

Aplicação de marcadores de ADN para identificação de cultivares de oliveira

Os marcadores moleculares de ADN estão, nas espécies agrícolas, dirigidos para a seleção de características vantajosas ou para a deteção e identificação da presença destas espécies em produtos processados. Vamos explorar exemplos da sua aplicação e utilidade em oliveira e produtos derivados.

Fernanda Simões e Diogo Mendonça . INIAV, I.P.



O que são marcadores moleculares?

Os marcadores moleculares de ADN (ácido desoxirribonucleico) são geralmente sequências de ADN específicas, transmissíveis à descendência, que contribuem para a diferenciação de um indivíduo ou de uma população. Por se encontrarem no ADN, estão localizados principalmente no núcleo das células que contém a molécula de ácido desoxirribonucleico que gera toda a informação dos processos celulares que decorrem num organismo vivo através da expressão dos genes.

O primeiro relato do isolamento da molécula do ADN remonta ao ano de 1868, pelo médico suíço Friedrich Miesche que veio a reconhecer em 1869 que estava perante uma nova molécula.

Apesar da importância desta nova molécula, não lhe estava ainda atribuída a sua função primordial de transmissão de informação genética e controlo dos metabolismos da célula. Só nos meados do século XX (1944) o senhor Avery e colaboradores sugeriram que o ADN era o veículo da informação genética das células. Em 1951, Erwin Chargaff verificou que existia uma relação da composição de bases azotadas do ADN (quantidade de adenina = quantidade de timina e quantidade de citoquina = quantidade de guanina) e que a relação da proporção desses pares de bases estava relacionada com a espécie (animal, vegetal ou microrganismo) de que provinha. Foi talvez o primeiro indicador de que o ADN podia ser utilizado como marcador de proveniência.

E a partir daqui a investigação sobre o ADN não parou e as novas descobertas foram sucedendo: foi confirmado inequivocamente que o ADN era a fonte de informação genética das células (Hershey e Chase em 1952) e foi finalmente determinada a estrutura tridimensional do ADN em 1953,

quando Watson & Crick revelaram finalmente a organização da molécula do ADN em dupla hélice. E até ao presente esta é a ilustração mais comum para a molécula do ADN (figura 1).

Nos anos 60 do século XX foi determinado o código genético que fez corresponder uma determinada sequência das bases constituintes do ADN aos aminoácidos envolvidos na síntese de proteínas numa célula. Até aos anos 80, o ADN foi alvo de imensos estudos que trouxeram ao mundo científico o conhecimento sobre enzimas que atuavam sobre a molécula: enzimas que

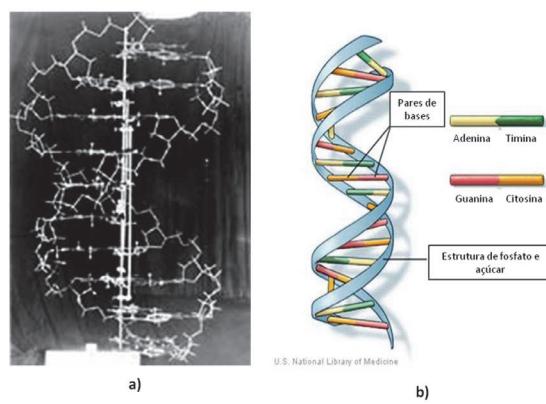


Figura 1 – Estrutura da molécula de ADN: a) Modelo de ADN original de Watson and Crick (Foto: Cold Spring Harbor Laboratory Archives). b) representação esquemática da molécula do ADN e seus constituintes (adaptado de U.S. National Library of Medicine)

cortavam o ADN, enzimas que ligavam as cadeias do ADN, enzimas que replicavam as cadeias de ADN, etc.

Todo o conhecimento gerado foi depois aproveitado para o desenvolvimento de tecnologias: as tecnologias do ADN recombinante, as tecnologias de sequenciação de fragmentos de ADN e, nos anos 90, as tecnologias de amplificação de fragmentos de ADN. Este conjunto de conhecimento e tecnologia disponíveis levaram ao desenvolvimento dos marcadores moleculares. E isso leva a outra questão:

Que tipos de marcadores moleculares existem?

Existem diferentes tipos de marcadores moleculares de ADN. Inicialmente, eram utilizados marcadores moleculares com base na tecnologia existente, mas sem conhecimento das suas sequências do ADN. Eram geralmente utilizados como primeira abordagem em espécies pouco estudadas. Têm como siglas RAPD, RFLP, PCR-RFLP. Todos estes foram já utilizados para estudar a diversidade genética na oliveira. Estes marcadores são eficientes, embora dependam em grande medida das condições experimentais e dos reagentes utilizados e, por isso, é por vezes difícil obter a reprodutibilidade dos resultados.

Com o avanço da sequenciação de ADN, foram determinadas, essencialmente em plantas e animais, sequências de padrão repetitivo (por exemplo CACACACACACA) de tamanho variável de indivíduo para indivíduo. Foram denominadas de microssatélites e são muito utilizadas para o estudo de populações e diversidade genética intraespécie e relação entre indivíduos. Estes marcadores moleculares exigem o conhecimento das sequências que flanqueiam as regiões da repetição. O que varia entre os indivíduos não é a sua sequência (constituída por repetições de um motivo, por exemplo, as bases CA), mas sim o número de repetições desse motivo. Estes marcadores permitem ainda a distinção do alelo do marcador que foi transmitido pelos parentais, ou seja, é possível identificar 2 alelos em indivíduos diploides (que têm 2 cópias do cromossoma (2n)). No caso, a oliveira tem $2n=46$ cromossomas, como os humanos. Assim, se um indivíduo tem um alelo com 12 repetições CA e outro com 20 repetições CA, os fragmentos gerados a partir das sequências de flanco conhecidas terão tamanhos diferentes

(diferem em 8 repetições CA = 16 bases do ADN) como se ilustra na Figura 2.

Esta diferença de tamanho dos alelos é distinguível por técnicas de separação e análise de fragmentos em equipamentos que determinam com precisão os tamanhos das moléculas de ADN. Assim, quando analisamos um indivíduo, estamos a determinar o conteúdo dos alelos que foram transmitidos pelos seus progenitores. Se utilizarmos vários marcadores microssatélites conseguimos obter uma combinação única que pode identificar um indivíduo numa população de milhões.

Aplicações dos marcadores moleculares em oliveira

A Denominação de Origem Protegida (DOP), a Indicação Geográfica Protegida (IGP) e a Especialidade Tradicional Garantida (ETG) são instrumentos da União Europeia para proteção dos seus produtos regionais da concorrência de produtos externos de menor preço, contribuindo para a preservação de práticas agrícolas tradicionais com benefício para o produtor e para o consumidor, com a garantia de qualidade. O controlo de autenticidade destes produtos é por isso necessário e exige métodos analíticos adequados para determinação de autenticidade para além do normal controlo das entidades regionais ou nacionais. São, por isso, necessários marcadores adequados e específicos para a deteção de ingredientes específicos em produtos processados ou com alteração dos constituintes biológicos dos alimentos. A deteção da presença do sinal específico do material autêntico nos produtos comercializados contribui, por isso, para a segurança do consumidor e protege também o produtor, conferindo a maioria da certificação de origem.

De acordo com dados dos organismos das Nações Unidas, os países Mediterrânicos produzem cerca de 90% da azeitona no mundo, sendo os principais produtores a Espanha, Itália, Grécia, Turquia, Tunísia, Marrocos, Síria e Portugal (FAO). Azeitona e azeite têm um importante valor económico e, nos últimos anos, o consumo de azeite tem-se expandido e os consumidores estão cada vez mais informados e atentos à qualidade e autenticidade do que consomem.

O azeite pode ser produzido a partir de uma única ou várias cultivares de oliveira, o que lhes confere características específicas associadas às cultivares de onde é extraído. Deste modo, é muito importante ter acesso a sistemas de rastreabilidade que permitam identificar com precisão e de forma rápida as cultivares ou espécies que produziram

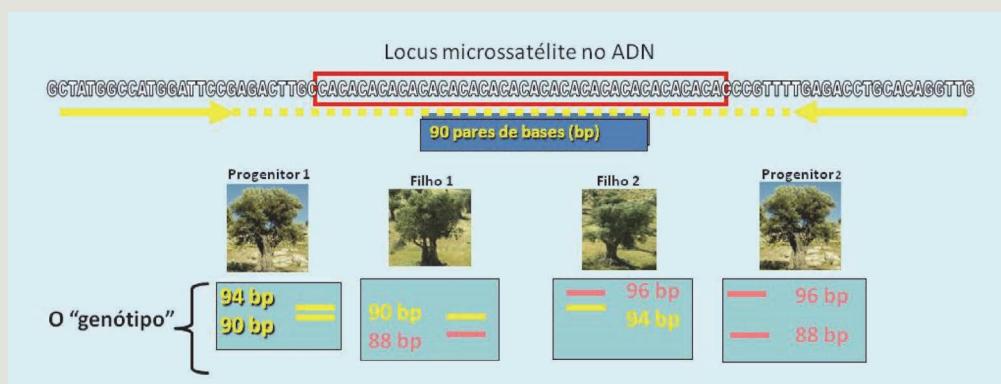


Figura 2 – Esquema ilustrativo da análise de locus microssatélites em dois descendentes de dois progenitores

óleo. A maior parte das análises químicas em óleos não consegue ser associada à sua origem porque, frequentemente, as diferentes condições ambientais podem levar a misturas de metabolitos que podem mascarar alguns resultados de rastreabilidade. Estão a ser feitos grandes esforços para obter perfis genéticos específicos das cultivares de oliveira com utilização de marcadores moleculares. A presença de vestígios de ADN no óleo deverá permitir a identificação inequívoca de marcadores específicos da cultivar utilizada, possibilitando a distinção de um azeite da cultivar Galega de um azeite de Lentisca e detetando possíveis falsificações. A existência de homônimas e sinônimas entre as oliveiras de produção torna ainda mais importante desenvolver um método de deteção e identificação de cultivares.

Assim, a utilização de métodos com base na análise de ADN parece ser a fonte mais fiável da determinação de autenticidade. Mas para que estes métodos sejam operacionais, é necessário um estudo prévio de diversidade das diferentes cultivares existentes numa determinada região protegida. Além disso, para identificar eficientemente e analisar, por exemplo, óleos virgens, com marcadores moleculares, é importante ter acesso a uma base de dados por exemplo de marcadores microssatélites a utilizar, para além das bases de dados já existentes que incluem dados morfológicos e moleculares, tais como a base de dados OLEA (<http://www.oleadb.it/>) [1]. Outra base de dados que pode ser mencionada é a Olea EST database [2] que contém dados de sequências de genes de vários tecidos celulares da oliveira. Já este ano, foi disponibilizada uma base de dados denominada OGDD (Olive Genetics Diversity Database - <http://www.bioinfo-cbs.org/ogdd/>) [3] que reúne muitas características das oliveiras, azeite ou frutos, tais como País e região de origem, acidez, sabor, sinônimas, referências, taxas de produção, fotos da árvore, folha, fruto e

caroço) dados agromorfológicos, químicos, genéticos (tamanhos de marcadores moleculares microssatélites) e contém cerca de 35 acessos de Portugal. Esta base de dados integra uma aplicação computacional que proporciona um teste suplementar que compara perfis de microssatélites. Deste modo, esta base de dados pretende constituir-se como um sistema de referência na avaliação dos dados obtidos a partir da análise de amostras com proveniência desconhecida e na definição da origem e composição de azeite virgem. Espera-se ainda que, no futuro, esta possa ser uma plataforma para a rastreabilidade e autenticidade do azeite e produtos derivados.

Resumindo, os marcadores microssatélites já foram amplamente utilizados para estudos de variabilidade genética, para caracterização de germoplasma, identificação de cultivares de oliveira, certificação de origem do azeite, avaliação de polinização e até em melhoramento [4, 5].

E as oliveiras portuguesas?

O conhecimento do património genético de uma região, ou de um país, é extremamente importante e é na Coleção Portuguesa de Referência de Cultivares Oliveira – CPRCO – estabelecida na Herdade do Reguengo do INIAV, I.P. – Polo de Elvas, que se encontram em avaliação 50 acessos de cultivares portuguesas.

Foram já realizados vários estudos de diversidade em cultivares portuguesas de oliveira, de modo a determinar a relação genética entre elas [6, 7]. Algumas das cultivares mais utilizadas, como por exemplo a Galega, têm sido até incluídas em estudos internacionais publicados em revistas científicas [4]. Mas todos estes estudos tinham interesse particular na relação genética entre cultivares.

O INIAV caracterizou, recentemente, as variedades da CPRCO com um conjunto de 18 marcadores moleculares microssatélites que garantem um perfil individual de cada cultivar e a identificação molecular de

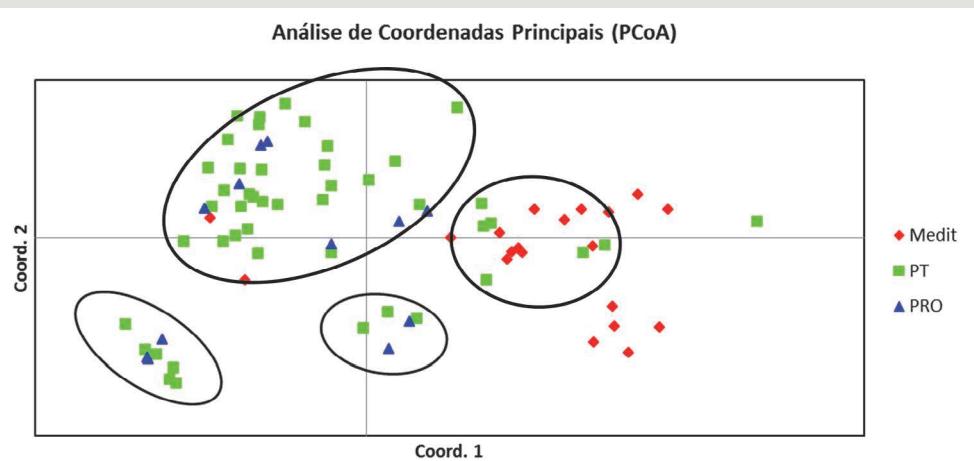


Figura 3 – Agrupamento de cultivares de acordo com a partilha de alelos marcadores moleculares: cultivares portuguesas da coleção (verde); cultivares de origem mediterrânea (vermelho) e cultivares de prospeção (azuis)

cultivar em estudos de prospeção, uma vez que apresentam um poder de discriminação entre cultivares bastante elevado. Estes marcadores apresentam boa reprodutibilidade de resultados e poderão ser testados na identificação de cultivares em alimentos processados após a extração de ADN. A análise de agrupamento por componentes principais das cultivares estudadas está apresentada na Figura 3, em comparação com cultivares de origem mediterrânea e indivíduos de prospeção.

Com os resultados obtidos, foram identificados 4 grupos principais que agrupam as cultivares que partilham mais alelos. Quando no gráfico é visível a sobreposição entre verdes e azuis, estamos perante um caso em que foi encontrada uma identidade comum e identificada a cultivar com a qual o indivíduo da prospeção está efetivamente relacionado.

A identificação molecular individual das cultivares da CPRCO permitiu elaborar um certificado de autenticidade, com um número mínimo de 10-12 locus microssatélites, que descreve especificamente cada

cultivar da Coleção (figura 4).

Note-se que, embora seja relativamente fácil obter o perfil molecular, as análises moleculares não devem nunca ser tomadas como única característica e, por isso, são também descritas nesta ficha as principais características morfológicas e informações acessórias tais como a existência de sinônimas.

Recentemente, foi reportada a possível associação de alguns marcadores microssatélites de cultivares turcas e espanholas com a composição em ácidos gordos do azeite [8]. No entanto, será necessário alargar o estudo a mais cultivares, utilizando mais marcadores para confirmar a validade desta associação.

Outros marcadores, sequenciação do genoma e o futuro

Os SNP e os InDel são as bases genéticas da maioria das mutações e variações alélicas, possuindo vastas aplicações no mapeamento genético de alta resolução e em testes diagnósticos. Estes marcadores podem ser identificados por análise computacional,

quando existem sequências nos bancos de dados, ou podem ser determinados por ressecção de genomas completos de indivíduos (quando já existe um genoma de referência: não é o caso da oliveira) ou por genotipagem por sequenciação de fragmentos específicos (GBS) de diferentes indivíduos. Estas abordagens dependem das tecnologias de sequenciação de alto rendimento (High Throughput Sequencing) que geram milhões de sequências, a partir das quais, através de procedimentos bioinformáticos, é possível selecionar os marcadores SNP (Polimorfismo de Base Única). Mas só depois de validados experimentalmente podem vir a ser utilizados.

No entanto, o genoma da oliveira é bastante grande e ainda não está totalmente sequenciado, embora existam dois consórcios internacionais a trabalhar no assunto.

Aplicação de marcadores no melhoramento

A seleção de progenitores específicos e o cruzamento artificial são etapas fundamentais para o sucesso de um programa de melhoramento. Essas etapas poderão ser dirigidas por marcadores moleculares, se tiverem sido associados a características vantajosas, fornecendo, aos melhoradores, informações genéticas de características dos indivíduos e aumentando a probabilidade de obtenção de cultivares superiores. Apesar da seleção de progenitores superiores em espécies perenes, como as fruteiras, possa até ter uma base empírica, o tempo para obtenção de uma cultivar melhorada é sempre bastante longo, dependendo do período juvenil da espécie, no qual não existe floração.

Assim, os marcadores moleculares poderão ajudar a certificar os progenitores dos frutos dos cruzamentos efetuados. Mas mais estudos de associação de genes com características agronómicas serão necessários até à prática do melhoramento assistido por marcadores em oliveira. ☺

Bibliografia

- [1] Olea databases (2008). <http://www.oleadb.it/>.
- [2] Olea EST database (2010). <http://140.164.45.140/oleaestdb/>.
- [3] Ben Ayed et al. (2015) Database Vol. 2015: article ID bav090; doi:10.1093/database/bav090.
- [4] Baldoni, L. et al. (2009). Mol Breed 24: 213–231.
- [5] Belaj, A. et al. (2012). Tree Genet & Genom 8: 365-3.
- [6] Bohm, J. et al. (2013). In “O grande livro da oliveira e do azeite”. Ed. Dinalivro Editora, Lisboa.
- [7] Martins-Lopes, P. et al. (2007). Genetic Resource and Crop Evolution, Vol. 54, pp. 117-128.
- [8] Ipek, A. et al. (2015). Genet. Mol. Res. 14 (1): 2241-2252.



Figura 4 – Exemplo de ficha de genótipos de uma cultivar da Coleção Portuguesa de Referência de Cultivares Oliveira – CPRCO