

5. Marcadores Moleculares em Recursos Genéticos Vegetais

Afonso Celso Candeira Valois



Engenheiro Agrônomo, Mestre, Doutor e Pós-Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisador Aposentado da Embrapa, Ex-Professor Associado da UnB, Ex-Professor Contratado da UEA/CEST, Ex-Secretário Municipal de Meio Ambiente de Tefê (AM).

Contextualização

Marcadores moleculares são ferramentas essenciais para a caracterização de indivíduos, que também inclui os organismos geneticamente modificados.

Os cromossomos contêm as unidades de informação que são transferidas de uma geração para outra, sendo que o DNA foi identificado como a molécula que contém a informação genética. Cada cromossomo contém uma longa e única molécula de DNA, além de proteínas que atuam na formação estrutural dessa molécula. As tecnologias disponíveis de análise molecular da variabilidade do DNA permitem determinar pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados de “marcadores moleculares”.

É definido como marcador molecular todo ou qualquer fenótipo molecular oriundo da expressão de um gene, como no caso das isoenzimas (múltiplas formas moleculares de uma mesma enzima presentes em uma espécie) ou segmentos específicos de DNA, que correspondem a regiões expressadas no genoma.

Um marcador molecular pode ainda ser definido como qualquer fenótipo molecular derivado de um polimorfismo específico na sequência de DNA, conhecido ou anônimo, que pode corresponder ou não a um gene expresso.

Quando se verifica o comportamento de acordo com as leis básicas da herança mendeliana, se define um marcador molecular como “marcador genético”, que se comprova, por exemplo, mediante o estudo do comportamento do marcador em uma população segregante.

Diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis para a detecção da variabilidade genética no nível da sequência de DNA, ou seja, para a detecção do polimorfismo genético. Essas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo.

Tais marcadores podem ser utilizados para as mais diversas aplicações, tanto no estudo de genética como na prática do melhoramento de plantas, dentre outros. O desenvolvimento tecnológico na área de marcadores moleculares tem sido espetacular e extremamente rápido.

Os principais marcadores moleculares até então conhecidos são os seguintes : Marcadores isoenzimáticos, polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e sequências simples repetitivas ou marcadores microssatélites (SSR). Além disso, estão disponíveis técnicas utilizadas na identificação de marcadores ou em estudos de expressão gênica, como: DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD), polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), polimorfismo de nucleotídeos únicos ou *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) e sítios identificados em sequências ou *Sequence Tagged Sites* (STS).



A tecnologia do DNA recombinante e o desenvolvimento da amplificação de segmentos de DNA via PCR abriram o caminho para a troca do paradigma genético básico da inferência no genótipo a partir do fenótipo, onde o monge agostiniano Gregor Johann Mendel (Figura 1) foi o pioneiro, em 1865, para a análise genética direta da variação na sequência de DNA. Essa troca de enfoque foi denominada de transição da genética “mendeliana” para a genética “genômica”.

Até ao meado dos anos 1960, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram aqueles controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual como nanismo, deficiência clorótica, morfologia foliar, coloração de folíolos e pétalas, cujos marcadores contribuíram de maneira significativa para o desenvolvimento teórico das análises de ligação para a construção das primeiras versões de mapas genéticos.

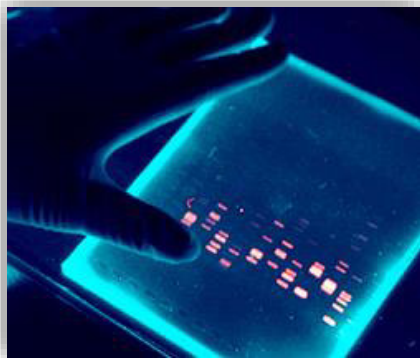
Entretanto, o pequeno número de marcadores morfológicos distintos em uma mesma linhagem reduz a probabilidade do encontro de associações significativas entre esses marcadores e caracteres de importância econômica, o que limita o emprego em programas de melhoramento genético.

Nesse plano, o grande avanço se iniciou com o descobrimento e utilização dos marcadores moleculares. Assim, o número de marcadores genéticos disponíveis foi ampliado em boa ordem de magnitude e a ampliação da técnica se estendeu praticamente a todas as espécies de plantas. Com o domínio das técnicas modernas de biologia molecular surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente no nível do DNA.

Inicialmente, a utilização de enzimas de restrição permitiu a análise de RFLP. Mais adiante, o desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia utilizando uma DNA-polimerase (PCR) conduziu à descrição de outras classes de marcadores moleculares. Essas metodologias aliadas às técnicas de clonagem e sequenciamento de DNA têm possibilitado obter e acumular grande número de informações sobre a estrutura do genoma eucariótico.

O uso intensivo dessa nova tecnologia contribuiu para o desenvolvimento do estudo das diversas classes de sequências repetitivas de DNA chamadas mini e microssatélites, outras ricas fontes de polimorfismo genético.

Diversas tecnologias para a detecção de marcadores moleculares têm sido desenvolvidas nos últimos anos, particularmente após a descoberta da PCR no final dos anos 80, com destaque para o RFLP e SSR. Marcadores RAPD têm contribuído significativamente para o rápido desenvolvimento de mapas genômicos, análise de variabilidade e “*fingerprinting*” ou impressão digital de DNA (Figura 2), além de assegurar a propriedade intelectual, bem como, outras vantagens.



Marcadores RAPD dispensaram a necessidade do desenvolvimento de sondas específicas empregando reagentes universais “de bancada” e forneceram uma entrada rápida e tecnicamente simples à análise de segregação, ligação genética, construção de mapas e “*fingerprinting*” de indivíduos.

A principal limitação dos marcadores RAPD é o baixo conteúdo informativo por loco, uma vez que esses marcadores tipicamente exibem uma herança dominante e tecnicamente detectam apenas um alelo por loco, sendo que todos os outros alelos são agrupados em uma única classe caracterizada pela ausência de amplificação de banda.

Os marcadores microssatélites são aqueles atualmente disponíveis que possuem o maior conteúdo informativo. O que distingue os microssatélites é a sua natureza multialélica, herança codominante, abundância e ampla distribuição no genoma e a possibilidade de detectar variações de sequência por meio de um ensaio simples de PCR, tal como RAPD e AFLP.

Adicionalmente, marcadores SSR em geral são altamente transferíveis de genoma para genoma dentro de uma espécie e frequentemente entre espécies geneticamente relacionadas. Nos últimos anos, o desenvolvimento de marcadores, baseados em SSR, tem se tornado cada vez mais acessível, principalmente devido a estratégias inovadoras de enriquecimento de bibliotecas genômicas e a tecnologias rápidas de sequenciamento automático baseadas em fluorescência.

Em teoria, o uso de genes como marcadores ao invés de marcadores anônimos de DNA (tais como RAPD, AFLP ou SSR) pareceria ser a melhor escolha, uma vez que isto facilitaria o estabelecimento de relações entre genes candidatos e QTL (loco controlador de característica quantitativa) específicos mapeados em sua vizinhança, isto é, o uso da abordagem do “gene candidato”.

Na prática, as sequências de cDNA são muito mais conservadas e, portanto, a detecção de polimorfismo de sequência e variação alélica de indivíduos se torna uma tarefa relativamente árdua com a tecnologia atual. Tem sido possível identificar SNP a partir do sequenciamento de cDNA e análise de *clusters* por meio da bioinformática, também extremamente importante na identificação de marcadores moleculares.

Na construção de mapas de ligação em *Eucalyptus* spp., por exemplo, já foram utilizados QTL na identificação de regiões genômicas que têm efeitos significativos na expressão de caracteres economicamente importantes como: a) características juvenis (altura de plântulas,

área foliar e tolerância da muda a geadas; b) habilidade de propagação vegetativa (enraizamento adventício, brotamento de toco e multiplicação de plântulas *in vitro*); c) idade da rotação (crescimento volumétrico, densidade básica da madeira, espessura da casca e forma do caule).

A detecção e expressão de QTL que controlam características quantitativas, tais como altura da planta ou produtividade em patrimônios genéticos (*backgrounds*) distintos parece ser uma abordagem importante para espécies anuais e deve ser ainda melhor para espécies perenes geneticamente heterogêneas.

A seleção assistida por marcadores (SAM) em plantas é essencialmente um sinônimo de retrocruzamento assistido por marcadores. A aplicação mais direta dessa tecnologia está se tornando comum em programas de melhoramento genético de plantas anuais em todo o mundo.

Marcadores moleculares fortemente ligados a alelos favoráveis a serem introduzidos a partir de um genitor silvestre para uma linhagem comercial ou de uma linhagem para outra são usados para monitorar a herança em gerações de retrocruzamento. Ao mesmo tempo, a seleção é realizada para marcadores do genitor recorrente com o objetivo de recuperar o mais rápido possível, a maior proporção do genoma recorrente.

Tecnologias de análise genômica com marcadores moleculares estão em constante e rápida evolução, sendo a caracterização da variação da sequência de DNA entre indivíduos, em grande número de amostras e com ampla cobertura genômica, um dos grandes desafios.

Diversas tecnologias que dispensam o uso de eletroforese baseando-se na hibridação de DNA em lâminas de algumas dezenas de milímetros quadrados contendo moléculas de DNA muito específicas imobilizadas em arranjos sistemáticos, os chamados *microarrays* ou DNA *chips* estão se tornando disponíveis, principalmente para serem usados em análise genética de seres humanos e organismos modelos.

A tecnologia de *microarrays* está acelerando enormemente a análise de expressão gênica de milhares de genes “em paralelo” (simultaneamente), sendo esperado que venha a revolucionar os procedimentos de genotipagem individual, geração de perfis de expressão e mapeamento de ligação em organismos vivos.

O DNA *chips* permite ainda a exploração de uma das classes mais abundantes de polimorfismos de DNA em genomas de eucariotos, isto é, os SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) ou polimorfismo de nucleotídeos únicos, atualmente bastante utilizados em programas de seleção assistida por marcadores moleculares (SAM).

Em seres humanos a disponibilidade de grande número de marcadores STS, ou seja, sítios identificados (etiquetados) por sequências levará ao desenvolvimento de um grande número de marcadores bi alélicos baseados em SNP.

Referências bibliográficas

VALOIS, A. C. C. **Biodiversidade, biotecnologia e organismos transgênicos**. Brasília, DF: Embrapa, 2016. 217 p. (Texto para Discussão/Embrapa. Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento; 46).