POLIMORFISMO MOLECULAR ENTRE ACESSOS DE *Gossypium hirsutum* L. PARA MAPEAMEANTO DA RESISTÊNCIA À MANCHA-DE-RAMULÁRIA*

Valeska Silva Lucena (Embrapa Algodão – UFRN / valeskasl@hotmail.com), Lúcia Vieira Hoffmann (Embrapa Algodão), Nelson Dias Suassuna (Embrapa Algodão), Marc Giband (CIRAD), Paulo Augusto Viana Barroso (Embrapa Algodão), Wirton Macedo Coutinho (Embrapa Algodão)

RESUMO - A Embrapa Algodão vem buscando identificar genitores contrastantes fenotipicamente que permitam mapeamento molecular de genes de resistência à mancha-de-ramulária. Para isso foram realizadas extrações do DNA através do método CTAB de uma linhagem do programa de melhoramento da Embrapa Algodão, resistente à doença (CNPA CO - 11612), e de DeltaOpal, selecionada como uma das variedades mais suscetíveis. Posteriormente foram avaliados 118 *primers* microssatélites e 24 combinações de *primers* AFLP. Os fragmentos foram separados em gel de poliacrilamida a 6% e visualizados após coloração com nitrato de prata. Foi verificado que apenas 7 *primers* foram polimórficos entre os SSR , correspondendo a 6% dos testados. Os 24 *primers* AFLP geraram 394 locos, desses 8 *primers* foram polimórficos obtendo 21 locos polimórficos, o que representou uma taxa de 5,3%. Portanto o polimorfismo detectado com os marcadores SSR e AFLP foi baixo, dificultando o mapeamento da resistência à mancha-de-ramulária utilizando esse cruzamento intraespecífico.

Palavras-chave: *Gossypium hirsutum,* macha-de-ramulária, marcadores moleculares.

INTRODUÇÃO

A disponibilidade de técnicas moleculares tem permitido estudar a biologia e a arquitetura genética de várias características de importância econômica, como por exemplo, resistência à doença. No caso específico do algodão, marcadores moleculares RAPD (MULTANI e LYON, 1995; TATINENI et al., 1996; IGBAL et al., 1997; LU e MYERS, 2002), RFLP (WENDEL e BRUBAKER, 1993) e AFLP (PILLAY e MYERS, 1999; ABDALLA et al., 2001) tem sido amplamente utilizado em análises de diversidade genética entre as espécies de algodoeiro, nas relações entre as espécies cultivadas e seus parentais selvagens e na construção de mapas de ligação de resistência à varias doenças, principalmente por serem altamente polimórficos e porque seus efeitos não estão relacionados com condições ambientais e nem com a fase fisiológica da planta. Para construção de um mapa genético, a primeira etapa é a escolha de genitores contrastantes para a característica de interesse e formação de uma população segregante proveniente desses genitores. O melhorista inicialmente recorre aos genes existentes em linhagens ou cultivares comerciais, pois estas são as fontes de mais fácil acesso. Elas oferecem a indiscutível vantagem de já serem melhoradas, isto é, a freqüência de alelos que controlam características agronômicas indesejáveis é muito baixa.

Portanto objetivou-se avaliar o polimorfismo molecular utilizando-se marcadores SSR e AFLP, entre as linhagens de *Gossypium hirsutum,* CNPA CO-11612 e DeltaOpal, buscando-se a seleção de genitores contrastantes fenotípicamente quanto à doença e com alto nível de polimorfismo com o

* Trabalho financiado pelo Facual e pela Embrapa - Algodão .

intuito de utilizar este cruzamento intraespecífico no mapeamento da resistência à mancha-de-ramulária.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas as extrações do DNA pelo método CTAB *(Cetyltrimethyl Ammonium Bromide*) (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1998), das cultivares CNPA CO -11612 e DeltaOpal. Posteriormente a qualidade deste DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 0.8% (w/v), e suas concentrações foram estimadas através da comparação da intensidade de fluorescência das amostras dos algodoeiros com concentrações conhecidas do fago ʌ (*lambda)* coradas com brometo de etídio (EtBr) e visualizados em transluminador sob luz UV. O DNA extraído foi armazenado a -20ºC e dele foram preparadas amostras de trabalho (contendo 10 ng/ µL) armazenadas a 4ºC.

Os marcadores microssatélites utilizados foram provenientes de diferentes fontes, os BNLs foram desenvolvidos por Brookhaven Laboratório Nacional (E.U.A.), os JESPRs por Reddy et al., (2001) e Liu et al., (2000ab), os NAUs por Han et al., (2004), e os CIRs pelo Nguyen et al., (2004). A reação PCR foi realizada a pH 8,3 em um volume total de 20µL, contendo tampão 1x com 50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl pH 8,3 e Triton X-100 0.1% adicionado a 25ng de DNA genômico, 2mM de $MgCl_2$, 2mM de dNTP, 0.2mM de *primer* e uma unidade de Taq DNA polimerase. Foram realizados 30 ciclos de temperatura, sendo cada ciclo composto por 93°C por 1 minuto para desnaturação, 50/51/55ºC por 30 segundos para anelamento e 72°C por 1 minuto para extensão. Ao final foi incluída uma etapa 8 minutos a 72ºC para uma extensão final. As temperaturas de anelamento foram ajustadas para cada combinação de *primer*, de acordo com a recomendação de quem os desenvolveu. Após as reações foram adicionados solução contendo 0,05% de azul de bromofenol, 90% de formamida e 500mM de EDTA. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (w/v) contendo 7M de uréia e visualizados após coloração com nitrato de prata (CRESTE et. al., 2001). O comprimento dos fragmentos foi determinado visualmente por comparação com o DNA ladder AFLP de 30-330pb, a quantidade de pares de base correspondente de cada alelo foi determinada com auxílio do programa Table Curve 2D.

Os marcadores AFLP foram obtidos com o Kit AFLP *Analysis System I* da Invitrogen. Esta técnica é baseada na amplificação por PCR em que o DNA genômico foi incubado por 1h a 37ºC para digestão com a combinação das enzimas de restrição *Eco*RI e *Mse*I, posteriormente foi realizada a ligação dos adaptadores (*Eco*RI 5'- CTCGTAGACTGCTACC -3'/ 3'- CATCTGACGCATGGTTAA -5') e (*Mse*I 5' - GACGATGAGTCCTGAG - 3' / 3'- TACTCAGGACCTCAT- 5') usando a enzima T4 - DNA-ligase incubado-o por 3h a 37 ºC, os fragmentos ligados foram pré-amplificados usando *primers* constituídos de uma seqüência complementar ao adaptador uma seqüência complementar a enzima (*Eco*RI e *Mse*I) e uma base seletiva para realizar a extensão, foram realizados 20 ciclos sendo cada ciclo composto por denaturação a 94 ºC por 30 segundos, o anelamento a 56 ºC por 1 min e a etapa de extensão a 72 ºC por 1min. A amplificação seletiva foi realizada com 24 combinações de *primers* contendo três nucleotídeos seletivos, foram realizados 36 ciclos sendo cada ciclo composto por denaturação a 94 ºC por 30 segundos, o anelamento foi realizado a uma temperatura de 65ºC por 1 min no primeiro ciclo com uma redução de 0.7 ºC para os próximos 12 ciclos e a temperatura de 56ºC nos últimos 23 ciclos seguindo a etapa de extensão a 72 ºC por 1minuto. Tal como no SSR, foi adicionado às reações AFLP solução contendo 0,05% de azul de bromofenol, 90% de formamida e 500mM de EDTA. E os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (w/v) contendo 7M de uréia e visualizados após coloração com nitrato de prata (CRESTE et. al., 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No programa de melhoramento da Embrapa – Algodão foi identificado uma cultivar de *G. hirsutum* a CNPA CO-11612 que em condições de infestação natural apresentou-se resistente à mancha-de-ramulária. Portanto, esta cultivar foi escolhida para ser cruzada com a cultivar DeltaOpal, que é muito sensível à doença.

Por serem contrastantes fenotipicamente quanto à doença, foi realizada nessas cultivares a análise do polimorfismo molecular. Para isso foram analisados 118 pares de *primers* microssatélites desenvolvidos pelo CIRAD, destes 7 foram polimórficos (Fig 1, Tab.1), correspondendo a 6% dos testados.

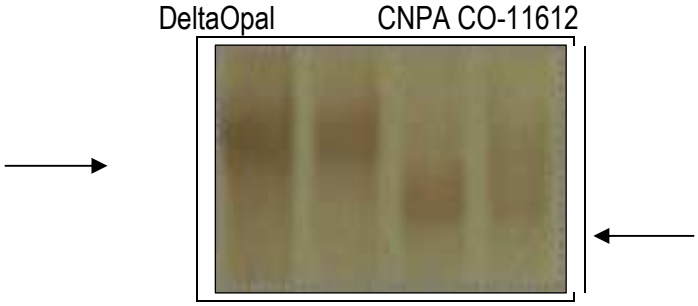

Figura 1. Polimorfismo molecular entre DeltaOpal e CNPA CO -11612 identificado com o marcador CIR-364

Tabela 1. *Primers* que geraram bandas polimórficas entre DeltaOpal e CNPA CO -11612.

Loco	Cromossomo	Tamanho aparente em (pb) pares de bases do alelo de DeltaOpal	Tamanho aparente em (pb) pares de bases do alelo de CNPA CO-11612
CIR 17	C1	128	131
CIR 63	C20	156	154
CIR 148	C12	147	150
CIR 249	C4	188	183
CIR 364	C5	155	153
CIR 373	C5	166	172
CIR 381	C14	247	252

Posteriormente foi feita a análise com o marcador molecular AFLP, foram avaliadas 24 combinações de *primers*. Foi verificado que o número de locos polimórficos variou de 1 a 9, de acordo com a combinação de *primer* utilizada, como demonstrado na Tabela 2. A combinação EACA+MCAG foi a que gerou um maior número de locos polimórficos por uma única reação de PCR gerando uma taxa de polimorfismo de cerca de 15%. Foram identificados um total de 21 locos polimórficos com todas as combinações de *primers* avaliadas totalizando 308 locos, obtendo uma taxa de polimorfismo total de 5,3%.

Figura 2. Perfil de AFLP obtido com os *primers* EAAC+MCAA entre DeltaOpal e CNPA CO -11612. A seta indica a banda polimórfica presente em CNPA CO-11612 e ausente em DeltaOpal

Tabela 2. *Primers* AFLPs polimórficos, número total de locos e número de locos polimórficos entre as linhagens DeltaOpal e CNPA CO-11612.

Primer	**Locos**	**Locos Polimórficos**
EACA+MCAG	61	9
EAAC+MCAG	54	1
EAAG+MCAC	58	1
EAAC+MCAA	35	1
EACG+MCAC	27	4
EACG+MCAG	14	1
EACG+MCAT	27	3
EACG+MCTC	32	1

Portanto o polimorfismo molecular existente entre CNPA CO-11612 e DeltaOpal com os marcadores analisados foi baixo. Este resultado pode ter sido obtido devido à grande similaridade existente, já que se tratam de indivíduos da mesma variedade botânica. Resultados similares foram obtidos por. Wang et. al., (2006) que obtiveram um baixo polimorfismo entre as espécies de *G. hirsutum* Acala Nem X e Acala SJ-2, verificando que a população de mapeamento proveniente deste cruzamento intraespecífico não era informativa o suficiente para realizar o mapeamento do gene de resistência *rkn1*.

Lacape et. al., (2003) indicaram que seriam necessários cerca de 270 marcadores moleculares polimórficos com um espaçamento de aproximadamente 20cM para realizar uma completa cobertura do genoma do algodão, como o índice de polimorfismo molecular identificado foi de 6% entre os marcadores SSR, seriam necessários cerca de 1970 marcadores polimórficos para realizar este mapeamento, quantidade atualmente inviável para este projeto.

CONCLUSÃO

O mapeamento molecular dos genes de resistência à mancha-de-ramulária com o uso do cruzamento intraespecífico entre as cultivares CNPA CO-11612 e DeltaOpal é de difícil execução, devido ao baixo polimorfismo molecular obtido com os marcadores avaliados.

CONTRIBUIÇÃO PRÁTICA E CIENTÍFICA DO TRABALHO

Foi observado que mesmo sendo contrastantes fenotipicamente, se faz necessário à avaliação de outros marcadores moleculares para que se realize o mapeamento diretamente nessas cultivares. E que provavelmente deve-se buscar fontes de variabilidade no banco de germoplasma proveniente de outras espécies, como *G. barbadense*, e portanto, o uso de um cruzamento interespecífico, de forma a maximizar o polimorfismo genético existente entre os genitores para realização deste mapeamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, A. M.; REDDY, O. U. K.; EL-ZIK, K.; M.; PEPPER, A. E. Genetic diversity and relationships of diploid and tetraplóide cottons revealed using AFLP. **Theoretical and Applied Genetic,** v. 102, p.222-229, 2001.

CRESTE, S.; TULMANN, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Mol. Biol. Reporter**, v.19, p. 299-306, 2001.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.

HAN, Z.; GUO, W. Z.; SONG, X. L.; ZHANG, T. Z. Genetic mapping of EST-derived microsatellites from the diploid *Gossypium arboreum* in alloteraploid cotton. **Mol. Genet. Genom,** v. 272, p 308-327, 2004.

IQBAL, M. J.; AZIZ, N.; SAEED, N. A.; ZAFAR, Y. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetic,** v. 94, p.139-144, 1997.

LACAPE, J. M.; NGUYEN, T. B.; THIBIVILIERS, S.; BOJINOV, B.; COURTOIS, B.; CANTRELL, R. G.; BURR, B.; HAU, B. A combined RFLP-SSR-AFLP map of tetraploid cotton based on a Gossypium hirsutum x Gossypium barbadense backcross population. **Genome,** v. 46, n.4, p. 612-26, 2003.

LIU, S. CANTRELL, R. G.; MACCARTY, J. C.; STEWART, J. M. Simple sequence repeat-based assessment of genetic diversity in cotton race stock acessions. **Crop Science,** v.40, p.1459-1469, 2000a.

LIU, S.; SAHA, S.; BURR, B.; CANTRELL, R. G. Chromosomal assigment of microsatelite loci in cotton. **Journal of Heredity**, v.91, n.4, p.326-332, 2000b.

LU, H. J.; MYERS, G. O. Genetic relationships and discrimination of ten influential upland cotton varieties using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetic,** v. 105, p.325-331, 2002.

MULTANI, D. S.; LYON, B. R. Genetic fingerprinting of Australian cotton cultivars with RAPD markers. **Genome,** v. 38, p.1005-1008, 1995.

NGUYEN,T.B.; GIBAND,M.;BROTIER,P.; RISTERUCCI, A. M.; LACAPE, J.M. Wide coverage of the tetraploid cotton genome using newly developed microsatellite markers. **Theor. And Appl. Genetics,** *v.*109, p.167-175, 2004.

PILLAY M. M. G. O. Genetic diversity assessed by variation in ribosomal RNA genes and AFLP markers. **Crop Science,** v. 39, p.1881-1886, 1999.

REDDY, O. U. K., PEPPER, A. E., ABDURAKHMONOV, I., SAHA, S., JENKINS, J. N., BROOKS, T., BOLEK, Y.; EL-ZIK, K. M. New dinucleotide and trinucleotide microsatellite marker resources for cotton genome research. **Journal of Cotton Science**, v. 5, p.103-113, 2001.

TATINENI, V.; CANTRELL R. G.; DAVIS D. D. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological char-acteristics and RAPDs. **Crop Science,** v**.** 36, p. 186-192, 1996.
WANG, C.; ULLOA, M.;. ROBERTS, P. A. Identification and mapping of microsatellite markers linked to a root-knot nematode resistance gene (*rkn*1) in Acala NemX cotton (*Gossypium hirsutum* L) **Theoretical and Applied Genetics,** v.1, n.12, p. 770-777, 2006.
WENDEL, J. F. E.; BRUBAKER, C. L. RFLP diversity in *Gossypium hirsutum* L. and new insights into the domestication of cotton. **American Journal of Botany,** v. 80, p. 71, 1993.