

Discriminação de cultivares e linhagens experimentais de soja com base em painéis de multiplexes de marcadores microsatélites

Ribeiro M.A.N.^{1,2}, Diener, P.S.A.¹, Lins, T.C.L.¹; Soares, C.N.¹; Guimarães, C.S.¹; Grattapaglia D.^{1,2} e Ferreira M.E.^{1,2}

¹GENOMAX/HERÉDITAS Tecnologia em Análise de DNA, SHIN CA 02 Lote 19, Lago Norte, 71505-000 Brasília D.F.

²Universidade Católica de Brasília, Brasília DF

EMAIL: ferreira@qenomax.com.br



GENOMAX
TECNOLOGIA GENÔMICA

RESUMO

O requerimento de proteção varietal em plantas cultivadas é baseado em descritores clássicos como características morfológicas avaliadas em diferentes ambientes. A abundância de polimorfismo de descritores morfológicos é potencialmente restrita em espécies de estreita base genética. A instabilidade dos descritores morfológicos em diferentes ambientes restringe o seu número e, por conseguinte, a sua capacidade discriminatória. A análise de polimorfismo de sequência de DNA, por outro lado, permite uma elevada precisão na identificação genética e discriminação de variedades, revelando extenso polimorfismo e estabilidade ambiental. É provável que polimorfismo de marcadores moleculares hipervariáveis como microsatélites sejam cada vez mais utilizados em testes de DHE (distinguidabilidade, homogeneidade e estabilidade) para fins de proteção varietal, especialmente em espécies de base genética estreita, como a soja. Este estudo teve por objetivo avaliar o poder de resolução de marcadores microsatélites na discriminação individual de contêineres de variedades comerciais e linhagens experimentais de soja plantadas no Brasil. A análise genética foi realizada em sistema de prova e contraprova em experimentos "cegos", onde a relação de vínculo genético e/ou comercial entre as amostras não era conhecida. A determinação do perfil genético dos cultivares foi realizada em 14 a 20 locos microsatélites internacionalmente recomendados para soja por apresentarem alto conteúdo informativo e robustez analítica. Os locos selecionados são constituídos de repetições em tandem de trinucleotídeos ou dinucleotídeos, genotipados em sistemas multiplexes e analisados simultaneamente em sequenciador automático de DNA ABI Prism 377XL. Os genótipos foram descritos com os alelos em pares de bases. As diferenças genéticas entre os cultivares/linhagens foram reveladas pelas diferenças no comprimento das sequências de DNA amplificadas em cada loco. Entre as variedades comerciais analisadas, 125 representam germoplasma protegido. Destas, 123 foram declaradas geneticamente distintas e apenas duas foram geneticamente indistinguíveis com os marcadores utilizados. Utilizou-se, para este fim, o critério mínimo de duas diferenças genéticas para declarar dois materiais como distintos com elevada confiabilidade. Algumas variedades comerciais apresentaram fortes indícios de mistura de linhagens e/ou evidência de heterozigose residual, sugerindo a necessidade de um controle mais rígido no monitoramento do processo de produção de sementes. Várias linhagens experimentais mostraram-se geneticamente idênticas a linhagens controle, apesar de ainda apresentarem alguma diferença morfológica como variação na coloração do hilo. Foram observados diversos alelos não reportados anteriormente em análises similares com germoplasma de outros países, o que indicaria a utilização de material genético exclusivo no pool genético brasileiro. Este trabalho estabelece de forma pioneira um sistema de identificação genética de cultivares de soja baseado em uma tecnologia rápida, econômica e, mais importante, de alto poder de resolução, que poderá se constituir em uma ferramenta inovadora para testes de DHE no processo de proteção varietal. Os resultados possibilitam o estabelecimento de um sistema eletrônico de comparação na condução de testes de identidade genética entre amostras questionadas e amostras padrão visando o controle de qualidade e fiscalização da comercialização de sementes.

Os descritores moleculares internacionalmente recomendados para a identificação individual de plantas, animais e seres humanos são baseados em segmentos curtos de DNA (um a sete pares de bases) repetidos em tandem conhecidos como microsatélites. Marcadores de regiões hipervariáveis do genoma, conhecidos como microsatélites ou repetições curtas em tandem (STR – "short tandem repeats"), foram recentemente desenvolvidos e caracterizados no genoma de soja. Marcadores microsatélites são analisados através da diferenciação da variação de sequências repetitivas lado a lado, em um sítio do DNA. O número de repetições, em geral, varia de algumas unidades a várias dezenas, fazendo com que a variação alélica intraloco possa ser detectada pela separação com base no peso molecular de produtos de PCR (reação de polimerase em cadeia) realizada através de eletroforese em géis de poliacrilamida (PAGE) corados com nitrato de prata. Mais recentemente, a detecção precisa da variação alélica tem sido feita em sequenciadores automáticos de DNA. Neste caso a marcação com fluorocromo de um dos primers que flaqueiam a sequência microsatélite no loco possibilita que o produto de PCR emita fluorescência quando excitado com o laser do equipamento, permitindo a sua acurada detecção em pares de base. Os alelos de locos microsatélites são analisados via PCR e, por isso, podem ser detectados a partir de amostras de nanogramas de DNA. Os marcadores microsatélites são altamente polimórficos, ricos em formas alélicas, possibilitando uma análise genética acurada e um elevado poder de resolução para testes de DHE, bem como em testes de parentesco e identidade genética mesmo em situações de forte parentesco entre cultivares. Adicionalmente, marcadores microsatélites são transferíveis de genoma para genoma dentro de uma espécie e entre espécies geneticamente relacionadas.

A análise de marcadores microsatélites é realizada identificando-se as formas alélicas que em determinada planta possui em locos definidos dos cromossomos, comparando-as com formas alélicas conhecidas para a espécie, permitindo, portanto, estimativas precisas e estatisticamente formais de vínculo genético e/ou identidade, bem como declarações categóricas de não-identidade ou parentesco. A técnica de análise de microsatélites é utilizada rotineiramente com sucesso na geração de estimativas robustas de individualidade genética para inúmeras espécies vegetais, animais e em humanos, constituindo hoje o padrão internacional em investigação genética forense. Neste experimento,

OBJETIVO

1. Avaliar painéis de marcadores microsatélites de soja para a discriminação genética de cultivares e linhagens de melhoramento como complemento a testes de DHE.

2. Analisar a identidade genética de sementes individuais que apresentam variação de coloração de hilo em uma mesma variedade de soja.

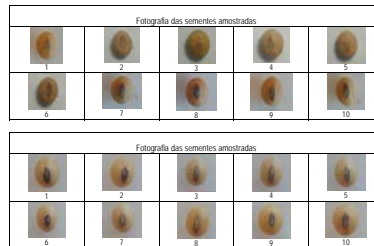


Figura 1. (a) Amostra de 10 sementes de variedade comercial de soja provenientes da mesma região produtora (região 1), apresentando variação de coloração de hilo. (b) Amostra de 10 sementes de variedade comercial de soja provenientes uma segunda região produtora (região 2), apresentando variação de coloração de hilo. O DNA foi extraído de cada semente fotografada e analisado com uma bateria de marcadores microsatélites.

MATERIAL E MÉTODOS

Processamento das amostras. Amostras de sementes de cada cultivar de soja foram fornecidas para análise em sacos lacrados e devidamente identificados pelo LADIC/ENPC/MA. As amostras foram identificadas originalmente pelo LADIC/ENPC/MA e esta informação foi seguida durante toda a análise. A análise genética foi realizada em experimentos "cegos", onde a relação de vínculo genético e/ou comercial entre as amostras não era conhecida, o que evitou qualquer tendenciosidade na declaração de identidade e/ou diferença genética entre as amostras. Para cada cultivar foram utilizadas inicialmente duas sub-amostras de trabalho de 50 sementes para a extração do DNA genômico total, sendo uma para a prova e outra para a contra-prova. Análise de sementes individuais da variedade foi realizada em casos onde havia indícios de contaminação ou mistura de sementes. A amostra de sementes foi macerada integralmente (pulverizada) para a obtenção de uma amostra homogênea de farelo. Para as amostras de 50 sementes maceradas, uma amostra de 250 miligramas de farelo foi utilizada no procedimento de extração de DNA. Para as sementes individuais a semente inteira foi utilizada no processo de extração.

Análise de amostra de prova e contra-prova. Foi utilizado um sistema de prova e contra-prova no processamento e análise das amostras. A primeira sub-amostra analisada foi utilizada para a prova. A segunda sub-amostra foi utilizada para a contra-prova e as duas armazenadas em locais distintos uma da outra. A prova foi processada independentemente da contra-prova em dias diferentes e por equipes técnicas distintas para a confirmação do resultado.

Extração e quantificação de DNA. Foi utilizado o procedimento de extração e quantificação de DNA genômico de tecidos vegetais descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998) modificado com a adição de uma etapa de purificação do DNA em coluna de troca iônica.

Locos microsatélites. Foi realizada uma triagem de um total de 21 locos microsatélites, dos quais foram selecionados 14 por apresentarem maior conteúdo informativo para discriminação genética individual, independência, melhor robustez e repetibilidade (Dwan & Cregan, 1997 - TAG 95:723-733):

- BARC-Sat1002 Sequência simples repetitiva de trinucleotídeo: grupo de ligação D2
- BARC-Sat1005 Sequência simples repetitiva de trinucleotídeo: grupo de ligação D1
- BARC-Sat1020 Sequência simples repetitiva de trinucleotídeos: grupo de ligação O
- BARC-Sat1045 Sequência simples repetitiva de trinucleotídeo: grupo de ligação E
- BARC-Sat1038 Sequência simples repetitiva de trinucleotídeo: grupo de ligação G
- BARC-Sat1070 Sequência simples repetitiva de trinucleotídeo: grupo de ligação F
- BARC-Sat1007 Sequência simples repetitiva de trinucleotídeos: grupo de ligação N1
- BARC-Sat_038 Sequência simples repetitiva de dinucleotídeo: grupo de ligação O
- BARC-Sat1070 Sequência simples repetitiva de trinucleotídeo: grupo de ligação B2
- BARC-Sat1000 Sequência simples repetitiva de trinucleotídeo: grupo de ligação C2
- BARC-Sat114 Sequência simples repetitiva de trinucleotídeo: grupo de ligação F
- BARC-Sat1050 Sequência simples repetitiva de trinucleotídeo: grupo de ligação C

S45035 "Kunitz trypsin inhibitor gene" sequência simples repetitiva de dinucleotídeo: GMABAB - sequência simples repetitiva de dinucleotídeo: grupo de ligação N1

PCR de microsatélites. Os iniciadores dos locos microsatélites foram marcados com fluorescência azul (FAM), verde (HEX), ou amarela (NED) para detecção no filtro virtual D. As reações de PCR para cada loco individualmente foram realizadas com 10 a 50 ng de DNA genômico de soja, em um volume total de 20 µl (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Determinação de genótipos. Os produtos amplificados foram carregados em gel de poliacrilamida e separados via eletroforese em um sequenciador ABI Prism 377XL e analisados com os softwares Genescan Analysis v. 2.1 e Genotyper 2.0. (Figura 1) **Interpretação Genética.** Os genótipos foram descritos com os alelos identificados em pares de bases, respeitando a natureza do microsatélite seja ele tri ou dinucleotídeo. Por ser a soja uma espécie autógama, o alelo observado em cada loco é tipicamente homólogo. Ocasionalmente foram observados dois alelos em um loco, o que seria evidência de heterozigose residual em caso de semente individual ou mistura de linhagens em caso de amostras de bulks de sementes. Para controle experimental, sempre foi utilizada uma mesma amostra de DNA padrão em todos os pares de eletroforese visando a comparação de estimativas de tamanhos de alelos em pares de bases entre experimentos distintos.

Análises estatísticas. Os dados experimentais gerados foram utilizados para definir o alelo presente em cada loco em cada uma das 125 amostras, levando em consideração a natureza molecular do loco microsatélite. Os dados experimentais foram submetidos a uma análise de distância genética utilizando-se a distância Euclidiana definida pela soma de quadrados das diferenças entre os alelos em pares de bases a todos os locos. Esta estimativa de distância é a mais adequada para este tipo de dado pois ela leva em conta não apenas o compartimento ou não do mesmo alelo ao loco, mas também a magnitude da diferença quantitativa entre os alelos em pares de bases o que é um reflexo da divergência genética como resultado do processo recorrente de mutação ("step-wise mutation model"). A matriz de distâncias Euclidianas foi em seguida submetida a uma análise de agrupamento utilizando o algoritmo UPGMA e os dados plotados em um dendrograma para melhor visualização das distâncias genéticas. Além da análise de distância, os dados genotípicos foram utilizados para a estimativa do número de alelos e das frequências dos alelos observados neste conjunto de 125 variedades comerciais. Sendo a soja uma espécie autógama, parte-se da premissa de que o coeficiente de endocruzamento é F = 1 e, portanto, a frequência de ocorrência de um genótipo homólogo (p²) é igual a própria frequência alélica p.

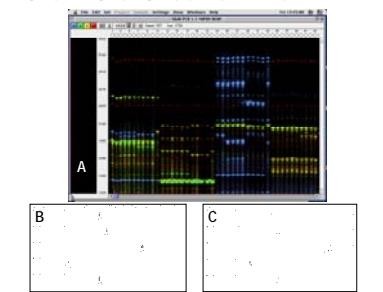


Figura 1. (A) Detalhe do gel de eletroforese com marcação fluorescente conforme detectado em sequenciador de DNA. (B) Exemplo de dendrograma observado com o marcador Sat1070 em quatro cultivares comerciais de soja (amostras 24, 25, 27, 33 e 34). (C) Exemplo de eletroforese observado com o marcador Sat1005 em quatro cultivares comerciais de soja (amostras 10, 14, 16, 17 e 18).

Tabela 1. Comparação de DNA extraído de sementes individuais da amostra de cultivar comercial de soja apresentando variação na coloração de hilo (variando de claro a escuro). Perfis genéticos em 14 locos microsatélites localizados em diferentes cromossomos da planta. Para cada semente analisada são apresentados o valor em pares de base (bb) de cada alelo observado em cada loco, após conferência dos genótipos em análise de prova e contraprova.

Cultivar	ANÁLISE DE SEMENTES INDIVIDUAIS EM 14 LOCOS MICROSATÉLITES LOCALIZADOS EM DIFERENTES CROMOSSOMOS DA PLANTA													
	SAT1002	SAT1005	SAT1007	SAT1020	SAT1038	SAT1045	SAT1050	SAT1070	SAT1070	SAT1070	SAT1070	SAT1070	SAT1070	SAT1070
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
8	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
10	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100



RESULTADOS E DISCUSSÃO

✓ Os dados relativos a diversidade alélica, banco de dados de frequências alélicas e estimativas de poder informativo dos marcadores microsatélites utilizados foram apresentados anteriormente (Grattapaglia et al., 2003).

✓ A grande maioria das amostras comerciais de soja apresentou um perfil genético claramente distinto das demais amostras analisadas, geralmente com mais de três diferenças genéticas, isto é, genótipos distintos em três ou mais locos. Nas 7.750 comparações par-a-par, foi verificado apenas um caso de identidade completa entre duas variedades de soja (amostras 67 e 75) para os 14 locos analisados. Isto é um indicativo claro de que a bateria de locos microsatélites utilizada é extremamente útil na discriminação de cultivares e linhagens experimentais de soja. Além disso, é provável que as duas cultivares com mesmo genótipo múltiplo tenham sido originalmente discriminadas por descritores morfo-agronômicos passíveis de efeito ambiental.

✓ O emprego de análise de DNA para discriminação varietal em soja representa um eficiente sistema de identificação genética de cultivares de baseado em uma tecnologia rápida, econômica e, mais importante, de alto poder de resolução para testes de DHE.

✓ Em outros três comparações par-a-par observou-se apenas um marcador com genótipo distinto entre as duas amostras. Estas duas foram: 76 e 112, 45 e 56A e 73 e 95. Para melhor resolver a distiguidabilidade genética destes três pares de amostras, sugere-se uma análise adicional com pelo menos outros seis locos microsatélites.

✓ A genotipagem de DNA de sementes individuais de uma mesma variedade de soja que apresenta variação para cor de hilo foi reveladora. Os 20 indivíduos analisados em 14 locos microsatélites apresentaram genótipos amostrados com clara evidência de coloração de hilo, algumas mais acinzentadas que outras. No entanto, todos os 20 indivíduos, em testes de prova e contraprova, apresentaram exatamente o mesmo genótipo múltiplo (Tabela 1). Estes resultados sugerem que maior atenção deve ser dada ao descritor "coloração de hilo" em estudos futuros.

✓ A análise individual permitiu distinguir facilmente entre heterozigose residual e mistura de sementes na variedade com variação para coloração de hilo.

✓ No estudo de variação de coloração de hilo, metade das sementes eram provenientes de uma região produtora e a outra metade de uma segunda localidade. No entanto, todos os indivíduos genotipados apresentaram o mesmo genótipo múltiplo. Há clara evidência, portanto, de um efeito ambiental na variação da coloração hilo. Como esta característica é adotada como um descritor de testes de DHE no Brasil, sugere-se uma avaliação detalhada da mesma. Os dados observados permitem questionar a continuidade deste descritor em testes de DHE. Vale lembrar que a coloração de hilo não é considerada como descritor em testes de DHE de outros países.

REFERÊNCIAS

- Ferreira, M.E. e Grattapaglia, D. 1998. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. EMBRAPA/CNEN/Gen, 220pp
- Grattapaglia D., Soares C.N. and Ferreira M.E. 2003. Development and genetic analysis of a database of multilocus microsatellite DNA fingerprints of the Brazilian protected soybean varieties. 4^o Congresso Brasileiro de Genética, Aguas de Lindóia, SP. Sociedade Brasileira de Genética, P.446

INTRODUÇÃO

O teste DHE (Distinguidabilidade, Homogeneidade e Estabilidade) é o procedimento técnico de comprovação de que uma nova cultivar ou uma cultivar essencialmente diferente é distinguível de outros materiais existentes no mercado. O teste tipicamente utiliza descritores morfológicos e agrônomicos para esta verificação, atestando ainda a homogeneidade da cultivar e a sua estabilidade na replicação das mesmas características ao longo de gerações sucessivas. Marcadores de DNA possibilitam a detecção direta da variabilidade existente na sequência de DNA entre os indivíduos analisados. Marcadores de DNA são extremamente potentes para a resolução de questões de identidade e discriminação e por isso atendem com perfeição os requerimentos do teste de DHE. Diversas tecnologias para a detecção de marcadores moleculares têm sido desenvolvidas nos últimos anos. Para a proteção de cultivares, além dos aspectos de co-dominância, estabilidade genética, baixa mutabilidade e robustez analítica, é absolutamente crucial que o marcador molecular utilizado permita determinar com precisão a identidade dos alelos e com isso fazer comparações acuradas de resultados em diferentes momentos e entre diferentes laboratórios.

Materiais Genéticos. Foram analisadas 125 variedades comerciais de soja plantadas no Brasil. Além disso, uma variedade comercial que apresenta variação para coloração de hilo teve sementes amostradas de plantas cultivadas em duas regiões brasileiras (região 1 e região 2). Foram selecionadas e fotografadas 10 sementes de diferentes plantas em cada região amostrada. O DNA foi extraído de cada semente individualmente para análise genética (Figura 1).