

Detecção de polimorfismo em cana-de-açúcar utilizando marcadores SSR

Camila de Marillac Costa NUNES; Alexandre Siqueira Guedes COELHO; Ana Carolina Fagundes da Silva MARTINS; Jarênio Rafael Ozeas de SANTANA; Daniel Garcia SILVA.

Programa de Pós-Graduação em Agronomia – PPGA / UFG. Área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas. **Órgão financiador: CNPq**

E.mail: camilamarillac@hotmail.com

Palavras-chave: *Saccharum* spp.; mapeamento genético; segregação.

Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das culturas de maior importância socioeconômica do agronegócio brasileiro, sendo responsável pela geração de 2% do PIB nacional e 4,5 milhões de empregos diretos e indiretos (Unica, 2010). As projeções atuais do Instituto FNP preveem um crescimento de 70% na área plantada com cana-de-açúcar. Assim, a utilização de ferramentas biotecnológicas em análises genéticas é capaz de ampliar os conhecimentos existentes sobre a estrutura e o comportamento de genomas complexos, como o da cana-de-açúcar, e reduzir significativamente o tempo de desenvolvimento de novas variedades (Figueira, 2008).

A os marcadores moleculares têm atuado como importantes ferramentas no melhoramento clássico da cana-de-açúcar, pois detectam o polimorfismo diretamente ao nível do DNA, permitindo fazer inferências em todo o genoma sobre as relações entre genótipo e fenótipo. Assim, a incorporação dos marcadores moleculares no melhoramento da cana-de-açúcar auxilia, desde a escolha dos melhores genitores para um cruzamento e identificação de genótipos superiores, à construção de mapas genéticos (Pinto, 2008).

O mapeamento genético consiste em determinar a posição relativa de marcadores moleculares no genoma e visa igualmente determinar a distância genética entre dois marcadores consecutivos. Assim, o objetivo principal de um trabalho de mapeamento é ordenar o genoma, de maneira regular, visando à localização de genes de interesse ou de regiões próximas, que controlam caracteres quantitativos (QTL), e a identificação de marcadores fortemente ligados a estes genes (Schuster & Cruz, 2008).

Todavia, como a construção de mapas é viabilizada pela análise de segregação de marcadores, em organismos poliploides, como a cana-de-açúcar, o mapeamento genético é muito mais complexo que em organismos diploides, devido ao grande número de marcas geradas e a inadequação dos *softwares* desenvolvidos para genomas diplóides às análises de poliplóides (Albino et al., 2006). Diante disso, este trabalho tem por objetivo mostrar como ocorre a segregação de marcadores microssatélites (SSR) em uma geração F_1 , proveniente do cruzamento de duas variedades comerciais de cana-de-açúcar.

Material e Métodos

Experimento de campo

Os genótipos utilizados para a realização deste trabalho são provenientes do cruzamento realizado na Estação de Cruzamentos de Serra do Ouro, em Murici-AL, entre as variedades comerciais RB-97-327 e RB-72-454. As sementes produzidas foram colhidas, dessecadas em sílica-gel e encaminhadas à Universidade Federal de Goiás, a qual é vinculada à Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucro-Alcooleiro (Ridesa), para que os experimentos pudessem ser estabelecidos.

A semeadura foi realizada em agosto de 2009 e, após dois meses, as mudas obtidas foram transferidas para copos descartáveis contendo substrato Plantmax, resultando em 989 plântulas, mantidas em casa-de-vegetação. Em fevereiro de 2010, 820 plântulas sobreviventes foram transplantadas dos copos descartáveis para garrafas “pet” contendo areia, substrato e terra, as quais foram mantidas em casa-de-vegetação durante nove meses.

Em novembro de 2010, 800 plântulas foram transplantadas para um campo experimental, localizado no município de Inhumas-GO, pertencente à Usina Centroálcool, vinculada ao Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar da Universidade Federal de Goiás (PMGCA-GO). O delineamento utilizado foi o de blocos aumentados de Federer (Federer, 1956), sendo cada bloco constituído por seis parcelas, das quais duas são testemunhas comuns a todos os blocos. As variedades comerciais utilizadas como testemunhas foram a RB 99-395 e a RB 98-710. O espaçamento utilizado entre parcelas foi de 0,7m, tendo cada parcela 0,5m.

Experimento Laboratorial

Para extração de DNA foram coletadas gemas laterais de 752 plântulas, seguindo o protocolo de Aljanabi et al. (1999) adaptado. Após a extração, a quantificação de DNA foi realizada utilizando o espectrofotômetro Qubit (*Invitrogen*®) e, posteriormente, o DNA de todos os genótipos foi diluído para a concentração de 3 ng/ μ L, para utilização dos marcadores microssatélites (SSR – *Simple Sequence Repeats*).

Para amplificação dos locos via reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados, inicialmente, 15 pares de *primers* SSR, cuja sequência *forward* é marcada com fluorocromo específico, de forma a permitir a montagem de cinco painéis triplex. As reações de PCR foram realizadas via *touchdown*, reduzindo a temperatura em 0.7°C / ciclo, sendo necessária uma etapa inicial de 94°C por 15 min. para a ativação da enzima. Posteriormente, o produto da PCR de 282 genótipos foi submetido ao analisador automático ABI PRISM 3100 para a análise dos fragmentos microssatélites fluorescentes, utilizando-se o *software* GeneMapper.

Resultados e Discussão

Na cana-de-açúcar, a poliploidia atinge todas as espécies do gênero *Saccharum*, sendo as espécies aneuplóides as mais frequentes. Assim, alternativas à segregação Mendeliana são possíveis de serem observadas, devido à possibilidade de que a presença de um mesmo alelo em dois genitores ocorra em dosagem semelhante ou diferente no genoma de cada um deles (Aitken et al., 2005).

Neste caso, a análise de segregação dos marcadores utilizados para a construção de mapas genéticos pode ser realizada através da metodologia desenvolvida por Wu et al. (1992), citado por Oliveira (2006), na qual a segregação de cada marcador, dominante ou co-dominante, deve ser analisada na progênie com base em sua presença ou ausência. Desta forma, faz-se a identificação de fragmentos de dosagem única no genoma, denominados marcadores *single dose* (MDS), presentes uma única vez no genoma de um genitor e ausente no outro, segregando na progênie na proporção de 1:1, ou presentes uma única vez em ambos os genitores, segregando na progênie na proporção 3:1.

Mas, além da identificação de fragmentos de dosagem única no genoma, pode-se também proceder à identificação de fragmentos de dosagem dupla, denominados marcadores *double dose* (MDD), presentes duas vezes no genoma de um genitor, segregando na progênie na proporção 11:3, se o genoma monoplóide do genitor for $x=8$, ou segregando na progênie na proporção 7:2, se o genoma monoplóide do genitor for $x=10$ (Aitken et al., 2005).

A análise de segregação dos 282 genótipos, juntamente aos dois genitores, revelou presença de polimorfismo entre os genótipos descendentes do cruzamento (Figura 1), para todos os 15 pares de *primers* SSR utilizados. Observa-se na Figura 1 que um único par de *primer* SSR é capaz de gerar uma grande quantidade de fragmentos, os quais podem representar os diferentes alelos do mesmo loco nos vários cromossomos homólogos envolvidos, não permitindo, entretanto, a identificação completa dos genótipos pelo fenótipo visualizado (Oliveira, 2006).

Todavia, mesmo que marcadores como os SSR percam a vantagem de co-dominância e passem a funcionar como marcadores dominantes, a presença do grande número de marcas geradas por cada par de *primer* permite uma leitura ampla dos perfis dos indivíduos da progênie quando comparados aos genitores, o que é fundamental para o estabelecimento dos grupos de ligação nos mapas genéticos.

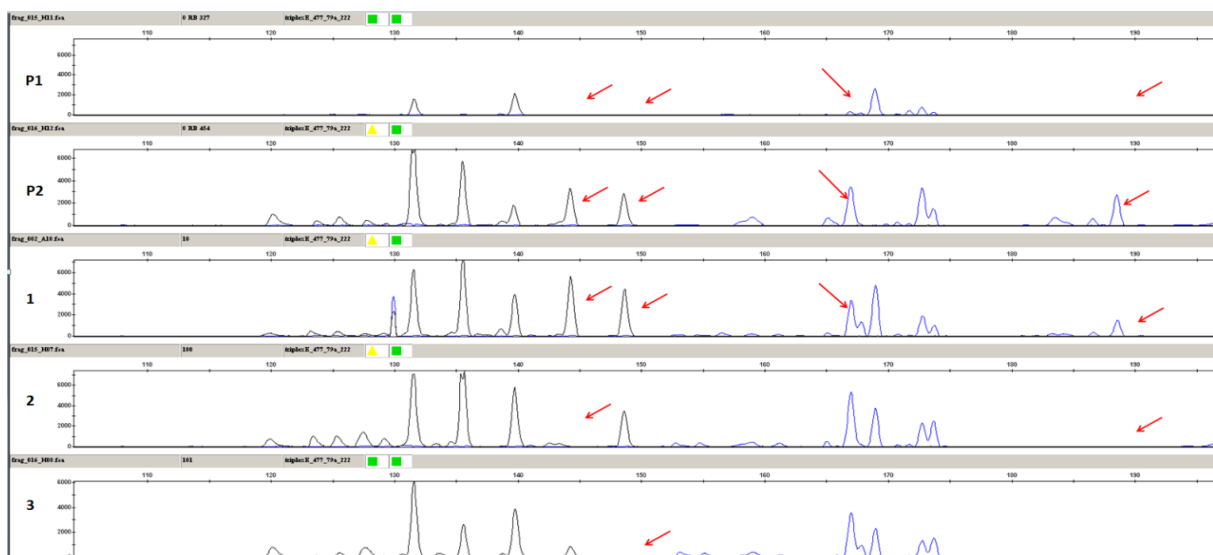


Figura 1. Cromatograma ilustrando o polimorfismo existente entre os genitores P1 (RB 97-327) x P2 (RB 72-454) e três genótipos (1, 2 e 3) descendentes do cruzamento, gerado pelos *primers* de microssatélites SEGMS79a (NED) e SMC222CG (6-FAM), respectivamente.

Mais 18 pares de *primers* SSR e 40 combinações de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) ainda serão testados para serem utilizadas na população em estudo e, se detectados os polimorfismos esperados, os marcadores a serem utilizados na construção do mapa genético serão escolhidos com base em testes estatísticos de segregação das marcas, de acordo com a metodologia descrita por Wu et al. (1992).

Conclusões

- Foi possível verificar presença de polimorfismo entre os genótipos provenientes do cruzamento das variedades comerciais RB-97-327 e RB-72-454 para as 15 combinações de *primers* SSR utilizadas;
- *Primers* SSR são capazes de gerar um grande número de marcas por genótipo em organismos poliplóides, como a cana-de-açúcar, sendo esta uma vantagem na construção de mapas genéticos saturados.

Referências Bibliográficas

- AITKEN, K. S.; JACKSON, P. A.; MCINTYRE, C. L. A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homo(eo) logous linkage groups in a sugarcane cultivar. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 110, n.1, p. 789-801, 2005.
- ALBINO, J. C.; CRESTE, S.; FIGUEIRA, A. Mapeamento genético da cana-de-açúcar. **Biociência, Tecnologia e Desenvolvimento**, v. 36, p. 82-91, 2006.
- ALJANABI, S. M.; FORGET, L.; DOOKUN, A. An improved a rapid protocol for the isolation of polysaccharide – and polyphenol-free sugarcane DNA. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 17, p. 1-8, 1999.
- FEDERER, W. T. Augmented (or hoonuiaku) designs. **Hawaiian Planter's Records**, v. 55, p. 191- 208, 1956.
- FIGUEIRA, A. Biotecnologia no melhoramento: mito ou realidade. **Revista Opiniões**, Ribeirão Preto, v. 3, n. 1, p.14, 2008.
- OLIVEIRA, K. M. **Desenvolvimento de marcadores moleculares EST-SSRs e mapeamento funcional em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2006. 186f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2006.
- PINTO, L. R. Marcadores moleculares. **Revista Opiniões**, Ribeirão Preto, v. 3, n. 1, p. 40, 2008.
- SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. **Estatística genômica. Aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa: Editora Universidade Federal de Viçosa, 2008. 568p.
- UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR - Unica**. Dados e cotações. Unica, São Paulo, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/dadosCotacao>>. Acesso em: 10 Jun. 2011.