genes de resistência clonados permitiu o desenvolvimento de uma nova classe de marcadores: os chamados DRA “disease resistance analogs” (Michelmore, 1995; Leister *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1996). Esta estratégia tem sido usada para identificar marcadores e/ou isolar genes de resistência “candidatos” em várias espécies de planta.

Mapas genéticos regionais e globais em hortaliças

Os mapas genéticos são a principal ferramenta para identificação de regiões genômicas de interesse agrônomo. A eficiência na geração de mapas genéticos é dependente de uma quantidade elevada de variação de alelos (os chamados polimorfismos), da capacidade dos sistemas de marcadores em revelar estes polimorfismos e da estreita ligação destes polimorfismos com características de interesse. Mapas com diversas densidades de marcadores têm sido construídos para hortaliças (Paterson, 1996). O desenvolvimento de mapas genéticos contendo marcadores espaçados em cerca de 10cM poderá permitir a chamada "aterrissagem cromossômica" em grupos de ligação contendo genes de interesse e análise de características do tipo QTL.

A título de ilustração, vamos relatar alguns dos avanços obtidos no uso de marcadores em cenoura e tomate, duas hortaliças onde estão sendo alocados grandes esforços de pesquisa nesta área. Marcadores STS ("sequence tagged-sites") e SCAR ("sequence characterized amplified region") foram obtidos em cultivares tropicais e temperadas de cenoura a partir do sequenciamento de marcadores RAPD (Boiteux et al., 2004). Mapas locais foram desenvolvidos e podem ter múltiplas aplicações uma vez que os parentais das populações de mapeamento de cenoura segregam para resistência as manchas foliares de *Alternaria* e *Cercospora*, para os nematóides *Meloidogyne javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* e para a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*. Pendoamento precoce, teor e tipo de carotenóides e tolerância a calor também estão segregando nestes cruzamentos. Grandes avanços foram também obtidos no mapeamento do locus *Mj-1* controlando resistência a *M. javanica* via "bulked segregant analysis", desenvolvida por MICHELMORE *et al.* (1991). Alguns marcadores do tipo DRA e RAPD foram identificados em quase completa co-segregação com o locus *Mj-1* (BOITEUX, 2000; BOITEUX *et al.*, 2000). Em tomate, uma linhagem ('Tx-468 RG') contendo um gene recessivo controlando extrema resistência a geminivírus foi cruzada com uma linhagem susceptível a geminivírus, mas com elevada tolerância de campo a *X. vesicatoria* ('Ohio 8245') (GIORDANO *et al.*, 2005). Esta população está sendo mapeada usando marcadores do tipo RAPD e DRA. De fato, marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados no melhoramento do tomateiro. Já foram detectados marcadores moleculares para mais de quarenta genes de resistência incluindo: *Ty-1* (tolerância ao tomato yellow leaf curl geminivirus), *Tm2-2* (resistência a tomato mosaic virus); *I-3* controlando resistência a *Fusarium* raça 3, *Lv-1* (oídio), *Sm* (*Stemphylium*) e diversos QTL para murcha e mancha-bacteriana (BARONE, 2003).

Monitoramento de citoplasma macho-estéril

Para algumas espécies de hortaliças, a produção de sementes híbridas envolve a emasculação do parental feminino. Neste sentido, a presença de macho-esterilidade genética representa uma grande vantagem sobre a emasculação artificial. Em hortaliças, os sistemas genéticos-citoplásmicos têm sido os mais empregados, notadamente em cebola e cenoura, que são plantas bianuais com um grande número de minúsculas flores perfeitas, o que inviabiliza a produção manual de semente híbrida. Desta forma, o uso de SAM tem se revelado uma importante ferramenta na identificação de citoplasma macho-estéril usando marcadores baseados em PCR. Estes polimorfismos entre linhas férteis e estéreis foram identificados tanto em DNA mitocondrial quanto em DNA de cloroplastos em cebola (HAVEY, 1995) e em DNA de mitocôndria em cenoura (BACH *et al.*, 2002). Um elemento fundamental para aumentar a eficiência do sistema será a identificação de marcadores para o gene nuclear mantenedor (*Ms*) permitindo a precoce identificação de todos os genótipos de interesse para produção de híbridos nestas duas hortaliças.

Diagnose e detecção molecular de fitopatógenos

Diversos projetos genomas de fitopatógenos já se encontram em andamento ou já foram finalizados. Destaca-se a participação de grupos de pesquisadores brasileiros que se encontram em posição de liderança nesta área (CAMARGO, 2002). Alguns projetos de destaque são *Xylella* spp. (videira e citrus); *Ralstonia solanacearum*; *Agrobacterium tumefaciens*; *Xanthomonas citri*; *X. campestris* pv. *campestris*; *Pseudomonas syringae* e brusone (*Magnaporthe grisea*). Além disso, segue em curso uma série de projetos de análise genômica de fitopatógenos em distintos laboratórios e instituições de pesquisa mundiais. Na Embrapa Hortaliças projetos estão sendo conduzidos visando identificar

marcadores espécie-específicos para *Phytophthora*, *Alternaria* e *Stemphylium*. O sequenciamento de isolados de Geminivirus e Potyvirus encontra-se em andamento. Estes projetos têm gerado informação para análises filogenéticas e para o desenvolvimento de “primers” que podem ser altamente específicos (permitindo a detecção de um único variante do patógeno) ou universais (permitindo a detecção de um número expressivo de variantes de um patógeno ou grupo de patógenos). Estas técnicas de análises e detecção são rotineiramente conduzidas via PCR.

Mapeamento de QTL

O moderno conceito de mapeamento de características quantitativas foi estabelecido a partir da noção de que características monogênicas poderiam ser usadas para detectar QTL, desde que houvesse co-segregação (TANKSLEY, 1993). A idéia atual de QTL é essencialmente a mesma só que, desta vez, conta com o auxílio de marcadores moleculares e de mapas genéticos de alta densidade (TANKSLEY, 1993). O uso de mapas genéticos para estudar características poligênicas tem sido aplicado para diversas características de interesse, incluindo resistência a doenças (YOUNG *et al.*, 1996) e tamanho de fruto em tomateiro (FRARY *et al.*, 2000).

Marcadores moleculares ligados com genes controlando teores de elementos funcionais em cenoura

Sete genes foram descritos controlando os caracteres de coloração laranja, branca, amarela e vermelha em raiz de cenoura. Vinte QTL associados com a acumulação de diferentes pigmentos carotenóides foram localizados no mapa genético de cenoura (SANTOS & SIMON, 2002). Diversos genes da via biossintética dos carotenóides foram isolados e poderão servir, em um futuro próximo, como genes candidatos na seleção assistida por marcadores (FONSECA, 2000; JUST *et al.*, 2006).

Análise genômica de elementos funcionais em cenoura

O melhoramento para a quantidade e tipo de carotenóides em raízes acumuladoras é uma área pouco explorada e a cooperação entre o melhoramento clássico e o molecular pode se mostrar bastante produtiva. A via biossintética dos carotenóides é uma das vias bioquímicas mais bem caracterizadas em plantas, com vários genes já clonados e sequenciados incluindo cenoura (FONSECA, 2000; JUST *et al.*, 2006). No entanto, com algumas exceções, o conhecimento destes genes ainda não tem sido amplamente utilizado no melhoramento visando aumento dos teores e tipos de carotenóides ou para o estudo da regulação desta via metabólica em plantas. Os impactos técnico-científicos destes estudos residem no fato de que a genômica funcional (variabilidade alélica e expressão gênica) poderá ajudar os programas de melhoramento genético no desenvolvimento de estratégias mais efetivas para alterar o conteúdo de carotenóides em raízes e em outros órgãos acumuladores.

Estratégias genômicas para modificar os teores de elementos funcionais em tomateiro

O tomateiro tem sido considerado, no ponto de vista do melhoramento genético, como uma planta modelo apresentando diversos mutantes tanto para teor como para o tipo de carotenóides (GIORDANO *et al.*, 2003). Alguns destes acessos contendo mutações de interesse têm sido identificados em germoplasma de espécies cultivadas e selvagens. A maioria dos genes estruturais da via de carotenóides já está isolada em *Lycopersicon* (CARVALHO *et al.*, 2004). Além disto, “primers” para seqüências gênicas correspondendo aos genes codificando as enzimas fitoeno sintase, fitoeno desaturase, IPP sintase, GGPP sintase, zeta-ciclase e beta-ciclase já estão disponíveis (CARVALHO *et al.*, 2004). Na Embrapa Hortaliças, a diversidade alélica para genes da via biossintética dos carotenóides está sendo investigada em linhagens e/ou híbridos com teores e tipos contrastantes de carotenóides, especialmente β -caroteno e licopeno. Marcadores moleculares estão sendo gerados por meio de uma combinação das técnicas de bibliotecas subtrativas com materiais genéticos contrastantes, PCR-heterólogo e sequenciamento. Marcadores do tipo QTL ligados a acumulação de licopeno foram recentemente localizados no mapa genético de tomate (LIU *et al.*, 2003) e podem ser empregados em sistemas de seleção assistida.

Conclusões

Os avanços tecnológicos advindos da moderna genômica têm sido progressivamente incorporados no cotidiano dos programas de melhoramento genético e nos sistemas de produção de sementes de hortaliças. Esta incorporação tende a intensificar-se a medida que os custos operacionais se reduzam. Estas ferramentas incluem os novos e robustos sistemas de geração de marcadores moleculares capazes de produzir mapas de alta resolução. Estes marcadores, distribuídos por todo o genoma, maximizam as chances de detectar associações com diversas características (qualitativas ou quantitativas) de interesse. Mais recentemente, temos observado o enorme potencial de aplicação da ciência genômica que já está servindo como fonte de informação genética para o melhoramento clássico e de genes clonados para o desenvolvimento de cultivares de hortaliças geneticamente modificadas.

Referências

- BACH IC, OLESEN A, SIMON PW (2002) PCR-based markers to differentiate the mitochondrial genomes of petaloid and male fertile carrot (*Daucus carota* L.) *Euphytica*, 127: 353-365.
- BARONE A (2003) Molecular marker-assisted selection for resistance to pathogens in tomato. In: *Marker assisted selection: A fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding?* Session I: MAS in Plants. p. 29-35. FAO, Roma.
- BAKER B, ZAMBYRSKI P, STASKAWICZ B, DINESH-KUMAR SP (1997) Signaling in plant-microbe interactions. *Science*, 276: 726-733.
- BENT AF (1996) Plant disease resistance genes: Function meets structure. *Plant Cell*, 8: 1757-1771.
- BOITEUX LS (2000) *Characterization of the Meloidogyne javanica resistance locus employing molecular markers and isolation of candidate disease resistance loci in carrot (Daucus carota L.) cv. Brasília* Ph.D. Thesis, University of Wisconsin-Madison, 478 pp.
- BOITEUX LS, BELTER JG, ROBERTS PA, SIMON PW (2000). RAPD linkage map of the genomic region encompassing the *Meloidogyne javanica* resistance locus in carrot. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 439-446.
- BOITEUX LS, HYMAN JR, BACH IC, FONSECA MEN, MATTHEWS WC, ROBERTS PA; SIMON PW (2004) Employment of flanking codominant STS markers to estimate allelic substitution effects of a nematode resistance locus in carrot. *Euphytica*, 136: 37-44.
- CAHILL DJ, SCHMIDT DH (2004) Use of marker assisted selection in a product development breeding program "New directions for a diverse planet". *Proceedings of the 4th International Crop Science Congress*, Brisbane, Australia. Published on CDROM (www.cropscience.org.au).
- CAMARGO LEA (2002) Interações patógeno-hospedeiro: Contribuições da genômica. *Fitopatologia Brasileira*, 27: S12-S14.
- CARVALHO W; ARAÚJO AH; GIORDANO LB; BOITEUX LS; SALES, MP; & FONSECA, MEN (2004) Use of genes of the carotenoid biochemical pathway to evaluate genetic diversity and species relationships in the genus *Lycopersicon*. In: *Proceedings of the XXXIII Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Congress*, Caxambu, Minas Gerais, Brazil.
- FONSECA, MEN (2000) *Cloning and expression of carrot (Daucus carota L.) cDNAs coding for enzymes of the carotenoid biosynthetic pathway in roots accumulating different types and amounts of carotenoids*. Ph.D. Dissertation. University of Wisconsin-Madison, Madison-WI, USA, 2000.
- FRARY A, NESBITT TC, FRARY A, GRANDILLO T, VAN DER KNAAP E, CONG B, LIU J, MELLER J, ELBER R, ALPERT KB, TANKSLEY S (2000) Cloning of *fw-2* a QTL controlling fruit size em tomato. *Science*, 289: 85-88.
- GIORDANO LB; ARAGÃO FAS; BOITEUX LS (2003) Melhoramento Genético do Tomateiro. *Informe Agropecuário*, 24, 219, p.43-57,
- GIORDANO LB; SILVA LOBO, VL; SANTANA FM, FONSECA MEN; BOITEUX LS (2005) Inheritance of resistance to the bipartite *Tomato chlorotic mottle begomovirus* derived from *Lycopersicon esculentum* cv. 'Tyking'. *Euphytica* 143:27-33.
- GOFF SA, RICKE D, LAN T, PRESTING G, WANG R et al. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science*, 296: 92-100.

HAVEY M (1995). Marker-facilitated selection of male sterile cytoplasm in onion. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 387.

HAMMOND-KOSACK KE, JONES JDG (1997) Plant disease resistance genes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 575-607.

JUST BJ; SANTOS CAF; FONSECA MEN; BOITEUX LS; OLOIZIA BB; SIMON, PW (2006) Carotenoid biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): Isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping. *Molecular Genetics and Genomics* (no prelo).

KANAZIN V, MAREK LF, SHOEMAKER RC (1996) Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93: 11750-11755.

LEISTER D, BALLVORA A, SALAMINI F, GEBHARDT C (1996) A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genetics*, 14: 421-429.

LIU, YS; GUR A; RONEN G; CAUSSE M; DAMIDAUX R; BURET, M; HIRSCHBERG, J; ZAMIR D (2003) There is more to tomato fruit color than candidate carotenoid genes. *Plant Biotechnology Journal*, 1: 195-207.

MARTIN GB, BROMMONSCHNKE SH, CHUNWONGSE J, FRARY A, GANAL MW, SPIVEY R, WU T, EARLE ED, TANKSLEY SD (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, 262: 1432-1436.

MICHELMORE RW (1995) Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology*, 15: 393-427.

MICHELMORE RW, PARAN I, KESSELI RV (1991) Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88: 9828-9832.

MOHAN M, NAIR S, BHAGWAT A, KRISHNA TG, YANO M, BHATIA CR, SASAKI T (1997) Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding*, 3: 87-103.

ORTIZ, R. (1998) Critical role of plant biotechnology for the genetic improvement of food crops: perspectives for the next millennium. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1, p.16-17.

PATERSON AH (1996) *Genome Mapping in Plants*. RG Landes Company. Nova York.

SANTOS CAF; SIMON, PW (2002) QTL analyses reveal clustered loci for accumulation of major provitamin A carotenenes and lycopene in carrot roots. *Molecular Genetics and Genomics*, 268: 122-129.

STAM P (2003) Marker-assisted introgression: speed at any cost? In: *Eucarpia Leafy Vegetables* (Editores Th. J. L. van Hintum, A. Lebeda, D. Pink & J.W. Schut), p.117-124, Holanda.

STASKAWICZ BJ, AUSUBEL FM, BAKER BJ, ELLIS JG, JONES JDG (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, 268: 661-667.

TANKSLEY SD (1993) Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics*, 27: 205-233.

THRO AM; PARROTT W; UDALL JA; BEAVIS WD (2004) Genomics and plant breeding: The experience of the initiative for future agricultural and food systems. *Crop Science*, 44:1893-1919.

YOUNG ND (1996) QTL mapping and quantitative disease resistance in plants *Annual Review of Phytopathology*, 34: 479-501.

YU YG, BUSS GR, SAGHAI-MAROOF MA (1996) Isolation of a superfamily of candidate disease resistance genes in soybean based on conserved nucleotide-binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93: 11751-11756.