

Utilização de marcadores DArT (*Diversity Arrays Technology*) para a construção de um mapa genético em cana-de-açúcar

Daniel Garcia SILVA¹; Alexandre Siqueira Guedes COELHO¹; Camila de Marillac Costa NUNES¹, Evandro NOVAES¹.

¹Universidade Federal de Goiás. Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos – Setor de Melhoramento de Plantas.

E_mail: dan_unemat@hotmail.com

Palavras-chave: DArT, cana-de-açúcar, marcadores moleculares e microarray.

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância comercial, devido à sua utilização como matéria-prima para a produção, principalmente, de açúcar, álcool, energia elétrica e, mais recentemente, para a produção do bioplástico. Além da característica de acumular grandes quantidades de sacarose nos entre-nós do caule, a cana também possui alta eficiência fotossintética e é uma das plantas com maior índice de aproveitamento de água. Estas características proporcionam uma opção muito atraente do uso da cana como um produtor de biomassa (CIB, 2009).

Acredita-se que a cana-de-açúcar tenha seu centro de origem no Sudeste Asiático. Cultivada desde a pré-história, a melhoria de sua prática de cultivo foi ocorrendo de forma natural até o final do século XIX, quando ocorreram os primeiros cruzamentos interespecíficos (*Saccharum officinarum* x *Saccharum spontaneum*) na tentativa de agregar características favoráveis de cultivo e produção (Cesnik & Miocque, 2004). Desde então, especialistas e pesquisadores foram aprimorando a qualidade da planta, apesar de sua complexa composição genética.

Essa complexidade do genoma da cana-de-açúcar é um desafio para os programas de melhoramento. No entanto, com os avanços da biologia molecular e com o auxílio da estatística, um progresso significativo foi obtido nos estudos da estrutura genética da cana (Heller-Uszynska et al., 2010). Ferramentas, como os marcadores moleculares, podem auxiliar no processo de obtenção de novas cultivares.

Segundo Schuman (2006), um marcador molecular é uma sequência de nucleotídeos localizada numa posição específica do genoma, a qual deve apresentar variabilidade suficiente entre genótipos para que seu padrão de herança possa ser

analisado. Marcadores moleculares detectados no próprio genoma revelam sítios de variações neutras diretamente na sequência de DNA. Por serem neutras, significam que, ao contrário dos marcadores morfológicos, essas variações não se mostram no fenótipo, podendo ser nada mais do que uma diferença de um único nucleotídeo ou de um fragmento de DNA repetitivo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Inúmeras são as técnicas que podem detectar polimorfismos diretamente na estrutura do DNA. Estas técnicas são baseadas na ação de enzimas de restrição e na hibridização da fita de DNA, como os marcadores RFLPs. Outras metodologias de marcadores fundamentam-se na amplificação do DNA via PCR, como os RAPDs e SSRs (microssatélites). Existem ainda as técnicas que utilizam enzimas de restrição e subsequente amplificação dos fragmentos de DNA, como é o caso dos AFLPs.

Com os avanços das tecnologias de sequenciamento e da computação surgiram novas classes de marcadores, como os que dependem diretamente da análise de sequências do DNA, os SNPs, e os baseados na técnica de hibridização por microarranjo, os marcadores DArT.

DArT é a sigla referente a *Diversity Arrays Technology*, técnica que permite a observação simultânea de várias centenas de locos polimórficos espalhados pelo genoma. Esta técnica não necessita de informações da sequência de DNA ou de primers específicos e tem baixo custo de genotipagem por loco. Os marcadores DarTs são bialélicos, comportam-se de maneira dominante (presença ou ausência) ou co-dominante (dose dupla, dose única ou ausência) (Jaccoud et al., 2001).

Marcadores com grande densidade no genoma, como os DArT, estão sendo utilizados em várias espécies de importância agronômica, por exemplo, em cevada (Wenzl et al., 2004), trigo (Akbari et al., 2006), arroz (Xie et al., 2006), sorgo (Mace et al., 2008), cana-de-açúcar (Heller-Uszynska et al., 2010) entre outras culturas. Nestes trabalhos os marcadores DArT foram aplicados para caracterizar coleções de germoplasma, avaliar a diversidade genética e principalmente na construção de mapas genéticos de alta resolução.

De acordo com Ferreira & Grattapaglia (1998), a construção de mapas genéticos é uma das aplicações de maior importância da tecnologia de marcadores no melhoramento de plantas, pois possibilita a análise completa de genótipos, a localização das regiões genômicas que controlam caracteres de importância, a

quantificação do efeito destas regiões nas características estudadas e a canalização de toda esta informação para seu uso em programas de melhoramento.

Com o objetivo de construir um mapa genético de alta resolução para a cultura da cana-de-açúcar, foram utilizados marcadores DArT para genotipar indivíduos de uma geração F1 originária do cruzamento de duas variedades comerciais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal e extração do DNA genômico

Para a extração do DNA genômico foram coletadas gemas axiais de 186 genótipos provenientes do cruzamento entre as variedades comerciais RB 97-327 e RB 72-454. O cruzamento foi realizado na Estação Experimental da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucro-Alcooleiro – Ridesa, localizada na região da Serra do Ouro em Murici-AL e as sementes produzidas foram encaminhadas à Universidade Federal de Goiás. Após a obtenção das mudas em casa-de-vegetação, o experimento foi transplantado para uma área da Usina Centroálcool, localizada no município de Inhumas - GO (16°20'50"S, 49°29'2"W).

O DNA genômico foi isolado de acordo com o protocolo proposto por Aljanabi et al. (1999) com adaptações. Em seguida, realizou-se a quantificação do DNA no espectrofotômetro Qubit (*Invitrogen*®). Após a quantificação, as amostras foram homogeneizadas a uma concentração de 60 ng/μL com volume final igual a 20 μL e distribuídas em duas placas *full skirted* de 96 poços. As placas foram lacradas com tiras de oito *caps*, envoltas em papel filme PVC e armazenadas a menos -20 °C até a data do envio para a plataforma de genotipagem na Austrália.

Genotipagem por hibridização numa plataforma de *microarray*.

A tecnologia dos marcadores DArT foi proposta por Jaccoud et al. (2001), e atualmente é desenvolvida pela empresa prestadora de serviços *Diversity Arrays Technology Pty Ltd* (DArT P/L), localizada na cidade de Yarralumla na Austrália. Após o preparo das amostras, o material foi acondicionado numa caixa de isopor e enviado via postal em temperatura ambiente, seguindo as orientações da DArT P/L.

O método de geração dos marcadores DArT consiste basicamente em seis etapas: redução da complexidade do DNA genômico, criação de uma biblioteca genômica (representação genômica), confecção de microarranjos das representações genômicas em lâminas de vidro, hibridização do DNA marcado, leitura do sinal fluorescente emitido pela hibridização, extração e análise dos dados.

Mapeamento genético

Para realizar a construção do mapa de ligação, a tabela de pontuação (0/1) gerada automaticamente a partir do DArTSoft (software utilizado para analisar as imagens dos *microarray*) será convertida num formato compatível ao software MapMaker EXP versão 3.0. O MapMaker é um software gratuito e amplamente utilizado nos estudos de mapeamento genético. No entanto, sua última atualização é de 1993.

RESULTADOS ESPERADOS

Ao final das análises, estama-se que 7000 locos sejam genotipados e que 5% dos locos apresentem polimorfismo (aproximadamente 350 marcadores DArT). Deste total, espera-se que a maioria dos marcadores tenham segregação Mendeliana, nas razões de 1:1 para marcadores de dose única (single-dose) e de 3:1 para marcadores de dose única presente nos dois parentais e para marcadores de dose dupla (double-dose) presentes em apenas um parental. Após a avaliação dos marcadores e a retirada daqueles que apresentarem distorções de segregação, a expectativa é que 300 marcadores possam ser utilizados para a construção do mapa genético.

Estas estimativas foram baseadas num trabalho realizado por Heller-Uszynska et al. (2010), em que a segregação dos marcadores DArT em cana-de-açúcar foi avaliada em 94 genótipos, originados do cruzamento entre Q165 (cultivar australiana) e IJ76-514 (*S. officinarum*). O experimento de genotipagem resultou em 241 marcadores polimórficos. Destes, 37 apresentaram distorções de segregação e foram retirados da análise. Dos 204 (89,7%) restantes, 73% segregaram como marcadores de dose única e 27% como marcadores de dose única presente nos dois parentais ou dose dupla (double-dose) presentes em apenas um parental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-JANABI, S. M.; HONEYCUTT, R. J.; MCCLELLAND, M.; SOBRAL, B. W. S. A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. 'SES208'. **Genetics**, Pittsburg, v. 134, p. 1249-1260, 1993.

AKBARI, M.; WENZL, P.; CAIG, V.; CARLING, J.; XIA, L.; YANG, S.; USZYNSKI, G.; MOHLER, V.; LEHMENSIEK, A.; KUCHEL, H.; HAYDEN, M.J.; HOWES, N.; SHARP, P.; VAUGHAN, P.; RATHMELL, B.; HUTTNER, E.; KILIAN, A. Diversity Arrays Technology (DART) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. **Theor Appl Genet**, Out. 2006. DOI 10.1007/s00122-006-0365-4.

CESNIK, R. MIOCQUE, J. **Melhoramento da Cana-de-açúcar**. Brasília: Embrapa, 2004. 307 p.

CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA (CIB). **Cana-de-açúcar: avanço científico beneficia o país**. São Paulo, 2009. p. 20.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998.

HELLER-USZYNSKA, K.; USZYNSKI, G.; HUTTNER, E.; EVERS, M.; CARLIG, J.; CAIG, V.; AITKEN, K.; JACKSON, P.; PIPERIDIS, G.; COX, M.; GILMOUR, R.; D'HONT, A.; BUTTERFIELD, M.; GLASZMANN, J. C.; KILIAN A. Diversity Arrays Technology effectively reveals DNA polymorphism in a large and complex genome of sugarcane. **Mol Breeding**, Canberra, Maio 2010. DOI 10.1007/s11032-010-9460-y.

JACCOUD, D.; PENG, K.; FEINSTEIN, D.; KILIAN, A. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 4:e25, Jan. 2001.

MACE, E. S.; XIA, L.; JORDAN, D. R.; HALLORAN, K.; PARH, D. K.; HUTTNER, E.; WENZL, P.; KILIAN, A. DART markers: diversity analyses and mapping in Sorghum bicolor. **BMC Genomics**, Jan. 2008. DOI:10.1186/1471-2164-9-26.

SCHULMAN, A. H. Molecular markers to assess genetic diversity. **Euphytica**, v. 158, n. 3, p. 313-321, 2006.

XIE, Y.; MCNALLY, K.; LI, C. Y.; LEUNG, H.; ZHU, Y. Y. A High-throughput Genomic Tool: Diversity Array Technology Complementary for Rice Genotyping. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 48, n. 9, p. 1069-1076, Set. 2006.

WENZL, P.; CARLING, J.; KUDRNA, D.; JACCOUD, D.; HUTTNER, E.; KLEINHOF, A.; KILIAN, A. Diversity Arrays Technology (DART) for whole-genome profiling of barley. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, n. 26, p. 9915-9920, Jun. 2004.