

POLIMORFISMO GENÉTICO EM VEGETAIS: TÉCNICAS DE DETECÇÃO

GENETIC POLYMORPHISM IN VEGETABLES: DETECTION TECHNIQUES

Sirlene Brasil de Oliveira Bezerra¹, Elisângela Xavier Andrade²

¹Pós-graduada em Biotecnologia, Universidade Estadual de Maringá (UEM), graduada em Biologia pela Universidade Federal do Acre (UFAC), mestranda do Programa de Pós Graduação em Conservação e Uso de Recursos Naturais (PPGReN), Universidade Federal de Rondônia (UNIR). E-mail: sirlenebrasil.bio@gmail.com. ²Pós graduada em Educação Profissional na Área de Saúde: ENFERMAGEM pela Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (ENSP), mestranda do Programa de Pós Graduação em Conservação e Uso de Recursos Naturais (PPGReN), Universidade Federal de Rondônia (UNIR). E-mail: exandrade95@gmail.com.

DOI: <https://doi.org/10.37157/fimca.v7i2.131>

RESUMO

O estudo filogenético possui a capacidade de explicar de forma analítica a vasta variabilidade genética apresentada em nosso planeta. A partir de técnicas relativamente simples e baratas como o PCR e o sequenciamento de Sanger, houve a possibilidade de se explicar como se dava essa variabilidade, que é o polimorfismo. O polimorfismo é quando a sequência de DNA apresenta mutações, que podem ser pontuais, que causam ou não alteração fenotípica no indivíduo. Mesmo que na maioria dos casos essa alteração não acarrete em grandes mudanças, em alguns casos ela pode ser tão drástica, que o indivíduo não será mais parte de uma espécie, e assim se dá a diversidade. Através do estudo do polimorfismo é que atualmente podemos agrupar as espécies não só por suas características fenotípicas, mas também por suas características genotípicas, o que refina mais ainda o agrupamento. O reino Plantae além de apresentar vasta diversidade no planeta, possui os elementos básicos para manter a vida dos outros reinos, sendo alvos importantes na biologia molecular. A presente revisão teve o objetivo de demonstrar técnicas mais utilizadas para a detecção de polimorfismo em plantas.

Palavras chave: Plantae. PCR. Marcadores moleculares. Mutação. Diversidade.

ABSTRACT

The phylogenetic study has the ability to explain analytically the vast genetic variability presented on our planet. Using relatively simple and inexpensive techniques such as PCR and Sanger sequencing, it was possible to explain how this variability, which is the polymorphism, took place. Polymorphism is when the DNA sequence has mutations, which can be punctual, whether or not they cause phenotypic changes in the individual. Even though in most cases this change does not lead to major changes, in some cases it can be so drastic, that the individual will no longer be part of a species, and so is diversity. Through the study of polymorphism, we can currently group species not only for their phenotypic characteristics, but also for their genotypic characteristics, which further refines the grouping. The Plantae kingdom, in addition to presenting vast diversity on the planet, has the basic elements to maintain the life of other kingdoms, being important targets in molecular biology. The present review aimed to demonstrate techniques most used for the detection of polymorphism in plants.

Key words: Plantae. PCR. Molecular markers. Mutation. Diversity.

INTRODUÇÃO

O polimorfismo genético é a frequência de variantes nas populações. Caso uma população apresente uma frequência alélica >1% em um locus, é denominado como polimorfismo, porém, quando a presença de alelos variantes for inferior, ela é denominada como particular. Essa variação pode ser detectada em todas as espécies e é justamente um dos mecanismos que permitem a diversidade de espécies no nosso planeta (LEITE, 2015; CARVALHO, 2018; SINGH; SINGH, 2018).

As plantas, assim como qualquer outro organismo vivo na Terra, apresentam variabilidade genética, e esse tipo de mecanismo influencia não só na diversidade natural como na sustentabilidade, pois há melhor adaptação ao ambiente. A detecção de polimorfismos em um organismo pode possuir o objetivo de avaliar, melhorar ou comparar o espécime. Para conseguir realizar a detecção, a caracterização molecular possui um papel fundamental, pois consegue detalhar o conteúdo gênico de um indivíduo (LEITE, 2015; CARVALHO, 2018; TABATABAEI et al., 2019).

Os marcadores moleculares são comumente utilizados para se obter um padrão de fenótipo molecular de um gene expresso ou de um segmento de DNA. Para se obter um padrão molecular de uma determinada espécie, pode-se realizar técnicas de clivagem de DNA com enzimas de restrição que foram selecionadas de acordo com o padrão de restrição presente no DNA do indivíduo (DA SILVA et al., 2011; SHARMA et al., 2018).

Normalmente esse tipo de abordagem utiliza locais do DNA que apresentam menor pressão de seleção, ou seja, caso ocorra variação, o organismo não possuirá alterações tão marcantes e conseguirá manter suas funções. As regiões

com menor pressão de seleção normalmente estão em regiões de não codantes, já as regiões de DNA que codificam proteínas parecem sofrer maior pressão de seleção. Esse padrão de regiões com maior e menor pressão de seleção funcionam de forma natural, visto que alterações drásticas em um organismo levará a uma não conformidade em suas funções e/ou estrutura e o indivíduo não será viável (SCHNEIDER et al., 2019).

O uso de marcadores moleculares auxilia na obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismo genético, possui baixa influência de variações ambientais e podem ser utilizados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta.

Os marcadores podem ser classificados de acordo com o tipo de herança alélica em dominantes e codominantes. Os marcadores codominantes possibilitam diferenciar indivíduos homocigotos e heterocigotos, o que não é possível com marcadores dominantes, para os quais apenas é possível identificar a presença ou ausência de um determinado alelo. Então os marcadores codominantes normalmente geram mais informação sobre polimorfismo, e é utilizado amplamente para diversos tipos de análises genéticas. É uma ferramenta útil para seleção de genitores contrastantes para os genes de interesse, aumentam o grau de discriminação de linhagem e indicam a pureza genética. Os métodos de marcadores codominantes mais utilizados em plantas são: SCAR (Regiões amplificadas caracterizadas por sequências), SSR (Sequências simples repetidas), SNP (Polimorfismos de base única) (MOTA, 2015).

O método SCAR foi desenvolvido logo após o RAPD, em que consiste basicamente na utilização de sequências já caracterizadas. Dessa forma os marcadores são obtidos por clonagem, sequenciamento e síntese de um par de

primers, que é realizado utilizando o perfil nested, utilizando o produto inespecífico de RAPD. Os marcadores STS são desenvolvidos por sequências utilizadas a partir dos marcadores sintetizados de RFLP, essa técnica consiste em amplificar o DNA com sequências repetitivas no primeiro amplificador e no segundo DNA de cópia simples (MOTA, 2015).

Os marcadores SSR (Sequências simples repetitivas) ou STR (Sequências curtas em tandem) amplificam unidades repetitivas de DNA denominadas como microssatélites, que são locais do DNA onde não há força seletiva elevada, aumentando as possibilidades de haver alterações de bases. O marcador SSR apresentam elevado nível de informação, pode detectar múltiplas formas alélicas por marcador e possui alta frequência em genomas de plantas. Os minissatélites, também denominados na literatura como VNTR (*Variable number of tandem repeats*) são sequências repetidas em tandem (6 a 100 bp), e apresenta polimorfismos. (MOTA, 2015; OLIVEIRA, 2015).

Geralmente para se detectar alterações na sequência do DNA e SNPs (*single nucleotide polymorphism*) são utilizadas as técnicas de PCR, qPCR e enzimas de restrição (RFLP). Porém, para se realizar os métodos de PCR citados acima, é necessário conhecer previamente a sequência de nucleotídeos da espécie estudada, e nem sempre é um procedimento rápido. Por esse motivo, houve o desenvolvimento do chamado *Arbitrarily Primed* - PCR (RAPD) em que se utiliza primers (oligonucleotídeos iniciadores) com sequências aleatórias possuindo cerca de 20 nucleotídeos (DA SILVA et al., 2011; MAZROOEI; GHAZALA, 2018; SCHNEIDER et al., 2019).

REFERENCIAL TEÓRICO

Os marcadores moleculares são fortes instrumentos na área de biotecnologia que permitem a caracterização de diferentes espécies, podem selecionar variabilidade em nível de DNA e assim, comparando distintos genótipos diferenciar dois indivíduos segundo o padrão de polimorfismo singular. Após essa identificação, é possível então verificar a relação entre os genótipos e fenótipos e diversidade genética (COSTA, 2018; DI SALVO et al., 2018; ROSA, 2018; SCHNEIDER et al., 2019).

No caso da técnica de PCR é realizada a amplificação do fragmento gênico com um primer específico, que após será detectado em eletroforese de gel de agarose ou então da própria reação de polimerização, é realizado o sequenciamento de Sanger, que a partir do manejo do software é obtido o alinhamento das sequências (Figura 1) em busca de bases nitrogenadas ausentes, com adição ou até mesmo troca de bases. Os SNPs podem impactar em alterações significativas em uma proteína, mas também podem ser apenas um recurso para a diferenciação de uma espécie para a outra (GANESH et al., 2018).

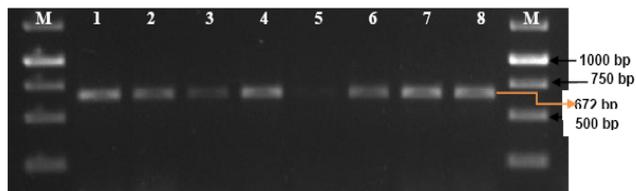


Figura 1. Gel de agarose. Em M: Marcador molecular de 1kb; Em 5: Controle negativo; Em 6: Controle positivo; Em 1-4 e 7-8 amostras reais. Fonte: GANESH e cols. (2018).

Utilizando as enzimas de restrição (Figura 2), com o ensaio de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), como informado anteriormente ocorre a clivagem das sequências de DNA com padrão específico. Quando realizado o estudo *in silico* deve-se então verificar quais os alvos, para ser possível observar a diferença quando esse DNA for submetido a eletroforese em gel de agarose, ou seja, se o objetivo é verificar a alteração de padrão de restrição, deve-se utilizar pelo menos duas enzimas: uma que é promiscua, ou seja, cliva diversos tipos de sequências e uma que é mais seletiva. Assim provavelmente será obtido dois padrões distintos (MAZROOEI; GHAZALA, 2018; MARILLONNET; WERNER, 2019).

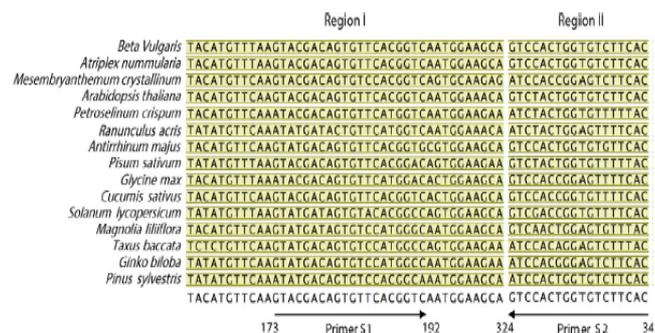


Figura 2. Exemplo de alinhamento de sequências. À esquerda as espécies foram listadas; as regiões I e II foram divididas para produzir *in silico* os primers nos locais contendo SNPs. Fonte: MAZROOEI; GHAZALA (2018)

O PCR em tempo real (Figura 3), denominado qPCR, pode apresentar resultados quantitativos e/ou qualitativos, essa técnica é realizada da mesma forma que a PCR, mas também é capaz de detectar a temperatura de dissociação de um fragmento gênico (de aproximadamente 100 bp). A ligação entre os pares de bases GC ou AT possuem uma temperatura diferente de dissociação de aproximadamente 0,5 °C. Quando um fragmento gênico possui o SNP, é possível detectar a diferença de temperatura entre um fragmento gênico e outro. O ensaio deve utilizar outro gene que é sempre expresso no indivíduo, normalmente é escolhido o gene GAPDH (LI et al., 2012).

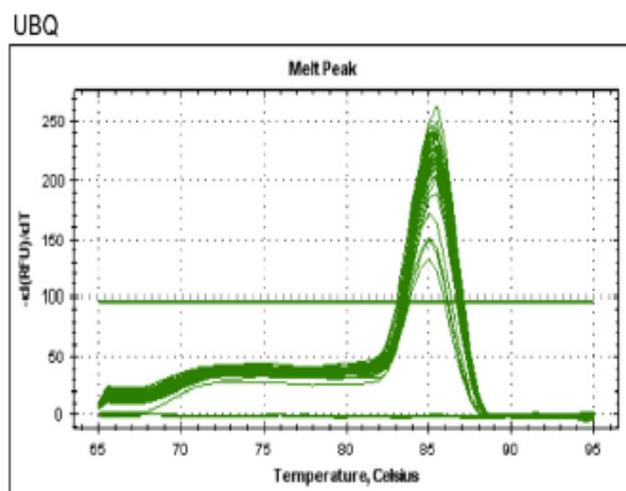


Figura 3. Resultado de qPCR. No eixo X é possível observar a temperatura de dissociação, já no eixo Y o número de cópias presente em cada fragmento, de acordo com o ciclo. Fonte: Li e cols. (2012).

O sequenciamento de última geração (Figura 4) é uma técnica relativamente barata (se já houver a disponibilidade

do equipamento), possui a capacidade de realizar o mapeamento do genoma total ou parcial do indivíduo e apresenta rapidamente o resultado. Após a obtenção do resultado, diversos softwares realizam o alinhamento das sequências de forma relativamente fácil também. Essas sequências são então comparadas com outras de indivíduos da mesma espécie e até mesmo de outras espécies (LEE et al., 2018).

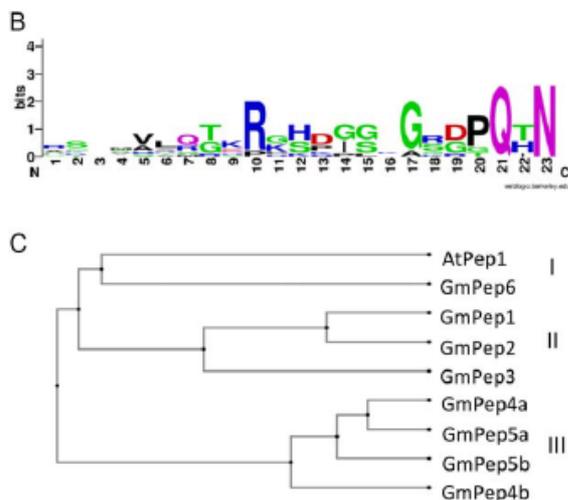


Figura 4. Sequenciamento de RNA. Em B: Confirmação do resíduo 15; C: Árvore filogenética.

O método de amplificação de fragmento de DNA por RAPD é relativamente simples e mais barato quando comparado ao sequenciamento de última geração, sendo que é necessário utilizar apenas um tipo de primer para cada reação. Esses primers são formados por diferentes combinações das bases nitrogenadas de forma aleatória, e o seu conteúdo GC fica entre 50% e 70%. O primer então se liga às sequências complementares presentes nas fitas opostas do DNA alvo e é então amplificado o segmento de DNA (VIEIRA; NODARI, 2007; LEITE, 2015; SILVA et al., 2015).

O DNA amplificado é então aplicado em gel de agarose (**Figura 5**) para ser realizada a separação dos produtos, e por meio da aplicação do padrão molecular no gel, é possível inferir o tamanho de cada fragmento de DNA obtido. O polimorfismo nessa técnica é detectado pela presença de um fragmento amplificado de DNA em uma amostra e a não amplificação na outra amostra, que podem ser decorrentes de uma deleção, duplicação ou mutação do DNA, sendo necessário realizar o sequenciamento do DNA caso o pesquisador queira saber o conteúdo obtido no fragmento gênico (LEITE, 2015).

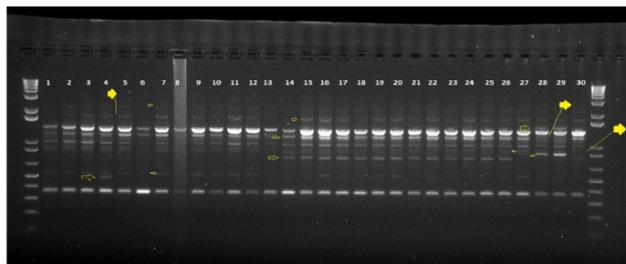


Figura 5. Imagem de gel de agarose após realização de RAPD. O DNA foi corado com Brometo de etídio, que é capaz de se ligar a cada 2 pares e meio de base aproximadamente. Nas setas o autor identifica os padrões polimórficos. Fonte: LEITE (2015)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista as informações apresentadas neste trabalho, é possível afirmar que a área de biotecnologia vegetal está crescendo e se modernizando de acordo com a tecnologia. Os marcadores moleculares utilizados como técnicas de detecção são importantes para ser possível mapear e diferenciar a ampla diversidade observada nas espécies vegetais. Os estudos filogenéticos baseados no fenótipo não são precisos quando comparados com os estudos genotípicos, estes através de técnicas altamente eficientes permitiram maior confiabilidade nos estudos da variabilidade genética de muitas espécies de plantas. Sendo assim, o uso de marcadores é importante para o melhoramento genético de espécies alimentícias, visto que atualmente os alimentos geneticamente modificados são recomendados para um plantio mais econômico e mais nutritivo, uma vez que o combate a pragas se torna mais eficiente e as mutações inseridas também podem proporcionar um alimento de maior qualidade.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. A. S. **Caracterização citogenética e molecular de acessos de Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.)**. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2018. 60 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade de Feira de Santana, 2018.
- CARVALHO, Y. G. S. **O uso de caracteres ecológicos e reprodutivos como preditores para os níveis de diversidade genética em plantas: abordagem cienciométrica e meta-analítica**. Rio Verde: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, 2018. 86 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, Instituto Federal de Educação, 2018.
- COSTA, L. S. **Caracterização genética, análise do óleo essencial e anatomia foliar de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.** Santa Maria: Universidade de Santa Maria, 2018. 118 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade de Santa Maria, 2018.
- DA SILVA, A. V.; DOS SANTOS, A. R. F. WICKERT, E.; JÚNIOR, J. F. S.; COSTAR, T. S. Divergência genética entre acessos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6, n. 4, p. 572-578, 2011.
- DI SALVO, L. P.; FERRANDO, L.; FERNÁNDEZ-SCAVINO, A.; GARCÍA DE SALAMONE, I. E. Microorganisms reveal what plants do not: wheat growth and rhizosphere microbial communities after *Azospirillum brasilense* inoculation and nitrogen fertilization under field conditions. **Plant and Soil**, v. 424, n. 1-2, p. 405-417, 2018.
- GANESH, T.; RAJESH, T.; BANERJEE, A.; RYMBAL, H. One step RT-PCR method for quick and reliable detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) in Mid-Hills of Meghalaya, India. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, v. 5, n. 5, p. 1296-1300, 2018.
- LACERDA, D. R.; ACEDO, M. D. P.; FILHO, J. P. L.; LOVATO, M. B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**, v. 3, v. 2, p. 87-92, 2002.
- LEE, M. W.; HUFFAKER, A.; CRIPPEN, D.; ROBBINS, R. T.; GOGGIN, F. L. Plant elicitor peptides promote plant defences against nematodes in soybean. **Molecular Plant Pathology**, v.19, n. 4, p. 858-869, 2018.
- LEITE, P. H. S. **Análise de similaridade genética entre genótipos cultivados de *Capsicum chinense* utilizando marcadores RAPD**. Brasília: Universidade de Brasília, 2015 38 p. Monografia (Bacharel) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.
- LI, X. S.; YANG, H. L.; ZHANG, D. Y.; ZHANG, Y. M.; WOOD, A. J. Reference genes selection in the desert plant *Eremosparton songoricum*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 6944-6963, 2012.
- MARILLONNET, S.; WERNER, S. Assembly of Complex Pathways Using Type IIs Restriction Enzymes. **Microbial Metabolic Engineering**, 93-109, 2019. Doi:10.1007/978-1-4939-9142-6_7. Disponível em: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-9142-6_7.
- MAZROOEI, S. S. A.; GHAZALA, W. S. Characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from the desert plant *Haloxylon salicornicum* using RT-PCR amplification and sequencing. **Journal of King Saud University**, v. 30, p. 552-560, 2018.

- MENDONÇA, T. **Dissimilaridade genética entre linhagens de quiabeiro: caracteres morfológicos e moleculares**. Monte Carmelo: Universidade Federal de Uberlândia, 2018. 20 p.
- Monografia (Bacharel) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia, Monte Carmelo, 2018.
- MOTA, A. P. S. **Validação de marcadores SSR e STS ligados ao gene Co-4 de resistência à antracnose do feijoeiro-comum**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2015.
- Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.
- OLIVEIRA, G. A. F. **Identificação, caracterização e validação de marcadores minissatélites para o mamoeiro**. Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2015. 99p.
- Dissertação (Mestrado) - Curso do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2015.
- ROSA, T. L. M. **Diversidade genética, comportamento morfofisiológico e status nutricional de *Lecythis pisonis* Cambess**. Jerônimo Monteiro: Universidade Federal do Espírito Santo, 2018. 46 p.
- Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, 2018.
- SHARMA, A.; KUMAR, N.; MISHRA, I. G. Role of molecular marker in the genetic improvement of the medicinal and aromatic plants. **Biotechnological Approaches for medicinal and Aromatic Plants**, p. 557-567, 2018. doi: 10.1007/978-981-13-0535-1_25. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-13-0535-1_25.
- SILVA, R. G.; PINHATI, F. R.; SILVA, J. T. Análise da variabilidade genética por RAPD de linhagens isoladas de solo e lodo impactados com efluente industrial. **Revista da Biologia**, v. 14, n. 1, p. 1-5, 2015.
- SINGH, T.; SINGH, D. K. Assessing the bacterial community structure in the rhizosphere of wetland plants. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 2018. doi:10.1007/s00128-018-2426-1. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00128-018-2426-1>
- SCHNEIDER, T.; RIZZARDI, M.A.; NUNES, A.L.; BIANCHI, M.A.; BRAMMER, S. P.; ROCKENBACH, A.P. Biologia molecular aplicada à ciência das plantas daninhas. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 17, n. 1, p. 12-14, 2018.
- TABATABAEI, I.; BOSCO, C. D.; BEDNARSKA, M.; RUF, S.; MEURER, J.; BOCK, R. A highly efficient sulfadiazine selection system for the generation of transgenic plants and algae. **Plant Biotechnology Journal**, v. 17, p. 638-649, 2019.
- VIEIRA, R. L.; NODARI, R. O. Diversidade genética de cultivares de alho avaliada por marcadores RAPD. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 51-57, 2007