

Manual de Curadores de Germoplasma – Vegetal: Caracterização Molecular

Foto: Lorena Ramos da Mata



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 314

Manual de Curadores de Germoplasma – Vegetal: Caracterização Molecular

Vânia Cristina Rennó Azevedo

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica - PqEB – Av. W5 Norte (final)

Caixa Postal: 02372 - Brasília, DF - Brasil – CEP: 70770-917

Fone: (61) 3448-4700

Fax: (61) 3340-3624

Home Page: <http://www.cenargen.embrapa.br>

E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Lucio Brunale*

Secretária-Executiva: *Lígia Sardinha Fortes*

Membros: *Diva Maria de Alencar Dusi*

Jonny Everson Scherwinski Pereira

José Roberto de Alencar Moreira

Regina Maria Dechechi G. Carneiro

Samuel Rezende Paiva

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*

Margot Alves Nunes Dode

Revisor técnico: Alessandra Pereira Fávero

Supervisor editorial: Lígia Sardinha Fortes

Revisor de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica: Lígia Sardinha Fortes

Editoração eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães

Foto da capa: Vânia Cristina Rennó Azevedo

1ª edição (on line)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Azevedo, Vânia Cristina Rennó.

Manual de curadores de germoplasma – Vegetal: Caracterização molecular. / Vânia Cristina Rennó Azevedo. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010.

17 p. – (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 314)

Revisão técnica: Alessandra Pereira Fávero.

1. Recursos Genéticos - Vegetal – Conservação. 2. Caracterização molecular. I. Título. II. Série.

581.15 - CDD

© Embrapa 2010

Autores

Vânia Cristina Rennó Azevedo

Ph.D. em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia

vania.azevedo@cenargen.embrapa.br

Apresentação

Desde o início da década de 1970, há uma crescente conscientização mundial sobre a necessidade de preservação dos recursos genéticos, que são essenciais para o atendimento das demandas de variabilidade genética dos programas de melhoramento, principalmente aqueles voltados para alimentação.

No Brasil, esta necessidade é especialmente importante, uma vez que a maioria dos cultivos que compõem a base alimentar do país é de origem exótica. Observa-se, por exemplo, que cerca de 95% dos acessos de cereais conservados em coleções do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA) são de espécies exóticas. Portanto, a manutenção e o enriquecimento contínuo da variabilidade genética dessas coleções são prioritários e estratégicos, considerando, ainda, as atuais restrições internacionais ao intercâmbio de germoplasma.

Na década de 1970, a *Food and Agriculture Organization* (FAO), órgão das Nações Unidas, estimulou o estabelecimento de uma rede mundial de Centros para a conservação de recursos genéticos situados em regiões consideradas de alta variabilidade genética. Em 1974, o *Consultative Group for International Agricultural Research* (CGIAR) criou o *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR), hoje transformado no *Bioversity International*. No mesmo ano, a Embrapa reconheceu a importância estratégica dos recursos genéticos com a criação do Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN), que mais recentemente adotou a assinatura-síntese Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A criação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e a consolidação do SNPA estabeleceram ambiente propício para a formatação da Rede Nacional de Recursos Genéticos. A partir de então, paulatinamente, coleções de germoplasma foram estruturadas em diferentes Unidades Descentralizadas, predominantemente na área vegetal.

Em 1993, por intermédio de deliberação da Diretoria Executiva, a Embrapa formalizou, como ferramenta de gestão das coleções, o Sistema de Curadorias de Germoplasma e definiu os papéis e as responsabilidades para os diversos atores envolvidos nesse Sistema, tais como: curadores de coleções de germoplasma, Chefes de Unidades Descentralizadas que abrigavam as coleções e a Supervisão de Curadorias. Os projetos em rede foram definidos como figuras programática e operacional, possibilitando o custeio de atividades de coleta, intercâmbio, quarentena, caracterização, avaliação, documentação, conservação e utilização de germoplasma, além da manutenção das coleções. De 1993 até a presente data, muitas coleções de germoplasma foram estabelecidas e, atualmente, o Sistema de Curadorias da Embrapa reúne 209 coleções, incluindo Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal (BAGs), Núcleos de Conservação Animal, Coleções Biológicas de Micro-organismos e Coleções de Referência, as quais abrangem espécies nativas e exóticas. Nas

demais Instituições do SNPA, estima-se que são mantidos pelo menos outros 243 Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal.

Como duplicata de segurança dos acessos mantidos nos BAGs, a Embrapa Cenargen abriga a Coleção de Base (COLBASE) de germoplasma vegetal, projetada para conservar sementes à temperatura de -20°C por longo período de tempo.

Como consequência desses 30 anos de atividades relacionadas ao manejo dos recursos genéticos, os curadores adquiriram uma bagagem de conhecimentos práticos na área, conhecimentos estes que foram, em parte, sistematizados e disponibilizados para a sociedade por intermédio da presente obra: "Manual de Curadores de Germoplasma".

Esperamos que esta publicação em série torne-se um guia para os curadores de germoplasma no Brasil e no exterior, e que contribua efetivamente para o aprimoramento da gestão dos recursos genéticos deste país.

Mauro Carneiro
Chefe Geral
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Sumário

Definição	08
Função	08
Importância	08
Tipos de marcadores	09
Delineamento do estudo	12
Um exemplo prático	12
A estrutura necessária	13
Onde fazer	13
Referências	14

Caracterização Molecular

Vânia Cristina Rennó Azevedo

Definição

A caracterização de germoplasma refere-se à mensuração e à documentação de características herdáveis da planta, as quais devem ser consistentes e expressas homogeneamente em diferentes ambientes. Por meio da caracterização, é possível identificar os acessos de uma coleção e separá-los geneticamente.

Os métodos moleculares de caracterização de germoplasma revelam o polimorfismo nas sequências de DNA entre diferentes indivíduos; são conhecidos como marcadores moleculares e se referem a regiões expressas ou não expressas do genoma.

Função

Os marcadores moleculares têm sido utilizados em análise genética de várias situações, como na identificação de clones, linhagens, híbridos, cultivares, testes de paternidade, estimativa de diversidade genética e endogamia populacional, fluxo gênico inter e intrapopulacional, taxa de cruzamento, parentesco e na construção de mapas genéticos. A caracterização molecular é, portanto, de grande importância para a conservação *in situ* e *ex situ* e para os programas de melhoramento genético, pois permite a geração de uma série de informações a respeito das características intrínsecas das espécies e da sua dinâmica populacional. Pode ser empregada sempre que as informações forem necessárias para o adequado manejo do BAG e úteis para os estudos e para a conservação da espécie.

Importância

- Avaliação da variabilidade genética de um banco de germoplasma.
- Identificação genética de acessos.
- Enriquecimento dos BAGs com acessos geneticamente diferentes entre si.
- Cálculo do tamanho efetivo populacional para a determinação do número mínimo de acessos a serem conservados com base na estrutura genética da espécie.
- Definição de estratégias de coletas para a conservação de maior diversidade genética, com base na estrutura genética espacial das populações.
- Determinação de populações prioritárias para coleta de sementes.
- Determinação do sistema de cruzamento da espécie.
- Estudo de fluxo gênico intra e interpopulacional.
- Definição de estratégias de conservação *in situ* com base na estrutura genética espacial intrapopulacional e diferenciação genética entre populações (F_{ST}).

- Subsidiar estratégias de manejo com base na distribuição da diversidade genética.
- Formação de coleções nucleares.
- Suporte aos programas de melhoramento genético. Seleção assistida por marcadores.

Tipos de marcadores

A caracterização molecular pode ser conduzida com base em diferentes tipos de marcadores, e o marcador ideal a ser utilizado numa caracterização se relaciona ao objetivo desta, i.e., quais perguntas biológicas devem ser respondidas, e à disponibilidade de marcador, uma vez que alguns marcadores moleculares são espécie/específicos. É evidente que outras questões devem ser levadas em consideração, como estrutura física para a realização do experimento e disponibilidade de recursos financeiros.

Em geral, os marcadores utilizados na caracterização de germoplasma como descritores da diversidade genética apresentam as seguintes características:

- são obtidos em grande quantidade (vários locos) e são polimórficos;
- são passíveis de análise simples, rápida e em grande escala;
- apresentam baixo custo por dado gerado, pois são obtidos por meio de eletroforese;
- possuem comportamento mendeliano, sendo transmitidos entre gerações;
- são distribuídos por todo o genoma;
- são tipicamente neutros, não oferecem vantagens adaptativas (exceto SNPs); e
- não sofrem efeito ambiental.

Os tipos mais conhecidos e utilizados de marcadores moleculares empregados na caracterização de coleções de germoplasma e em estudos genéticos populacionais são:

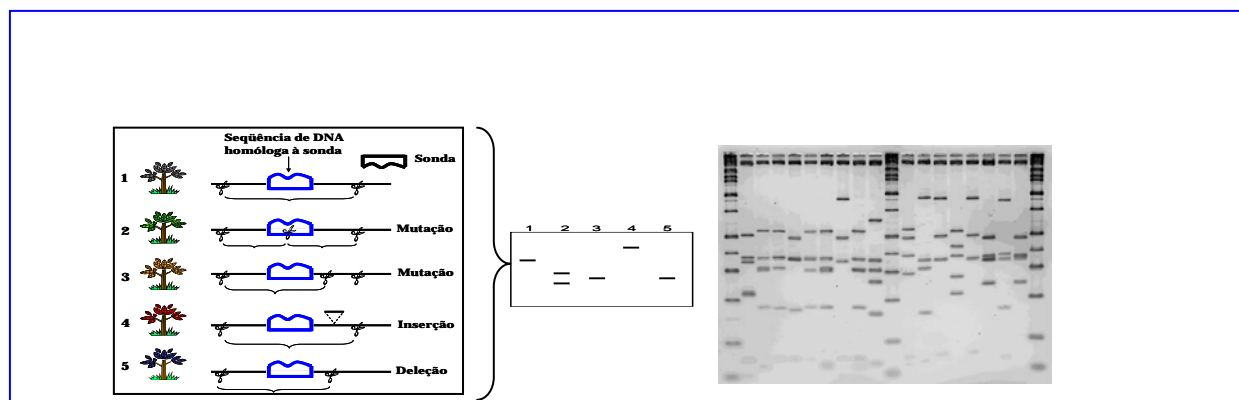


Figura 1. RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, ou polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição). Marcador codominante baseado em digestão enzimática com enzima de restrição, seguida de hibridização.

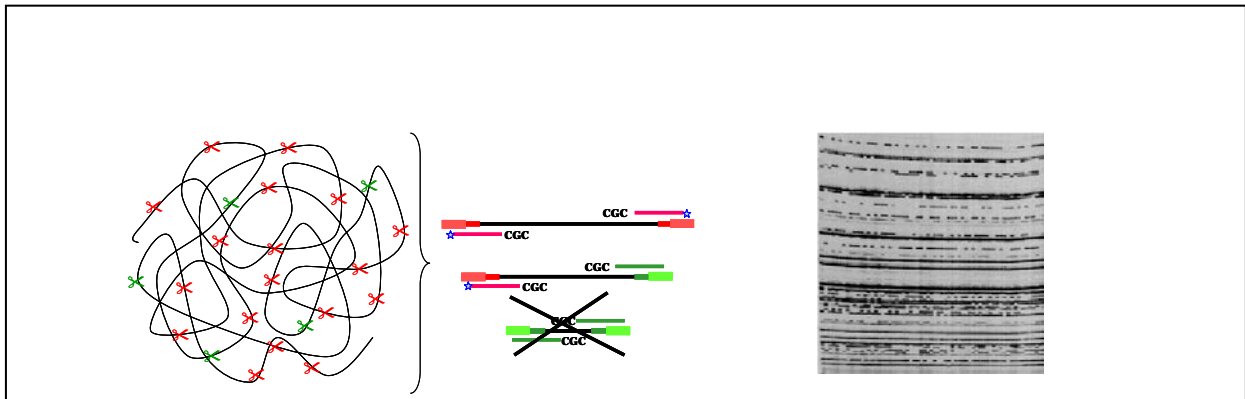


Figura 2. AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*, ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados). Marcador dominante baseado em digestão enzimática (uma enzima de corte raro e outra de corte comum), seguida de amplificação por meio de PCR.

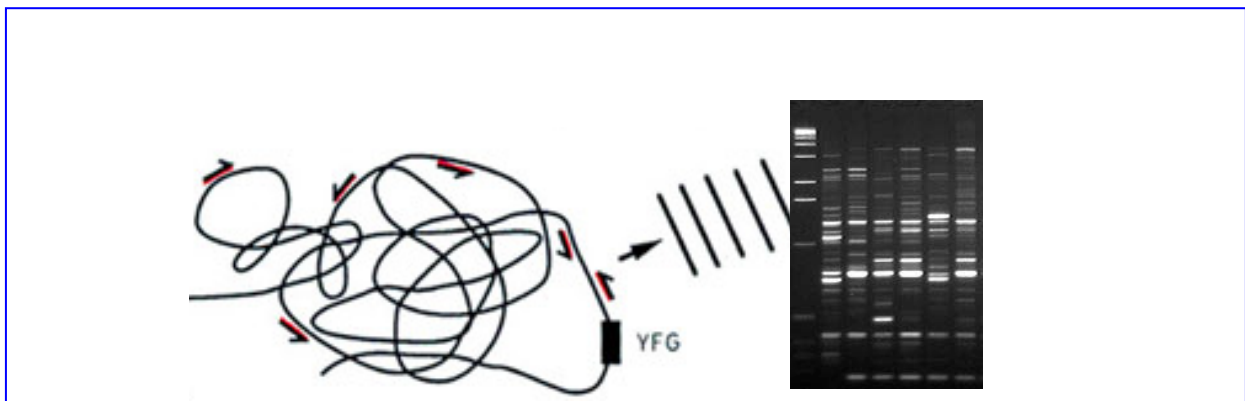


Figura 3. RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*, ou DNA polimórfico amplificado ao acaso). Marcador dominante baseado em amplificação de DNA por meio de PCR, com o emprego de iniciadores universais de amplificação ao acaso.

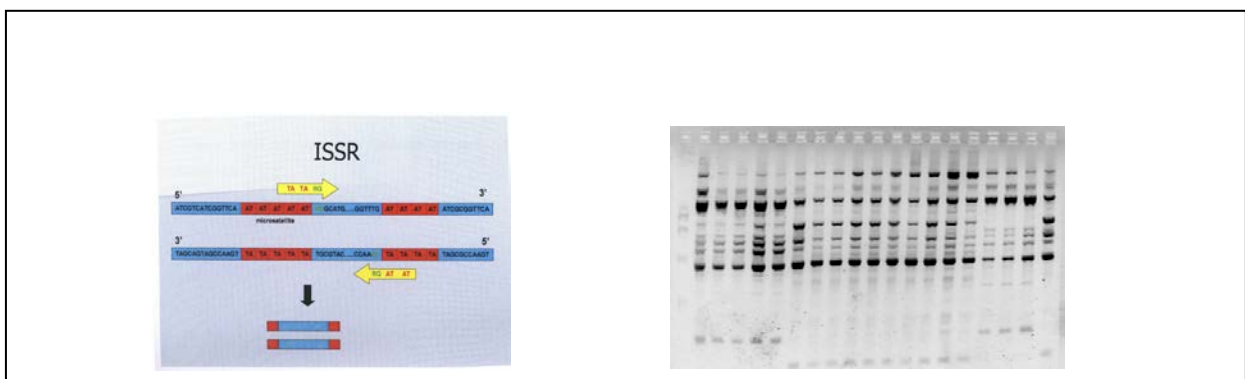


Figura 4. ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*, ou entre seqüências simples repetidas). Marcador dominante baseado em amplificações por meio de PCR, com o emprego de iniciadores universais baseados em seqüências SSR.

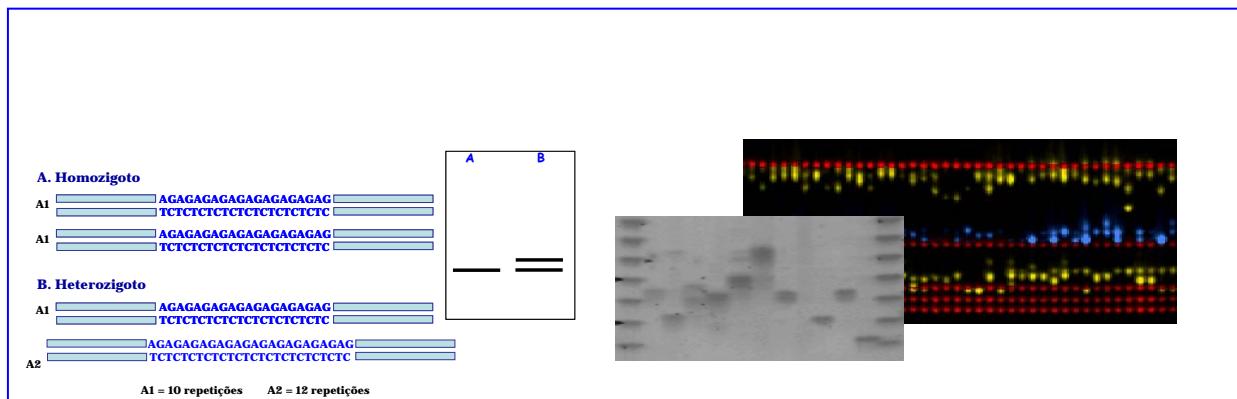


Figura 5. SSR (*Simple Sequence Repeats*, ou seqüências simples repetidas). Marcador codominante baseado em amplificação de DNA por meio de PCR, com o emprego de iniciadores espécie-específicos que devem ser desenvolvidos ou transferidos entre espécies correlatas.

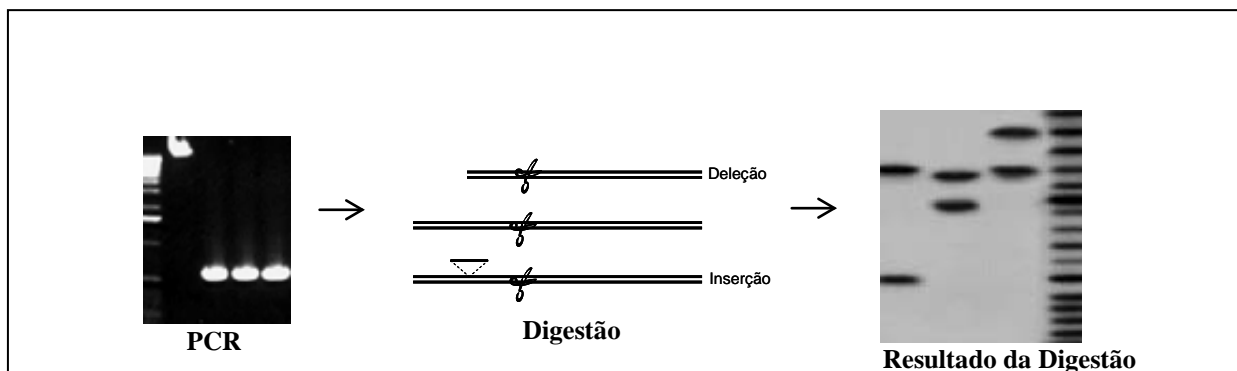


Figura 6. CAPS (*Cleave Amplified Polymorphic Sequences*, ou seqüências polimórficas amplificadas clivadas). Baseado em amplificação de DNA por meio de PCR, seguida de digestão enzimática do DNA de cloroplasto.

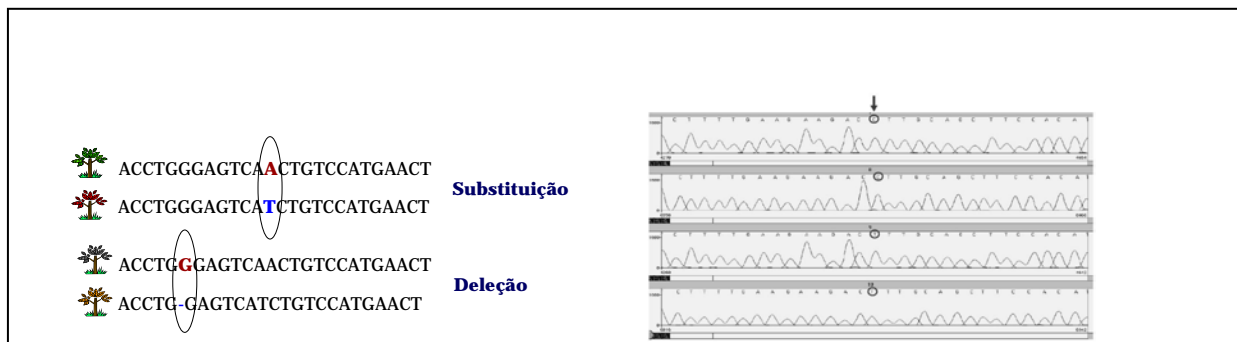


Figura 7. SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*, ou polimorfismo de um nucleotídeo). Marcador codominante baseado em amplificação de DNA ou cDNA por meio de PCR, seguida de sequenciamento.

Conforme exemplificado acima nos diferentes tipos de marcadores, o objetivo da caracterização molecular, independentemente do marcador utilizado, é a identificação de polimorfismo entre os acessos analisados.

Evidentemente, as informações necessárias ao BAG não podem ser obtidas pela análise genética com qualquer marcador. Marcadores dominantes são menos informativos do que

os codominantes, e o grau de polimorfismo interfere diretamente no nível das informações obtidas. Entre os marcadores citados, os SSR são atualmente mais utilizados.

Delineamento do estudo

Alguns pontos importantes devem ser considerados no momento da delimitação de um estudo de caracterização molecular. Além da disponibilidade de estrutura física e de recursos financeiros, a amostragem, o sistema reprodutivo, as informações de georeferenciamento e a correta identificação de espécies são alguns dos principais fatores de grande importância para que uma caracterização seja de fato informativa.

A amostragem ideal, por exemplo, depende de uma série de fatores, entre os quais o sistema reprodutivo da espécie, o tamanho e a densidade populacional e o número de populações disponíveis. De modo geral, a amostragem deve ser capaz de avaliar a capacidade da população de capturar e reter alelos ao longo das gerações.

Espécies autógamas tendem a apresentar menor variabilidade genética, se comparadas às alógamas. Dessa forma, a estratégia de amostragem deve ser diferenciada, ou definida com maior critério. Para o estudo de espécies autógamas, é fundamental que diferentes populações sejam amostradas e que as amostras coletadas sejam de acessos distantes (fisicamente) entre si. No caso de espécies alógamas, em uma única população é possível identificar alto grau de variabilidade genética.

O sistema reprodutivo da espécie é também fator de grande importância no cálculo do tamanho efetivo populacional, uma vez que espécies altamente endogâmicas (geralmente as autógamas e as alógamas com excesso de cruzamento entre aparentados) apresentam excesso de homocigotos e, portanto, o tamanho efetivo significativamente menor, se comparado ao de espécies alógamas com cruzamentos ao acaso.

Um exemplo prático

Com o objetivo de auxiliar na definição de estratégias eficientes de manejo sustentável de espécies madeireiras na região Amazônica, foram caracterizadas sete espécies de uma população primária com marcadores SSR.

Desenho do estudo: foram amostradas todas as árvores adultas de cada uma dessas espécies, numa área de 200 (espécies de maior densidade) a 500 hectares (espécies de menor densidade). A amostragem variou entre 96 árvores (espécie de menor densidade) e 490 (espécie de maior densidade), todas georeferenciadas. Foram caracterizados 30 descendentes de polinização aberta de 30 matrizes de cada espécie. O número de marcadores SSR utilizados variou entre cinco e oito entre as espécies.

Estimativas obtidas: diversidade genética populacional, endogamia nas diferentes gerações analisadas, sistema de cruzamento, cruzamento entre aparentados, tamanho efetivo populacional, fluxo gênico intrapopulacional (por pólen e semente), porcentagem de pólen vindo de fora da área estudada e estrutura genética espacial.

Foi possível determinar: o número de sementes a serem coletadas para a conservação *ex situ*, com base no tamanho efetivo populacional; a distância mínima entre as matrizes para a coleta de sementes; a distância ideal entre as matrizes que permanecerão na área após a extração madeireira, com base na estrutura genética espacial; e o impacto da exploração na diversidade genética. **Resultados do Projeto Dendrogene – Embrapa Amazônia Oriental.**

A estrutura necessária

Para estudos com marcadores moleculares, é necessário que a instituição disponha de um laboratório de genética com equipamentos para extração de DNA, eletroforese e amplificação. Entre os equipamentos importantes, podem ser citados: trituradores de DNA, banhos-maria, agitadores, centrífugas, estufas, *freezers*, termocicladores, cubas de eletroforese horizontal, transiluminadores, cubas de eletroforese vertical e, preferencialmente (mas não obrigatoriamente), sequenciadores de DNA de segunda geração, como ABI 3130 ou 3730, por exemplo.

Onde fazer

Os estudos com marcadores moleculares tornaram-se cada vez mais populares e acessíveis a diversos grupos de pesquisa. A popularização das técnicas foi facilitada, especialmente, devido à redução dos custos de desenvolvimento dos marcadores, da genotipagem e do sequenciamento. Diante dessa realidade, atualmente diversas Universidades e Institutos de Pesquisa, em todas as regiões do país, possuem estrutura para a realização de caracterização molecular.

Na Embrapa, diversas Unidades possuem estrutura que atende às necessidades das análises com grande parte desses marcadores. Entre estas Unidades, pode-se citar: Embrapa Acre, Amazônia Oriental, Amazônia Ocidental, Algodão, Arroz e Feijão, Cerrados, Florestas, Hortaliças, Mandioca e Fruticultura, Meio-Norte, Milho e Sorgo, Soja, Trigo, Uva e Vinho. Na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, o laboratório de referência para esses estudos é o Laboratório de Genética Vegetal do Núcleo de Recursos Genéticos, cuja estrutura permite a geração de dados com base em qualquer um dos marcadores supracitados.

Referências

- BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. C.; SOUZA, Z. P. **Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 11 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular técnica, 20).
- CAETANO-ANÓLLES, G.; BASSAM, B. G.; GRESSHOFF, P. M. High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Biotechnology**, v. 9, p. 553-557, 1991.
- DAKIN, E. E.; AVISE, J. C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, v. 93, p. 504-509, 2004.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1987.
- EDWARDS, A.; CIVITELLO, A.; HAMMOND, H. A.; CASKEY, C. T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. **American Journal of Human Genetics**, v. 49, p. 746-756, 1991.
- ELLEGREN, H. Microsatellites: Simple Sequences with Complex Evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 435-445, 2004.
- ENNOS, R. A. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. **Heredity**, v. 72, p. 250-259, 1994.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa-Cenargen, 1998.
- FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. 2. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1993, 631p.
- GOLDSTEIN, B. D.; SCHLOTTERED, C. **Microsatellites: Evolution and Applications**. Oxford: University Press, 2001. 352p.
- HAIG, S. M. Molecular contributions to conservation. **Ecology**, v. 79, p. 413-425, 1998.
- HAMRICK, J. L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, v. 69, n. 10, p. 1685-1693, 1982.
- HARRIS, S. A.; INGRAM, R. Chloroplast DNA and biosystematics: the effect of intraspecific diversity and plastid transmission. **Taxon**, v. 40, p. 393-412, 1991.

- HEDRICK, P. W. Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. **Evolution**, v. 53, n. 2, p. 313-318, 1999.
- LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 15, p. 65-95, 1984.
- MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KERUUK, L. E. B.; PEMBERTON, J. M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 639-655, 1998.
- NEI, M. Molecular population genetics and evolution. In: NEUBERGER A.; TATUM E. L.; (Ed.). **Frontiere of Biology**. New York: Elsevier, 1975. v. 40.
- NEI, M. Mathematical models of speciation and genetic distance. In: KARLIN, S.; NEVO, E. (Ed.). **Population genetics and ecology**. New York: Academic Press, 1976. p. 723-765,
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.
- POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends of Plant Science**, v. 1, p. 215-222, 1996.
- RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, v. 47, p. 35-52, 1981.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: laboratory manual**. 2nd ed. New York: CSHL, 1989.
- SLATKIN, M. Estimating level of gene flow in natural populations. **Genetics**, v. 99, p. 323-335, 1981.
- SLATKIN, M. Rare alleles as indicators of gene flow. **Evolution**, v. 39, n. 1, p. 53-65, 1985.
- SOKAL, R. R.; ODEN, N. L. Spatial autocorrelation in biology. I methodology. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 10, p. 199-228, 1978.
- SOKAL, R. R.; JACQUEZ, G. M. Testing inferences about micro-evolutionary processes by means of spatial autocorrelation analysis. **Evolution**, v. 45, p. 152-168, 1991.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 7213-7218, 1990.
- WEIR, B. S. **Genetic data analysis II: Methods for discrete population genetic data**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer, 1996. 445 p.
- WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKY, L. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- WRIGHT, S. Evolution in mendelian population. **Genetics**, v. 16, p. 97-159, 1931.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v. 19, p. 395-420, 1965.



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*