

O uso de marcadores moleculares RFLP na seleção de matrizes para coleta de sementes em populações naturais: UM REQUISITO PARA A CERTIFICAÇÃO

João Antonio Pereira Fowler

Centro Nacional de Pesquisa de Florestas-Embrapa

Os projetos de florestamento ou reflorestamento com espécies nativas dependem da disponibilidade de sementes e mudas nas quantidades requeridas e com a variabilidade genética apropriada. O mercado não oferece sementes de inúmeras espécies nativas e para muitas inexistem lotes com variabilidade genética ampla e conhecida. A qualidade de um lote de sementes de espécie nativa para qualquer propósito de uso é caracterizada pela amplitude de sua variabilidade genética, pois sua capacidade evolutiva será diretamente proporcional à sua base genética. A despeito da potencialidade de múltiplo uso, faltam lotes

de sementes de inúmeras espécies com variabilidade genética adequada para o estabelecimento de programas de conservação genética, bem como para utilização em projetos de recuperação ambiental e fomento com fins comerciais. A importância de sementes de espécies florestais nativas em quantidades compatíveis com a demanda e com variabilidade genética e fisiológica é de reconhecimento geral. As sementes são os principais veículos de propagação das espécies florestais, por apresentarem composição genética resultante da mistura do material parental, por serem produzidas em grande número a cada ano, por serem muito mais resistentes ao estresse ambiental e a danos do que os propágulos vegetativos e por tolerarem armazenamento por longos períodos sob condições apropriadas (SCHMIDT, 2000). O conhecimento da distribuição espacial dos genótipos nas populações e fragmentos florestais naturais possibilitará o planejamento das coletas de sementes com a variabilidade genética adequada, evitando a seleção de árvores-matrizes considerando-se unicamente o aspecto fenotípico, o que compromete a variabilidade genética das sementes e conseqüentemente dos plantios posteriores, pelo risco de que sejam oriundas de indivíduos aparentados. As diferenças genotípicas entre indivíduos são conhecidas por técnicas de identificação de polimorfismos genéticos em nível do DNA. A técnica da PCR-RAPD tem a vantagem de dispensar o conhecimento prévio sobre o DNA da espécie em estudo, sendo mais simples, rápida e de custo mais baixo.

METODOLOGIA

Origem e coleta do material vegetal

O procedimento consiste da seleção e georreferenciamento das populações e fragmentos, bem como das árvores-matrizes adultas das quais serão coletadas folhas para extração do DNA genômico, identificadas por local e número. Após a coleta das folhas nas árvores matrizes selecionadas, as amostras são identificadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer a -80°C para extração do DNA genômico.

Extração do DNA Genômico

Os métodos utilizados para extração do DNA genômico das folhas das espécies são inúmeros, contudo a proposta sugere o protocolo desenvolvido por CHEUNG; HUBERT e LANDRY (1993) por tratar-se de uma técnica que preconiza o uso de concentração de sal muito alta no tampão de extração o que elimina vários inibidores da PCR, tornando a extração do DNA um processo simples, rápido e de baixo custo.

Reações de PCR-RAPD

Quantificação e integridade do DNA genômico extraído

A quantificação e a pureza do DNA das amostras do é estimada através da comparação visual da intensidade de fluorescência das bandas com as do DNA do fago de concentração conhecidas, 5, 10 e 20 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% (P/v), em corrida de 90 minutos a 100 V. A visualização também permite verificar a integridade do DNA extraído.

Seleção de Primers

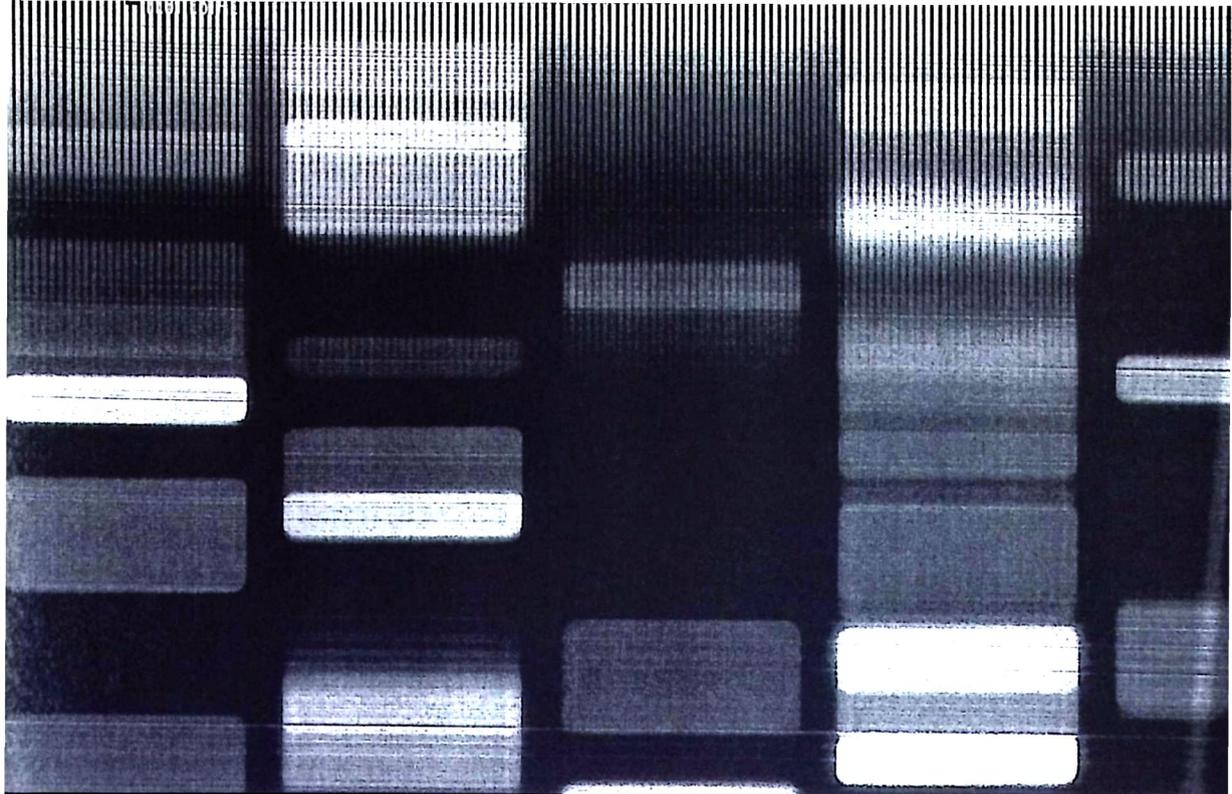
A técnica utiliza oligonucleotídeos sintéticos com 10 pares de base, conhecidos como primers, para amplificar regiões polimórficas do DNA, identificadas aleatoriamente, revelando as diferenças genéticas entre indivíduos (WILLIAMS et al., 1990; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Para verificação do perfil de amplificação de cada primer são utilizadas amostras de DNA de quatro plantas da espécie em estudo.

Condições de amplificação

As reações de amplificação são feitas em termociclador em volumes de reação variáveis de 10 ou 25 μL contendo contendo por exemplo: 1 ng DNA molde, 0,5 μM de primer, 0,8 μM de dNTP, 2,5 μL de tampão 10X, 1,5 mM de MgCl_2 , 2,5 unidades de TaqDNApolimerase e H_2O (q.s.p.). As condições de amplificação são variáveis entre as espécies. Desnaturação inicial a 92°C por quatro min; 40 ciclos de um minuto a 92°C , um minuto e 30 segundos a 40°C , e dois minutos a 72°C . A extensão final foi de cinco minutos a 72°C . Os produtos de amplificação, repetidos duas vezes para cada amostra para minimizar eventuais problemas de baixa repetibilidade, são submetidos à eletroforese com corrida (3V/cm) em géis de agarose 1,5% (p/v) em tampão TBE 1X. O DNA Ladder 1Kb é usado como marcador de peso molecular.

Análise dos dados

A análise dos dados é feita com base nos polimorfismos gerados pelas bandas mais evidentes do marcador RAPD pela análise das fotos dos géis. A planilha com os dados binários é construída no Microsoft Excel e os dados interpretados como binários, gerando uma matriz com a genotipagem dos indivíduos quanto à presença (1) e ausência (0) de bandas. A porcentagem de polimorfismos obtida nos géis com as amplificações é calculada dividindo-se o número de bandas polimórficas pelo número total de bandas de cada primer. O coeficiente de similaridade de Jaccard entre as árvores-amostradas de cada população, é feito conforme a expressão: $S_{ij} = a/a+b+c$, onde:



a = número de casos que ocorre bandas em ambos indivíduos simultaneamente; b = número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduos i ; c = número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduos j. O valor numérico de S reflete a semelhança entre duas árvores-amostradas. Os indivíduos serão agrupados hierárquicamente pelo método UPGMA ou método de agrupamento pareado não ponderado utilizando médias aritméticas, permitindo a construção de dendrogramas. As matrizes e dendrogramas são elaborados pelo software NTSYS 2.0 (ROHLF, 2000). A consistência dos agrupamentos entre indivíduos de cada população é testada pelo software BOOD, (COELHO, 2000).

RESULTADOS

O protocolo de Cheung; Hubert e Landry (1993) para a extração do DNA genômico das folhas é eficiente, qualitativa e quantitativamente para execução da PCR-RAPD. A reprodutibilidade dos resultados é testada pela comparação entre as duas amostras de extração e execução da PCR-RAPD das folhas de cada árvore. A integridade do DNA extraído pode ser comprovada pelo sucesso nas ampliações dos polimorfismos obtidos. A

qualidade e a quantidade do DNA molde extraído pelo método sugerido são respaldados pelas constatações feitas por Molinari e Crochemore (2001), que testaram três protocolos de extração de DNA vegetal, entre os quais o que foi utilizado neste trabalho e concluíram que todos forneceram DNA de boa qualidade para execução da técnica de PCR-RAPD. A vantagem do método adaptado de Cheung; Hubert e Landry (1993) está na dispensa da utilização dos reagentes como enzimas, fenol, entre outros, sem comprometimento da qualidade da análise. Os estudos de caracterização de polimorfismos genéticos em nível de DNA de plantas, requerem amostras puras e suficientes para não inibir a ação das enzimas ou interferir na migração em gel de eletroforese. Os protocolos para extração devem ser rápidos, eficientes, de baixo custo e preferentemente que utilizem produtos pouco tóxicos. O fator mais importante na obtenção do DNA de plantas, segundo Ferreira e Gratapaglia (1998) é a qualidade do tecido vegetal, uma vez que a integridade do DNA é afetada pela condição do tecido antes da extração, sendo recomendável utilizar o material mais fresco possível, preferencialmente tecido novo em fase ativa de crescimento da planta.

Variabilidade genética entre as populações

As várias populações de uma mesma espécie apresentam uma ampla variação em termos de adaptação ecológica crescimento e forma, denominado ecótipo para designar um habitat especial de crescimento. A despeito das similaridades morfológicas, vários ecótipos ocorrem de acordo com diferentes condições ecológicas (Schmidt, 2000). A evolução depende da existência de variabilidade genética, sendo que a seleção natural atua entre as variantes dentro das populações em relação à adaptação ao ambiente, proporcionando variação entre populações e entre espécies (TORGLER; CONTEL e TORGLER, 1995). A variabilidade genética interpopulacional em espécies florestais é bastante variável, demonstrando que o sistema reprodutivo, a dispersão do pólen e das sementes, além do estágio sucessional são fatores determinantes da estrutura genética populacional. As diferentes taxas de variabilidade genética interpopulacional foram observadas em várias espécies entre as quais, *Swietenia macrophylla* 12,58%, Gillies et al.,1999, *Myracrodruon urundeuva*, 8,0% Reis (1999) e *Esenbeckia leiocarpa*, 10.06% Castellen, (2000) e *Piptocarpha angustifolia*, entre 7,6 a 15,8% (FOWLER, 2008).

Variabilidade dos genótipos nas populações

A principal variabilidade genética encontra-se dentro das populações. A distribuição espacial dos genótipos é consequência do sistema reprodutivo e da dispersão de pólen e sementes de cada espécie. Os trabalhos de Bawa, Perry e Beach (1985) indicam que muitas espécies com flores bissexuais, apresentam incompatibilidade de auto-fecundação, no entanto em outras, a auto incompatibilidade é fraca ou inexistente. Os marcadores genéticos são a principal ferramenta para descrever os padrões da variabilidade genética de uma população natural, possibilitando avaliar a variabilidade intra e interpopulações (TELLES, 2000; SEBBENN, 2002). Os resultados de quantificação da variabilidade genética podem sofrer influência da metodologia empregada, pois o uso de marcadores isoenzimáticos fornecem melhor a caracterização fenotípica das espécies, enquanto as técnicas que utilizam marcadores moleculares em nível do DNA, tais como RAPD, dão uma melhor caracterização genotípica. A despeito de ser um marcador codominante, por isso permitir a estimativa dos desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, as isoenzimas investigam um número limitado de locos polimórficos (FERREIRA e

GRATTAPAGLIA, 1998). Além disso, por possuírem função metabólica, estes marcadores estão sujeitos a variações ambientais e conseqüentemente às pressões seletivas. As constatações de Hamrich e Godt (1990), de que a diversidade genética em espécies arbóreas concentra-se principalmente dentro das populações foram confirmadas também para *Piptocarpha angustifolia*, que apresentou índices entre 84,16% e 92,43% (FOWLER, 2008).

Coleta de sementes em populações naturais Seleção de árvores-matrizes

O preceito de evitar-se coleta de sementes em árvores isoladas fisicamente, deve ser melhor analisado considerando-se para isso a formação do lote de sementes com maior variabilidade genética, uma vez que espécies com sistema hermafroditas apresentam altas taxas de auto-fecundação, e por isso nestes casos a questão crucial é a distância do isolamento. Já que as árvores mais distantes dos agrupamentos familiares podem ser a única estratégia para obtenção de sementes com maior dissimilaridade genética que obviamente contribuirão com maior variabilidade genética na formação do lote de sementes. A relação dissimilaridade genética e distância física muitas vezes é muito baixa tanto entre como dentro das populações naturais, assim a recomendação feita por Palmberg (1985) e Gray (1990) de 100 metros entre árvores também não pode ser aplicado às coletas de semente em populações naturais de todas as espécies pela característica de estrutura genética de cada uma delas, a maioria não estudada. Segundo Palmberg (1985); Eldridge et al. (1992) a obtenção de lotes de sementes com diversidade genética, também é assegurada pela coleta em grande número de árvores, contudo para

coletas em populações naturais esta recomendação precisa ser bem planejada para que se evite coleta de sementes de vários indivíduos com alto grau de parentesco, assim como de populações distantes geograficamente, contudo próximas geneticamente. O número de árvores, como regra geral, recomendado para coleta de sementes visando a conservação genética em populações de espécie com cruzamentos mistos é de 25 árvores-matrizes (GRAUDAL et al., 1997; SEBBENN, 2002). Contudo, mais do que o número de árvores, convencionado internacionalmente com sendo entre 20 e 30, a seleção das árvores seria mais estratégica para obtenção de maior variabilidade, uma vez que a característica de cada espécie é particular, sendo recomendada a seleção e posterior genotipagem de um tamanho efetivo de 50 árvores para que se obtenha as 25 ou 30 árvores-matrizes com o menor índice de similaridade genética possível. A outra variável discutida por Sebbenn (2002) está relacionada com o tamanho da área a ser florestada ou reflorestada, ou seja para um projeto de recomposição de 100 hectares, o material poderia ser originado de 25 árvores matrizes de um mesmo fragmento ou população com 150 indivíduos e sucessivamente para plantios maiores. A estratégia acima visa dirigir as coletas dentro de uma sistemática procedimental visando à obtenção de lotes de sementes com baixa taxa de endogamia e conseqüentes problemas de deriva genética nas gerações seguintes. O número de árvores-amostradas como do tamanho efetivo em cada população, indiscutivelmente minimiza os efeitos indesejáveis da endogamia, contudo deve ser considerado como um componente importante da seleção das árvores-amostradas após o conhecimento da estrutura genética de cada uma das populações ou fragmento escolhido para coleta



das sementes. A base genética da população de cada espécie apresenta alelos raros e alelos comuns, sendo que a amostragem para ser representativa da população deve incorporar a máxima divergência genética, para obtenção destes alelos comuns, pois são de suma importância para adaptação às condições ambientais. Os alelos raros dificilmente são amostrados pois implicaria em coletar sementes de todos os indivíduos de uma população (MARSHALL e BROWN, 1975). A escolha de áreas ecogeográficas diferentes, ainda que de ocorrência natural da espécie, como estratégia para reduzir o número de árvores-amostradas deve ser bem analisada antes de executada, tendo em vista que árvores da mesma espécie oriundas de populações estabelecidas sob diferentes condições ecológicas apresentarão maiores diferenças genéticas e ainda, plantas oriundas de condições ecológicas diferentes da área de plantio, poderão apresentar assincronismo floral e problemas de sobrevivência e de desenvolvimento, caracterizando a exogamia. A discussão e os subsídios oferecidos por vários autores mencionados neste trabalho, assim como, os resultados obtidos, fortalecem a obrigatoriedade do conhecimento da estrutura genética populacional de espécies florestais nativas para coleta de sementes e formação de lotes com índices adequados de variabilidade genética.

CONCLUSÕES

A correlação entre a distância geográfica e dissimilaridade genética entre as populações e entre indivíduos dentro das populações foi baixa;

As populações concentram a maior parte da variabilidade genética e apresentam-se estruturadas;

A seleção dos indivíduos para coleta de sementes deve pressupor a obtenção da maior dissimilaridade

possível, objetivando maior variabilidade genética na formação do lote de sementes, com um tamanho mínimo de 30 árvores-matrizes;

As árvores mais dissimilares geneticamente dos agrupamentos devem ser consideradas, pois são importantes para obtenção de sementes com maior variabilidade genética na formação do lote de sementes;

A inclusão da técnica de caracterização genética molecular por RAPD, como requisito obrigatório para comprovação dos níveis de variabilidade genética entre as populações naturais e entre as árvores-matrizes selecionadas para coleta das sementes entende-se compulsória no processo de certificação da coleta de sementes em populações naturais de espécies nativas florestais;

As razões para adoção deste procedimento embasam-se nos inúmeros trabalhos que salientam a importância da variabilidade genética para as populações florestais, bem como os efeitos nocivos da endogamia como a redução da produtividade pelo aborto de flores e mortalidade das plantas, além de alterações negativas no fenótipo como a perda de forma, fertilidade e menor produção de sementes;

A iniciativa de uso da técnica de caracterização genética molecular por RAPD na seleção de árvores-matrizes, vem ao encontro da organização e qualificação da produção de propágulos florestais, em especial de espécies nativas, de modo que sejam disponibilizadas sementes e mudas com variabilidade genética, mantendo um sistema de certificação com credibilidade perante a comunidade científica e os usuários;

A proposição de inclusão da técnica acima mencionada como requisito legal decorre da ausência de procedimento que vise conhecer a variabilidade genética dos lotes de sementes de espécies nativas que estão sendo comercializados no Brasil.

