

Comunicado 148

Técnico

ISSN 1808-6802
Dezembro, 2013
Bento Gonçalves, RS

Foto: Luis Fernando Revers.



Identificação Varietal e Genotipagem de Macieiras Utilizando Testes de DNA

Luis Fernando Revers¹
Carlos Alberto Ely Machado²
Marcos Aurélio Marangon³
Vanessa Buffon⁴

Introdução

A identificação de cultivares de macieira é tradicionalmente baseada em descritores agrônômicos, por meio da comparação entre as características morfológicas da planta, como as das folhas, tipos de brotos, características dos frutos e outros caracteres (JACKSON, 2003). No entanto, a perícia em morfometria de características agrônômicas é restrita a um número pequeno e cada vez menor de especialistas. Além disso, a expressão das características morfológicas é influenciada por fatores ambientais, pela biologia da planta e por seu histórico; e plantas jovens são quase impossíveis de se identificar, porque, com quatro ou cinco anos, ainda não exibem características morfológicas típicas de plantas adultas. Algumas cultivares relacionadas geneticamente são morfologicamente muito similares e difíceis de diferenciar mediante comparação botânica (JACKSON, 2003). Por outro lado, clones intravarietais podem diferir consideravelmente no

fenótipo, mesmo que tenham perfis de DNA praticamente idênticos (GALLI et al., 2005).

Para superar as limitações de descritores morfológicos, marcadores moleculares baseados em DNA têm sido utilizados para diferenciar, caracterizar e identificar as cultivares de macieira existentes mais cultivadas (GUILFORD et al., 1997; GIANFRANCESCHI et al., 1998; HOKANSON et al., 1998; HOKANSON et al., 2001; GALLI et al., 2005). Os marcadores moleculares do tipo microssatélite, também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeat*), são baseados na amplificação de sequências repetidas (1 a 6 pares de base), originalmente desenvolvidos para marcação do genoma humano (LITT; LUTY, 1989; WEBER; MAY, 1989), mas abundantemente encontrados no genoma de eucariotos (LAGERCRANTZ et al., 1993; WANG et al., 1994). Devido à distribuição

¹ *Biólogo., Dr., Pesquisador, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. E-mail: luis.revers@embrapa.br.*

² *Eng. Agrôn., Pesquisador, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. E-mail: carlos.machado@embrapa.br.*

³ *Eng. Agrôn., M.Sc., Analista, Embrapa SNT/EN, Canoinhas, SC. E-mail: marcos.marangon@embrapa.br.*

⁴ *Farmacêutica, Analista, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. E-mail: vanessa.buffon@embrapa.br.*

regular no genoma de eucariotos, multialelismo (alto nível de polimorfismo), padrão de segregação codominante e reprodutibilidade, esse tipo de marcador tornou-se amplamente utilizado e adequado para muitas aplicações genéticas. Entre elas, destacam-se os testes de identidade genética, em que há necessidade de discriminação de indivíduos e identificação de parentesco, além de serem utilizados nos trabalhos de mapeamento genético (MALIEPAARD et al., 1997).

A utilização de marcadores microssatélites para a construção de bancos de dados e identificação de cultivares de macieira pode simplificar a identificação de erros e sinonímias no manejo de viveiros de produção de mudas e de coleções de germoplasma de macieira. As principais aplicações da metodologia estão na identificação precisa de cultivares de macieira, recuperação de genealogias e genotipagem de novas cultivares (visando a auxiliar no registro da cultivar e na proteção intelectual). Conseqüentemente, essas práticas podem, também, ser utilizadas em procedimentos modernos de controle nas cadeias produtivas, como: rastreabilidade, registro de cultivares, certificação de origem genética de mudas por viveristas, visando a atender requisitos de denominações de origem e indicações de procedência controladas.

A identificação varietal de cultivares de macieira utiliza um banco de dados especializado, denominado BanMalus, desenvolvido na Embrapa Uva e Vinho, contendo mais de 965 perfis genético-moleculares compilados de coleções de dados de macieira internacionais (França, Itália, Nova Zelândia, Estados Unidos, etc.), da literatura internacional especializada em macieira e gerados pelas atividades de pesquisa do Laboratório de Genética Molecular Vegetal (LGMV). Cultivares de macieira podem ser identificadas comparando-se o perfil de marcadores de DNA de uma amostra desconhecida de macieira com perfis conhecidos no banco de dados ou de amostras referência. A identificação pode ser realizada para qualquer cultivar de macieira e de porta-enxerto.

Identificação de cultivares de macieira baseada em teste de DNA

Para a realização do teste de DNA, a amostra da macieira em questão é genotipada utilizando-se um

número cientificamente relevante de marcadores microssatélites, e o perfil do teste de DNA resultante é comparado ao de uma cultivar referência em um banco de dados de cultivares conhecido, permitindo a identificação da cultivar correspondente à amostra testada. Visando ter maior confiabilidade, pelo menos seis *loci* de marcadores microssatélites suficientemente capazes de distinguir um número elevado de cultivares de macieira são utilizados, conforme descrito por Galli et al. (2005). O conjunto padrão de microssatélites adotado pela Embrapa Uva e Vinho é constituído pelos *loci* CH03g07, CH04e03, CH05d11, CH05d11, CH05c02, Cho4g10 e CH05e03 (GALLI et al., 2005). Adicionalmente, conforme avaliação caso a caso, três a quatro *loci* de marcadores SSR adicionais poderão ser utilizados, visando a elevar o grau de confiabilidade do teste. Padrões de perfis genéticos previamente conhecidos são utilizados como referência para a realização do teste de identificação genética.

Todas as etapas de realização desse tipo de teste são conduzidas por pessoal técnico qualificado, seguindo os conceitos de boas práticas laboratoriais, e os resultados são revisados pela equipe do LGMV antes da emissão do laudo técnico. O laudo a ser emitido por ocasião da finalização do teste de DNA descreverá em detalhes os procedimentos realizados, expressando a probabilidade de identidade da amostra fornecida com amostras padrão. As estimativas de probabilidade de identidade genética são obtidas explorando-se as frequências de distribuição alélicas, conforme descrito por Paetkau et al. (1995), utilizando-se o software Identity (WAGNER; SEFC, 1999). O programa Identity foi originalmente desenvolvido por Wagner e Sefc (1999) para a realização de estudos com dados de microssatélites e identificação de sinonímias no gerenciamento de bancos de germoplasma de videira. Utilizando esse princípio, o programa faz buscas nos perfis de dados de microssatélites fornecidos por genótipos idênticos, permitindo, então, identificarem-se cultivares iguais. Adicionalmente, as amostras são também analisadas pela determinação de medidas de identidade de Nei (1972), por meio do emprego do software Popdist versão 1.2.4. A partir das matrizes obtidas, pode-se gerar dendogramas para facilitar a visualização de resultados de testes com múltiplas amostras, como foi observado na Figura 1. Além disso, medidas de heterozigosidade observada e esperada e conteúdo de informação polimórfica

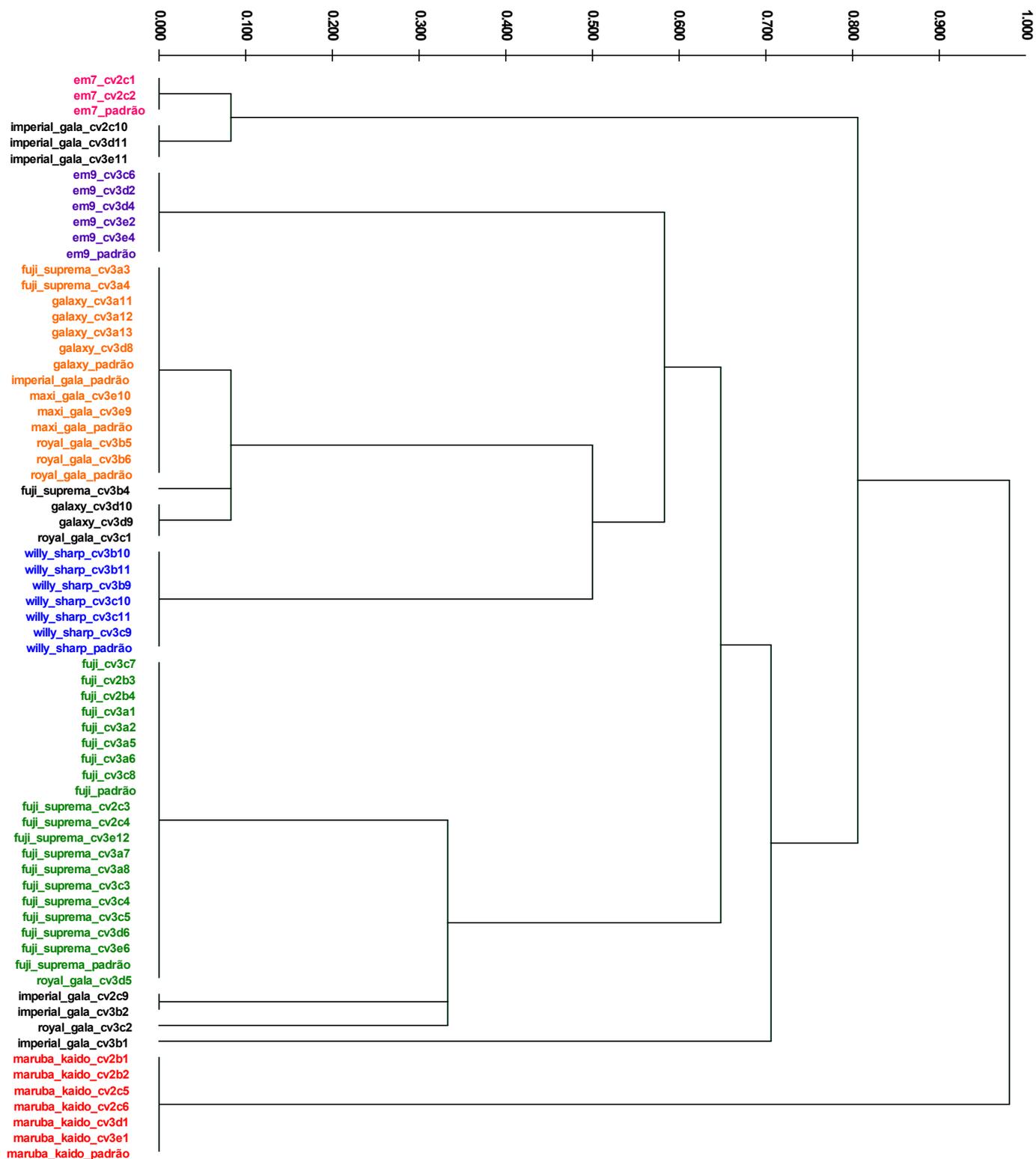


Fig. 1. Dendrograma ilustrando grupos de cultivares geneticamente idênticos. Acessos geneticamente idênticos aos seus respectivos padrões de referência estão representados em diferentes cores. Em preto, estão indicados acessos cujo perfil não pode ser associado a um padrão de referência conhecido. Padrões de referência estão indicados como "nome da cultivar padrão". Todos os acessos agrupados aos padrões de referência são considerados pelo teste como geneticamente idênticos. A escala superior indica a distância genética estimada.

também são determinados para cada loco utilizando-se o software Cervus 3.0 (KALINOWSKI et al., 2007) para dar suporte suplementar à interpretação dos resultados.

A Figura 1 mostra um exemplo de teste de identificação genética realizado para sessenta e nove acessos de macieira. Nesse exemplo, o demandante possuía dúvidas sobre se os diferentes acessos de seus viveiros correspondiam a cultivares do grupo “Fuji”, grupo “Gala”, “Willy Sharp” ou de diferentes tipos de porta-enxertos. Após a realização do teste, as estimativas de probabilidade de identidade são calculadas para cada amostra fornecida ao LGMV, permitindo a identificação precisa da cultivar correspondente à amostra padrão (referência). A partir das matrizes de identidade obtidas, foi construído um dendograma baseado em agrupamento médio não ponderado, permitindo visualizar mais facilmente o resultado do teste. As cultivares geneticamente idênticas formam grupos cuja probabilidade estimada de identidade é superior a 95%, e cuja distância genética entre acessos é igual a zero. A Tabela 1 resume o conjunto de dados adicionais identificado para cada *locus* de microssatélite testado na população de sessenta e nove acessos de macieira analisados. Os dados obtidos revelam um grau de diversidade alélica elevado, que reflete diretamente no poder de discriminação do conjunto de *loci* de microssatélites utilizados.

Limitações relacionadas ao teste de DNA para identificação de macieiras

Apesar de o banco de referência de dados da Embrapa Uva e Vinho ser bastante completo e de ser possível o acesso aos bancos de dados e à literatura internacionais, esses não possuem todas as cultivares conhecidas. Não existindo perfil genético-molecular de referência para comparação com a amostra submetida, não será possível realizar a identificação.

A tecnologia utilizada não tem o poder de distinguir variantes de uma cultivar de macieira. Perfis genético-moleculares de variantes referidas comumente como mutações somáticas, propagadas de forma clonal, serão idênticos, apesar de as diferenças observadas na planta e frutos serem significantes (GALLI et al., 2005) (Figura 1 ou Tabela 1).

Designações numéricas utilizadas para definir o tamanho dos alelos de microssatélites podem diferir sensivelmente entre laboratórios devido a diferenças metodológicas. Ajustes para diferenças observadas entre laboratórios poderão ser realizados referenciando-se cultivares comuns que possuam os mesmos alelos daqueles das amostras analisadas. Genótipos ambíguos para um determinado marcador SSR podem ser observados ocasionalmente. Essas ambiguidades, consequência normal da metodologia, podem ser solucionadas se os genitores da cultivar forem incluídos nas análises. Elas não constituem um problema na geração de um perfil único para a cultivar testada, uma vez que os resultados para outros marcadores SSR são geralmente corretos, e esses podem, sozinhos, caracterizar uma cultivar de macieira unicamente.

Genotipagem de novas cultivares de macieira

Essa caracterização é utilizada para criar um perfil genético-molecular característico (assinatura molecular) de uma cultivar de macieira, de maneira a auxiliar no registro da cultivar e em sua proteção intelectual. Para esse propósito, duas amostras separadas de uma cultivar são genotipadas para um número cientificamente relevante de marcadores microssatélites (SSR) e uma assinatura genético-molecular única é gerada. São utilizados de seis a doze marcadores SSR, um número suficiente para identificar unicamente qualquer cultivar de macieira com grau de confiabilidade extremamente alto.

Como proceder para realizar um teste de DNA

Para utilizar o serviço de identificação varietal de macieiras utilizando testes baseados em marcadores de DNA, deverá ser realizado um acordo entre o usuário e a Embrapa Uva e Vinho, no qual serão discriminados o tipo do serviço a ser realizado, a identificação e o número de amostras submetidas (o formulário está disponível no setor de recebimento de amostras da Embrapa Uva e Vinho). Em virtude do elevado custo, o serviço somente será iniciado após o acordo de ambas as partes. Os custos dos serviços, o tempo para execução e a liberação de resultados podem ser consultados diretamente no setor de recebimento de amostras da Embrapa Uva e Vinho.

Tabela 1. Composição alélica observada dos sessenta e nove acessos de macieira analisados para seis *locus* de SSR.

Locus	Nº alelos	Tamanho dos alelos (em pb)	HObs ^a	HEsp ^b	PIC ^c
CH03g07	6	120, 122, 126, 130, 181, 210	1.000	0.776	0.736
CH05c02	7	163, 169, 171, 173, 197, 199, 203	0.536	0.624	0.589
CH04e03	6	185, 186, 195, 197, 201, 203	0.913	0.719	0.666
CH04g10	6	122, 127, 135, 141, 144, 167	0.594	0.759	0.720
CH05d11	9	167, 169, 171, 182, 183, 193, 194, 195, 221	0.638	0.627	0.594
CH05e03	8	130, 149, 163, 168, 172, 173, 186, 191	0.899	0.834	0.804

^a HObs = heteroziguidade observada; ^b HEsp = heteroziguidade esperada; ^c PIC = conteúdo de informação polimórfica.

Referências

- GALLI, Z.; HALÁSZ, G.; KISS, E.; HESZKY, L.; DOBRÁNSKI, J. Molecular identification of commercial apple cultivars with microsatellite markers. **Hortscience**, Alexandria, v. 40, n. 7, p. 1974-1977, 2005.
- GIANFRANCESCHI, L.; SEGLIAS, N.; TARCHINI, R.; KOMJANC, M.; GESSLER, C. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 96, n. 8, p. 1069-1076, 1998.
- GUILFORD, P.; PRAKASH, S.; ZHU, J. M.; RIKKERINK, E.; GARDINER, S.; BASSETT, H.; FORSTER, R. Microsatellites in *Malus X domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 94, n. 2, p. 249-254, 1997.
- HOKANSON, S. C.; SZEWC-MCFADDEN, A. K.; LAMBOY, W. F.; MCFERSON, J. R. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity, and relationships in a *Malus x domestica* Borkh. core subset collection. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, n. 5-6, p. 671-683, 1998.
- HOKANSON, S. C.; SZEWC-MCFADDEN, A. K.; LAMBOY, W. F.; MCFERSON, J. R. Microsatellite (SSR) variation in a collection of *Malus* (apple) species and hybrids. **Euphytica**, v. 118, n. 3, p. 281-294, 2001.
- JACKSON, J. E. **Biology of apples and pears**. New York: Cambridge University, 2003.
- KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 1099-1006, 2007.
- LAGERCRANTZ, U.; ELLEGREN, H.; ANDERSSON, L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. **Nucleic Acids Research**, London, v. 21, n. 5, p. 1111-1115, 1993.
- LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of A dinucleotide repeat within the cardiac-muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 44, n. 3, p. 397-401, 1989.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, Chicago, v. 106, p. 283-292, 1972.
- PAETKAU, D.; CALVERT, W.; STIRLING, I.; STROBECK, C. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Molecular Ecology**, Edmonton, v. 4, n. 3, p. 347-354, 1995.
- WAGNER, H. W.; SEFC, K. M. **Identity, 1.0**. Wienn: University of Agricultural Sciences, Centre for applied genetics, 1999.
- WANG, Z.; WEBER, J. L.; ZHONG, G.; TANKSLEY, S. D. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 88, n. 1, p. 1-6, 1994.
- WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain-reaction. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 44, n. 3, p. 388-396, 1989.

Comunicado Técnico, 148

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Uva e Vinho
Rua Livramento, 515 - Caixa Postal 130
95700-000 Bento Gonçalves, RS
Fone: (0xx) 54 3455-8000
Fax: (0xx) 54 3451-2792
<https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/>
1ª edição

Comitê de Publicações

Presidente: *César Luis Girardi*
Secretária-Executiva: *Sandra de Souza Sebben*
Membros: *Adeliano Carginin, Alexandre Hoffmann, Ana Beatriz da Costa Czermainski, Henrique Pessoa dos Santos, João Caetano Fioravanço, João Henrique Ribeiro Figueredo, Jorge Tonietto, Luisa Veras de Sandes Guimarães e Viviane Maria Zanella Bello Fialho*

Expediente

Editoração gráfica: *Alessandra Russi*
Normalização bibliográfica: *Luisa V. de S. Guimarães*