

Dispersão do pólen entre pequizeiros: uma atividade para a genética no ensino superior*

Rosane Garcia Collevatti; Mariana Pires de Campos Telles; Thannya Nascimento Soares

Laboratório de Genética & Biodiversidade, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

Autor para correspondência: Rosane Garcia Collevatti, rosanegc68@hotmail.com

*Material didático desenvolvido no contexto do projeto Núcleo de Excelência em Genética e Conservação de Espécies do Cerrado (GECER), que recebe apoio financeiro do PRONEX/FAPEG/CNPq (07/2009)

Nesta atividade é apresentada uma abordagem para determinar a distância de dispersão de pólen em uma população de plantas, utilizando os princípios básicos da Genética. A determinação da distância de dispersão de pólen é realizada a partir da análise de paternidade de sementes com base no polimorfismo de marcadores moleculares do tipo microssatélites. A aplicação desta atividade proporciona a discussão e consolidação de alguns conceitos em genética, tais como os princípios de segregação e variabilidade genética em populações.

FUNÇÃO PEDAGÓGICA

O principal objetivo da atividade proposta é mostrar como a distância de dispersão de pólen pode ser determinada utilizando os princípios básicos de Genética. Para tanto, torna-se necessário a determinação da paternidade das sementes oriundas de diferentes árvores-mãe (matrizes) e também de algumas provedoras de pólen em potencial. A determinação de paternidade pode ser realizada de uma maneira simples, utilizando o princípio da exclusão de paternidade, com base no polimorfismo de marcadores moleculares (WEIR 1996).

PROBLEMA PROPOSTO

O fluxo gênico em populações de plantas ocorre durante as gerações gametofítica e esporofítica, portanto, através da dispersão do pólen e da semente. Uma das questões importantes da genética de populações é a determinação da distância de dispersão de pólen dentro de uma população, uma vez que esse padrão tem implicações diferentes para o manejo e a conservação das espécies nativas. O estudo de dispersão de pólen pode ser realizado por uma abordagem genética que utiliza os marcadores moleculares, principalmente do tipo microssatélites, para identificar as prováveis origens do pólen para a progênie. Os marcadores microssatélites se baseiam no polimorfismo de sequências repetitivas em tandem no genoma, contendo motivos compostos de um a seis nucleotídeos. Os marcadores microssatélites são facilmente detectados utilizando-se a técnica de eletroforese, que se baseia na migração de fragmentos de DNA em uma matriz de se-

paração, imersa em solução tampão, sob corrente elétrica (veja explicações bastante didáticas em MARTINEZ E PAIVA, 2008 e SANTOS-FILHO, 2011). Uma vantagem desses marcadores para a análise de paternidade é que ele apresenta padrão de herança codominante, ou seja, permitem a identificação precisa de homocigotos e heterocigotos, o que por sua vez maximiza a probabilidade de identificação da origem parental dos alelos. Para saber mais sobre a análise de paternidade, com base em marcadores moleculares, veja CAMPOS et al, (2010).

Caryocar brasiliense, o pequi, é uma importante planta do Cerrado, cujo fruto é muito consumido pela comunidade local do Centro-Oeste, sendo uma fonte de renda complementar para agricultores familiares que o comercializam nas feiras livres. A espécie é hermafrodita e polinizada por morcegos. Suas sementes são dispersas por mamíferos, tais como a anta e o veado campeiro, além da ema. Sendo assim, a espécie apresenta grande importância econômica e ecológica por servir como fonte de alimento para muitas espécies da fauna do Cerrado (VIEIRA et al, 2006).

Nesta atividade foi proposta a determinação da distância de pólen em uma população de pequi, oriunda de um fragmento remanescente de Cerrado. Neste fragmento foram encontradas três árvores com frutos (matrizes) e outras oito que produziram flores, mas não produziram frutos, sendo consideradas apenas provedoras de pólen em potencial (Painel 1). De cada matriz foram coletadas quatro sementes para a determinação da paternidade, a partir da qual será calculada a distância de

Foto: Rosane Garcia Collevatti

dispersão de pólen. Para tanto, os genótipos das matrizes, sementes e prováveis fontes de pólen foram obtidos pela análise de dois loci de microssatélites. Para cada conjunto (matriz, sementes e fontes de pólen potencial) amostrado foi obtido um perfil eletroforético para estes dois loci (Painel 2).

Foi excluída a possibilidade de autopolinização, ou seja, que a árvore matriz seja a própria fonte de pólen. A autopolinização pode acontecer porque a planta é hermafrodita, ou seja, possui flores com os dois sexos. Além disso, as árvores matrizes também foram excluídas como potenciais fontes de pólen para outras plantas-mãe.

DISTRIBUIÇÃO DO MATERIAL AOS GRUPOS

Para determinar a paternidade e a distância de dispersão de pólen deve-se:

1. Obter os genótipos de todas as árvores adultas e das sementes.
2. A partir dos genótipos, determinar qual é a árvore de onde provem o pólen mais provável para cada semente.
3. Determinar a distância (em metros) de dispersão de pólen para cada semente, a média para cada matriz e a média e a variância para a população estudada.

Os recursos didáticos que deverão ser utilizados consistem em quatro painéis, conforme descrito a seguir e todos os grupos deverão receber uma cópia de cada painel (material do Apêndice):

1. **Painel 1** – croqui dos indivíduos da população em escala 1:100 cm;
2. **Painel 2** – representação esquemática da eletroforese de dois géis, contendo as informações dos loci A e B para os dados das matrizes M1, M2, M3. Em cada gel, as amostras foram aplicadas na seguinte ordem: Matriz (M1, M2 e M3), sementes (S1 a S4) e potenciais fontes de pólen (PD1 a PD8);
3. **Painel 3** – tabela para os genótipos de todos os indivíduos analisados na população, separados em matrizes M1, M2 e M3;

4. **Painel 4** – tabela para os resultados da determinação das árvores que forneceram o pólen e as distâncias de dispersão de pólen na população avaliada, para os dados das matrizes M1, M2 e M3.

A turma deverá ser dividida em 3 grupos. Os painéis serão distribuídos separando os dados de uma matriz para cada grupo da seguinte forma:

Grupo 1: Painéis 1, 2.1, 3.1 e 4

Grupo 2: Painéis 1, 2.2, 3.2 e 4

Grupo 3: Painéis 1, 2.3, 3.3 e 4

PROCEDIMENTO PARA OS GRUPOS

1. A partir dos géis do Painel 2, anotar os genótipos de cada indivíduo (matriz, sementes e doadoras de pólen) no Painel 3. Escrever na tabela os números dos alelos presentes em cada indivíduo, para cada loci. Como o marcador microssatélite é codominante, serão observados no gel para cada indivíduo, no máximo dois alelos por loci. Aqueles indivíduos que apresentarem uma banda (alelo) no gel são considerados homocigotos para tal loci. Aqueles que apresentarem duas bandas (alelos diferentes) são heterocigotos. Exemplo: Matriz M1, Loci A, genótipo 1/1, loci B, genótipo 3/4.
2. Utilizar os genótipos do Painel 3 para determinar, para cada semente, qual é a procedência do pólen e anotar no Painel 4. Para determinar a procedência do pólen, os grupos deverão utilizar o princípio da exclusão de paternidade: a semente deve, necessariamente, ter um alelo herdado da árvore-mãe (matriz) e outro herdado da provável provedora do pólen. Assim, os grupos deverão, primeiro, verificar qual alelo foi herdado da árvore-mãe e, depois, identificar, dentre as potenciais provedoras de pólen, aquela que possui um alelo igual ao outro alelo observado na semente. A árvore provedora de pólen que não possuir o alelo igual ao da semente é automaticamente excluída da paternidade. Os grupos deverão fazer este procedimento para os dois loci.

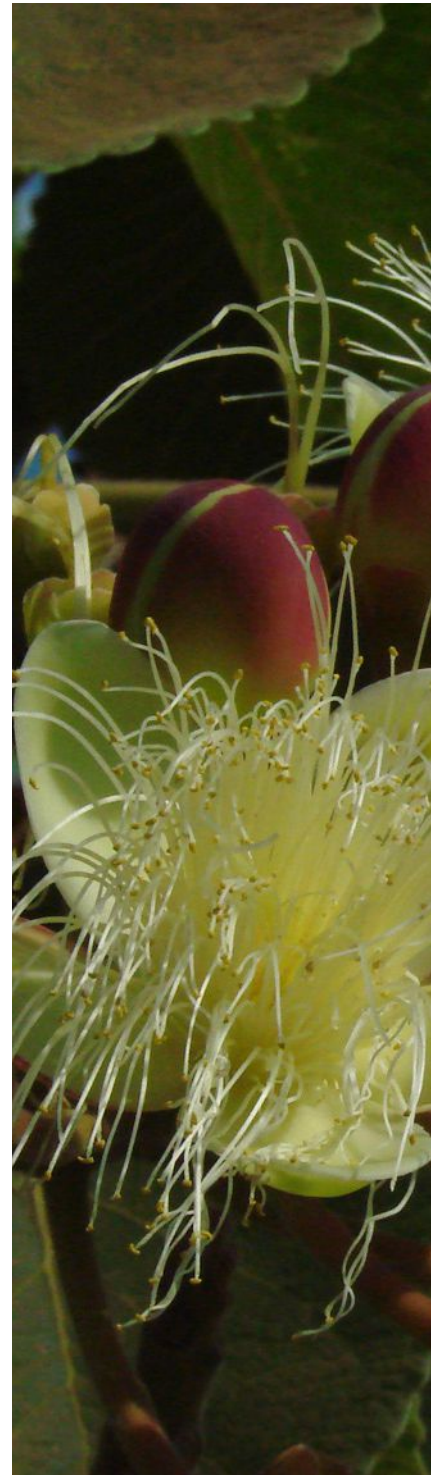




Foto: Rosane Garcia Collevatti

Dessa forma, poderão acontecer três situações, excluindo os alelos herdados da árvore-mãe:

- ♦ uma árvore potencial provedora de pólen possui os mesmos alelos que a semente, para os dois loci - portanto, é a mais provável provedora do pólen;
 - ♦ uma árvore potencial provedora de pólen possui um alelo igual ao da semente para um locus e um alelo diferente para o outro locus, portanto, é excluída como provável fonte do pólen;
 - ♦ uma árvore potencial provedora de pólen possui os alelos diferentes dos da semente para os dois loci, portanto, é também excluída como provável provedora do pólen.
3. Após preencher o Painel 4 com as determinações das prováveis procedências de pólen, os grupos deverão preencher a quarta coluna do Painel 4 com a distância entre a árvore-mãe e a fonte do pólen. Para isso, deverão medir a distância entre as árvores do Painel 1, utilizando uma régua. A distância deverá ser convertida para metros, utilizando a escala no mapa e anotada no Painel 4. Esta distância representa a distância de dispersão de pólen para cada semente de cada árvore-mãe.
 4. A partir das distâncias entre as árvores-mãe e as provedoras de pólen, os grupos deverão calcular a distância média de dispersão de pólen para cada matriz na população avaliada, anotando na quinta coluna do Painel 4.
 5. Os grupos deverão então se reunir e calcular juntos a distância média e variância de dispersão de pólen para a população avaliada.

ENTENDENDO A ATIVIDADE

1. Como a análise de paternidade pode ser utilizada para avaliar a distância de dispersão de pólen em populações de plantas? E o que significa a distância de dispersão de pólen?

O fluxo gênico em plantas pode ser avaliado pela movimentação do pólen e ou semente dentro da população. Uma vez que as sementes são colhidas nas árvores-mães, o teste de pater-

nidade desta semente pode ser utilizado para descobrir de qual árvore procede o pólen para a formação de cada semente e avaliar a contribuição da dispersão do pólen para o fluxo gênico. Sabendo-se qual é a árvore, de onde provem o pólen, pode-se inferir a distância de polinização pela distância entre a árvore-mãe da semente e a provedora de pólen. A distância da dispersão de pólen indica o alcance do polinizador dentro da população e, deste alcance, é possível se fazer inferências sobre a dinâmica do fluxo gênico via pólen na espécie em questão. Esta dinâmica está, por sua vez, ligada ao potencial evolutivo e ao de persistência da população.

2. Por que foi escolhido o marcador microsatélite para a análise de paternidade das sementes?

O marcador microsatélite foi escolhido por ser altamente polimórfico, ou seja, apresentar muitos alelos dentro de uma população, e por ser um marcador molecular que apresenta padrão de herança codominante. Desta forma, é possível distinguir os alelos herdados da mãe dos herdados do pai. Esta identificação dos alelos dos parentais na prole torna possível a determinação da paternidade com alta probabilidade de exclusão e baixa probabilidade de identidade genética.

3. Todas as sementes tiveram sua paternidade definida? Qual a provável causa de não determinação da paternidade?

Não. A semente 2 da matriz 3 não teve sua paternidade definida. Uma provável causa disto está relacionada com a amostragem, ou seja, com a origem do pólen desta semente que pode não ter sido amostrada durante a coleta, uma vez que nestes estudos normalmente não é possível fazer um censo da população, mas sim uma amostragem de parte dos indivíduos. Outro motivo pode ser a imigração de pólen de outra população adjacente, ou seja, o pólen desta semente pode ser oriundo de uma árvore provedora de pólen de outra população fora dos limites do fragmento onde a população de estudo se encontra. Este resultado é esperado neste tipo de estudo, principalmente considerando que o polinizador do pequiheiro é o morcego que tem capacidade de voo a longas distâncias.

4. Todas as potenciais provedoras de pólen apresentaram pelo menos uma semente como filha? Qual a provável causa de uma

MATERIAIS DIDÁTICOS

planta não participar dos eventos de reprodução na população?

Não. A árvore DP7 não contribuiu para a formação de nenhuma das sementes amostradas. Uma possível explicação para este fato é a baixa produção de flores por esta árvore, o que fez com que sua participação na oferta de pólen para a fecundação ter ficado prejudicada. Outra explicação é o número de sementes amostradas. Como o número foi pequeno, há uma alta probabilidade de não amostrar sementes produzidas por esta árvore.

5. O que os valores estimados de média e variância da distância de dispersão significam?

A média indica uma tendência central dentro dos valores obtidos. Assim, as médias de distâncias de dispersão por matriz indicam esta tendência dentro da árvore, ou seja, o alcance médio de polinização para cada árvore-mãe, enquanto que a média populacional indica a tendência central do alcance de polinização na população como todo. Este alcance médio

de polinização é utilizado para se inferir uma área onde é esperado encontrar um parentesco maior entre as plantas que estão dentro desta área. Quanto maior a distância média, maior será o tamanho de vizinhança genética da população e menor o parentesco entre as plantas dentro da área.

A variância, por outro lado, é uma medida de dispersão dos valores individuais em relação à sua média. Nesta atividade, a variância irá mostrar a variação do alcance médio de polinização. Embora a média de distância de dispersão entre as matrizes seja de 13,9 m existe uma variância de 38,33 m², o que indica uma grande variação nas distâncias de dispersão do pólen. Como a variância é uma medida quadrática, costuma-se usar em seu lugar uma medida linearizada, escalarmente comparável à média: trata-se do desvio padrão, que é obtido tirando-se a raiz quadrada do valor da variância. Para a medida acima, o desvio padrão toma o valor de 6,19 m, que é considerado alto por ser da ordem de aproximadamente 50% do valor da média.

Painéis 3.

Tabelas de genótipos para as matrizes (M1, M2 e M3), sua progênie (S1 a S4), e as oito potenciais procedências do pólen (DP1 a DP8), para os dois locus microssatélites A e B.

Painel 3.1.

Genótipos da Matriz 1 (M1) e sua progênie (S1 a S4) com as oito potenciais procedências do pólen (DP1 a DP8), para os locus A e B.

Genótipos	M1	S1	S2	S3	S4	DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7	DP8
Locus A	1/1	1/4	1/2	1/3	1/4	3/3	2/3	1/1	3/4	2/2	1/4	2/3	4/4
Locus B	3/4	3/5	2/3	3/4	2/4	2/4	2/5	1/5	5/5	3/3	2/4	5/5	1/1

Painel 3.2.

Genótipos da Matriz 2 (M2) e sua progênie (S1 a S4) com as oito potenciais procedências do pólen (DP1 a DP8), para os locus A e B.

Genótipos	M2	S1	S2	S3	S4	DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7	DP8
Locus A	2/4	1/2	1/4	2/4	1/2	3/3	2/3	1/1	3/4	2/2	1/4	2/3	4/4
Locus B	2/5	1/2	1/5	2/3	1/2	2/4	2/5	1/5	5/5	3/3	2/4	5/5	1/1

Painel 3.3.

Genótipos da Matriz 3 (M3) e sua progênie (S1 a S4) com as oito potenciais procedências do pólen (DP1 a DP8), para os locus A e B.

Genótipos	M3	S1	S2	S3	S4	DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7	DP8
Locus A	1/3	1/2	3/3	3/4	3/3	3/3	2/3	1/1	3/4	2/2	1/4	2/3	4/4
Locus B	3/4	3/3	1/3	1/4	3/4	2/4	2/5	1/5	5/5	3/3	2/4	5/5	1/1

RESPOSTAS DA ATIVIDADE

Painel 4.

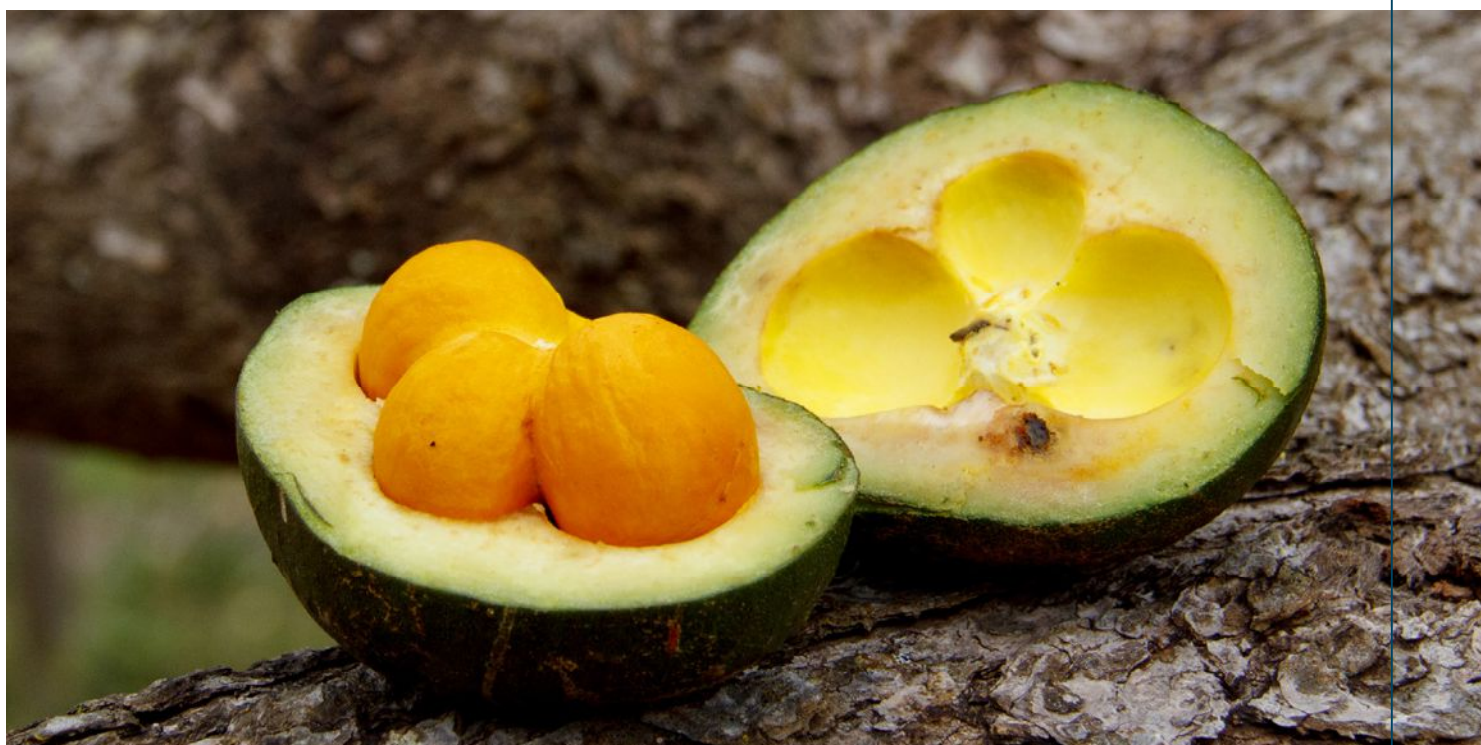
Resultado final de determinação da procedência do pólen e distância de dispersão de pólen para cada semente (S1 a S4) de cada árvore matriz (M1, M2 e M3).

Matriz	Semente	Provedor de pólen	Distância de dispersão de pólen (m)	Média da distância de dispersão de pólen (m)
M1	S1	DP4	13,3	9,575
M1	S2	DP2	12,5	
M1	S3	DP1	6,5	
M1	S4	DP6	6,0	
M2	S1	DP3	21,3	19,150
M2	S2	DP3	21,3	
M2	S3	DP3	21,3	
M2	S4	DP5	12,7	
M3	S1	DP5	17,2	12,667
M3	S2	-	-	
M3	S3	DP8	4,8	
M3	S4	DP1	16,0	

Distância média e variância de dispersão de pólen para a população avaliada:

Distância média: 13,9 m

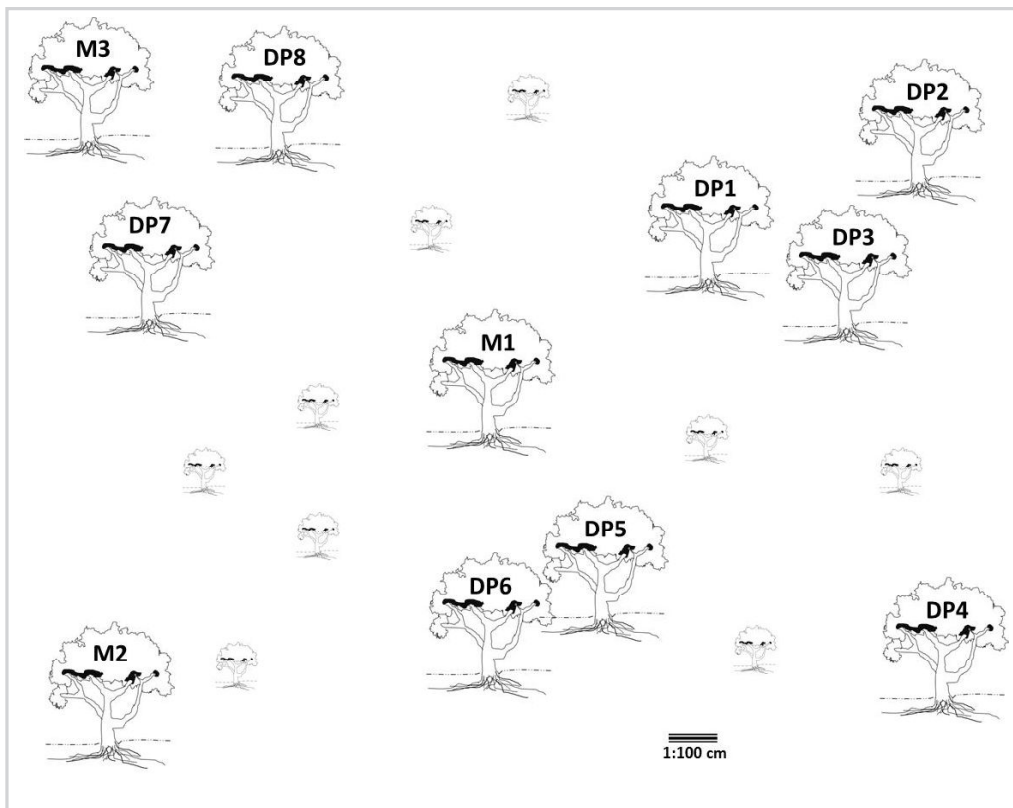
Variância: 38,33 m



REFERÊNCIAS

- CAMPOS, C. K. P.; SIQUEIRA, M. N.; BORGES, J. P.; RODRIGUES, L. A.; OLIVEIRA, J. S.; ROSA, M. A.; NEVES, A. F. Exames de paternidade pelo DNA: uma metodologia para ensino da genética molecular. *Genética na Escola*, v. 5, n. 2, p. 7-13, 2010.
- VIEIRA, R. F.; COSTA, T. S. A.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. (editores) *Frutas nativas da região Centro-Oeste. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, 2006. 320 p.
- MARTINEZ, E. R. M.; PAIVA, L. R. S. Eletroforese de ácidos nucleicos: uma prática para o ensino de genética. *Genética na Escola*, v. 3, n. 1, p. 43-48, 2011.
- SANTOS-FILHO, F. S. Eletroforese: uma importante ferramenta da genética. *Genética na Escola*, v. 6, n. 2, p. 43-45, 2011.

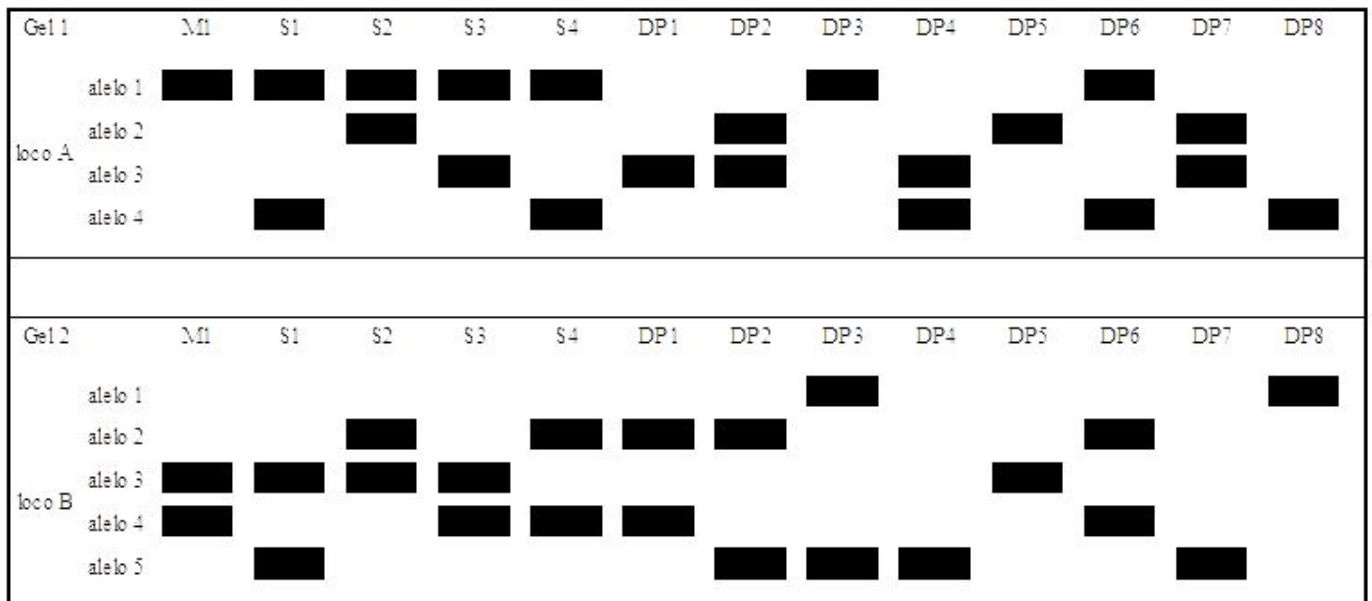
PAINÉIS



Painel 1.
Mapa das matrizes (M1, M2 e M3) e potenciais procedências do pólen (DP1 a DP8) em escala de 1:100 cm.

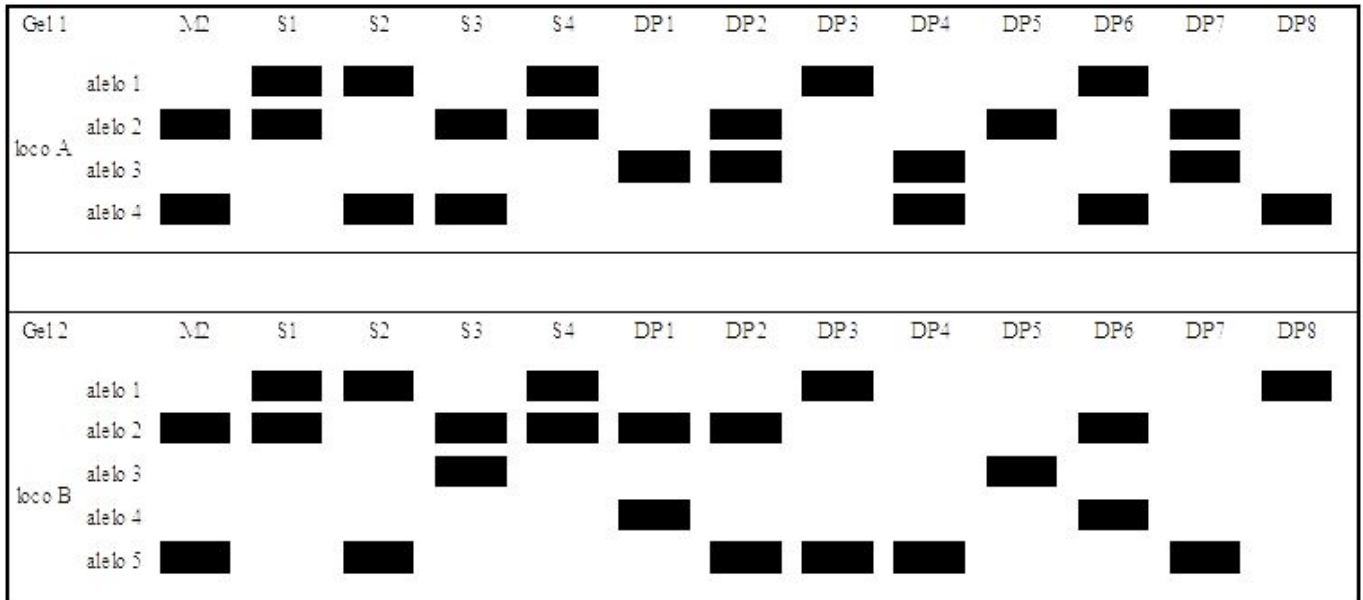
Painéis 2.
Esquemas de géis de eletroforese para dois loci microssatélites, A e B, para as três árvores matrizes, M1, M2 e M3, sua progênie, S1 a S4, e as potenciais procedências do pólen, DP1 a DP8.

Painel 2.1.
Esquema de gel de eletroforese para a matriz 1 (M1) e sua progênie (S1 a S4) com as oito potenciais procedências do pólen (DP1 a DP8).



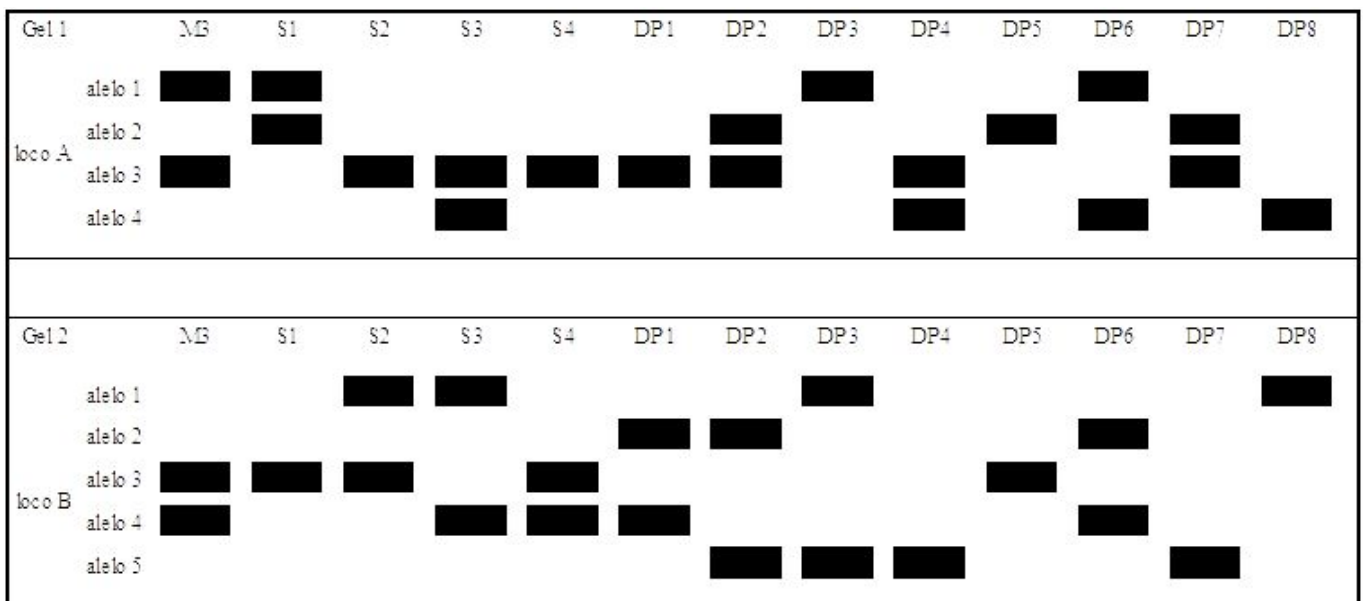
Painel 2.2.

Gel de eletroforese para a matriz 2 (M2) e sua progênie (S1 a S4) com as oito potenciais procedências do pólen (DP1 a DP8).



Painel 2.3.

Esquema de gel de eletroforese para a matriz 3 (M3) e sua progênie (S1 a S4) com as oito potenciais procedências do pólen (DP1 a DP8).



MATERIAIS DIDÁTICOS

Painéis 3.

Tabelas de genótipos para as matrizes (M1, M2 e M3), sua progênie (S1 a S4), e as oito potenciais procedências do pólen (DP1 a DP8), para os dois loci microssatélites A e B.

Painel 3.1.

Genótipos da matriz 1 (M1) e sua progênie (S1 a S4) com as oito potenciais procedências do pólen (DP1 a DP8), para os loci A e B.

Genótipos	M1	S1	S2	S3	S4	DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7	DP8
Locus A													
Locus B													

Painel 3.2.

Genótipos da matriz 2 (M2) e sua progênie (S1 a S4) com as oito potenciais procedências do pólen (DP1 a DP8), para os loci A e B.

Genótipos	M2	S1	S2	S3	S4	DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7	DP8
Locus A													
Locus B													

Painel 3.3.

Genótipos da matriz 3 (M3) e sua progênie (S1 a S4) com as oito potenciais procedências do pólen (DP1 a DP8), para os loci A e B.

Genótipos	M3	S1	S2	S3	S4	DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7	DP8
Locus A													
Locus B													

Painel 4.

Resultado final de determinação da procedência do pólen e da distância de dispersão de pólen para cada semente (S1 a S4) de cada árvore matriz (M1, M2 e M3).

Matriz	Semente	Doadora de pólen	Distância de dispersão de pólen (m)	Média da distância de dispersão de pólen (m)
M1	S1			
M1	S2			
M1	S3			
M1	S4			
M2	S1			
M2	S2			
M2	S3			
M2	S4			
M3	S1			
M3	S2			
M3	S3			
M3	S4			

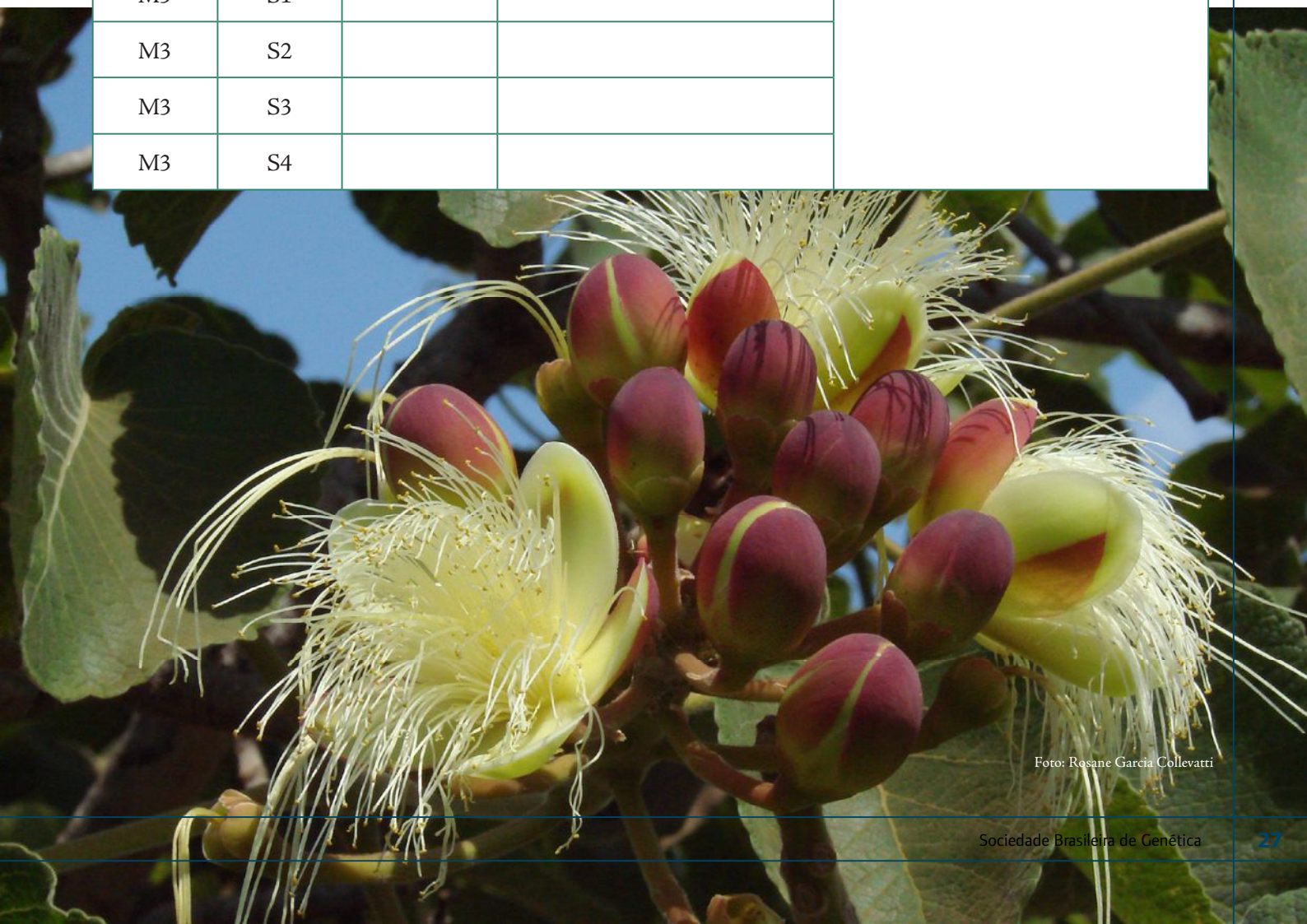


Foto: Rosane Garcia Collevatti