UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES NA PURIFICAÇÃO DE UMA POPULAÇÃO F_2 DE ALGODÃO

Ivan Schuster (COODETEC/ ivan@coodetec.com.br), Marc Giband (CIRAD), Jean-Marc Lacape (CIRAD), Christopher-Robin Viot (CIRAD), Cândida H. C. de Magalhães Bertini (Universidade Federal do Ceará), Osmério Pupim Junior (COODETEC), Jean-Louis Belot (CIRAD-COODETEC)

RESUMO - Os marcadores moleculares têm sido utilizados em diversas etapas dos programas de melhoramento genético. Uma nova aplicação de marcadores microssatélites, visando a purificação de populações segregantes, está descrita neste trabalho. Uma população supostamente F2 de algodoeiro, constituída de 196 plantas foi avaliada com marcadores microssatélites, e um grande número de plantas homozigotas com genótipo materno em todos os locos analisados foi identificado. Uma análise com base nas proporções esperadas dos genótipos de marcadores foi realizada, e 108 plantas que foram homozigotas para o genótipo materno em todos os locos avaliados foram eliminadas da população. As plantas foram eliminadas com uma probabilidade mínima de 99,98% de terem sido obtidas por autofecundação, e somente cinco plantas, das 108, apresentaram probabilidade inferior a 100%. A população F2 estava sendo avaliada quanto à resistência à Doença Azul do algodoeiro, e sem a purificação, a hipótese de segregação de dois genes teria sido aceita. Após a purificação, a hipótese de herança de um gene dominante foi aceita. Os resultados demonstram a importância da certificação da pureza das populações segregantes em estudos genéticos.

Palavras-chave: algodoeiro, marcadores moleculares, microssatélites, populações segregantes.

INTRODUÇÃO

Os marcadores moleculares podem ter um grande número de aplicações em todas as fases de um programa de melhoramento, tais como no pré-melhoramento (PEREIRA e PEREIRA, 2006), melhoramento propriamente dito (GUIMARÃES et al., 2006), e no pós melhoramento (SCHUSTER et al., 2006). Os marcadores moleculares detectam o polimorfismo diretamente em nível de DNA, não sofrendo qualquer tipo de influência ambiental ou gênica. Seu número é ilimitado e são desprovidos de efeitos epistáticos ou pleiotrópicos. Quando comparados aos marcadores fenotípicos, eles apresentam um número maior de alelos por loco (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996)

Um marcador ideal deve ser polimórfico entre os parentais e apresentar segregação mendeliana para as populações segregantes. Por exemplo, a segregação observada dos genótipos dos marcadores para uma população F_2, considerando um loco com dois alelos (A e a), não deve ser significativamente diferente da segregação esperada de 1:2:1 para os genótipos AA, Aa e aa, respectivamente. O sucesso de qualquer tecnologia de marcador é dependente da disponibilidade de um grande número de marcadores altamente polimórficos, de uma estreita relação de ligação entre o loco marcador e o caráter de interesse (DUDLEY, 1993) e da facilidade com que os marcadores podem ser utilizados (SENIOR et al., 1996). Além disto, também são importantes aspectos como custo por unidade de genotipagem, neutralidade fenotípica e abundância dos marcadores moleculares no genoma (TANKSLEY, 1993).

Em espécies que se reproduzem por autofecundação, é possível que algumas supostas sementes F_1 sejam, na verdade, resultado da autofecundação do genitor feminino. Por este motivo, devem ser redobrados os cuidados com a certificação da natureza híbrida das plantas F_1. Deve-se observar a presença de genes marcadores nas plantas F_1, e no caso de não haver genes marcadores, marcadores moleculares podem ser utilizados para certificar a natureza híbrida destas plantas (GUIMARÃES et. al, 2006).

Esta certificação pode ser realizada inclusive nas populações segregantes, tais como na geração F_2, uma vez que os marcadores moleculares sejam codominantes e possam amostrar diversos locos; com a utilização de marcadores co-dominantes, pode-se acessar o genótipo de cada indivíduo da população nestes diversos locos. Este trabalho teve como objetivo purificar uma população F2 de algodoeiro, utilizando marcadores moleculares microssatélites.

MATERIAL E MÉTODOS

A população F_2 utilizada foi obtida através do cruzamento entre as cultivares CD 401 e FM 966 de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). No cruzamento utilizou-se CD 401, a variedade resistente à Doença Azul como genitor feminino. As plantas F_1 foram mantidas em vasos de 20 litros contendo uma mistura de solo (latossolo) e matéria orgânica na proporção de 3:1, em uma estufa agrícola, sendo autofecundadas para obtenção da geração F_2. Esta população foi originalmente preparada para o estudo da herança da resistência do algodoeiro à Doença Azul.

Cento noventa e seis plantas F_2 foram cultivadas em casa-de-vegetação, das quais foram coletados pequenos discos de folhas para a extração de DNA. As plantas também foram inoculadas com pulgões virulíferos para o estudo da herança da resistência à Doença Azul.

Cada planta F_2 foi genotipada usando trinta e cinco marcadores microssatélites, gerando resultados de genotipagem entre 6 e 35 locos para cada planta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da população F2 com marcadores microssatélites apresentou um número excessivo de plantas com genótipos homozigotos (Fig. 1).

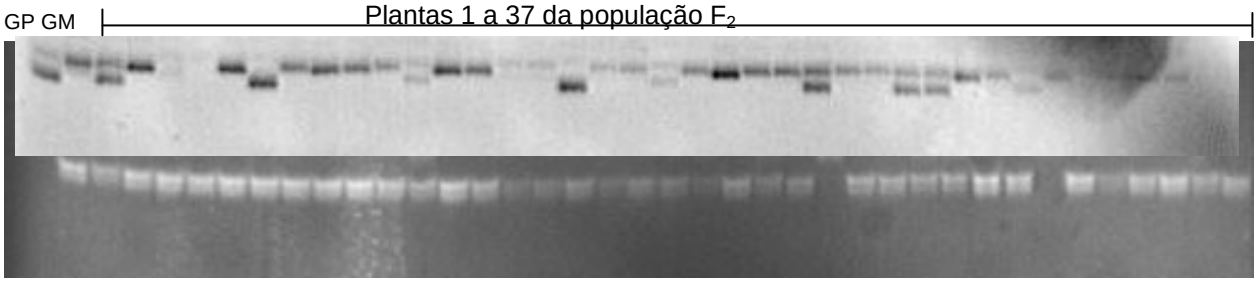

Figura 1. Amplificação de parte da população F2 do cruzamento entre CD 401 e FM 966, com o "primer" BNL946, mostrando o número excessivo (28/37) de plantas com o alelo materno no estado homozigoto . GM = Genitor materno resistente (CD 401) e GP = Genitor paterno suscetível (FM 966).

Com a utilização dos marcadores moleculares, verificou-se uma quantidade muito grande de plantas com genótipo materno (CD 401) na população F_2 (Fig. 1), o que não é comum, pois apenas 1/4 da plantas deveriam ter o genótipo materno em cada loco analisado. Neste caso, a hipótese mais provável foi a de ter ocorrido uma mistura de sementes verdadeiramente F_1 (Aa) com sementes

supostamente F_1, mas com genótipo AA, ou seja, sementes do genótipo materno. A origem destas sementes poderia ter sido a autofecundação das plantas de CD 401 antes de ser realizado o cruzamento

Uma vez que os dados de marcadores moleculares indicaram a possibilidade de que a população F_2 utilizada poderia não ser uma F_2 verdadeira, os marcadores moleculares do tipo microssatélites foram utilizados para purificar esta população. Para isso, foi considerada a probabilidade de obtenção de genótipos homozigotos maternos em uma população F_2 e os genótipos obtidos pelos marcadores moleculares.

Ao avaliar *n* locos, a probabilidade de que uma planta F_2 seja homozigota com genótipo materno para todos os locos é $P=(1/4)^n$, e a probabilidade de ter pelo menos uma planta com genótipo diferente é $P=1-(1/4)^n$. Uma avaliação criteriosa destes dados demonstrou que um grande número de plantas apresentava genótipo homozigoto para o genótipo materno em todos os locos avaliados (Tab. 1).

Plantas supostamente F_2 que apresentaram 100% de genótipo homozigoto materno, avaliadas em pelo menos seis locos, foram consideradas como produtos de autofecundação do genitor feminino, com probabilidade de 99,98%. As plantas que foram heterozigotas ou homozigotas para o genitor masculino, em pelo menos um loco, foram consideradas como indivíduos autênticos que realmente constituíram a geração F_2.

Todas as plantas que apresentaram genótipos homozigotos maternos para todos os locos avaliados, e que foram avaliadas em pelo menos seis locos, foram eliminadas da população F2, pois a probabilidade destas plantas serem originárias da autofecundação do progenitor feminino foi igual ou superior a 99,98%. No total, das 196 plantas que originalmente compunham a população supostamente F2, 108 plantas foram eliminadas por este critério. Além disso, outras 14 plantas que não tinham nenhum dado molecular também foram eliminadas da população, restando 74 plantas, cujos dados moleculares comprovaram ser realmente da geração F2 (Tab. 1).

Os primeiros resultados obtidos pela avaliação de 196 plantas F_2 quanto à resistência à Doença Azul, indicaram que a hipótese de a resistência ser condicionada por dois genes dominantes e independentes seria aceita com probabilidade de 81% (Tab. 2).

Os dados da hipótese de dois genes dominantes (segregação 15R:1S) foram aceitos antes da purificação da população com marcadores moleculares pois, nos cruzamentos realizados para a obtenção da população segregante, a cultivar CD 401, que é resistente à doença azul, foi utilizada como genitor feminino. Considere-se que a população F_2 tenha sido obtida pela autofecundação de duas plantas supostamente F_1, mas que uma destas plantas F_1 tenha sido obtida por autofecundação do progenitor feminino. Esta suposta população F_2 será constituída, então de cerca de 50% de plantas F_2 e 50% de plantas do progenitor feminino. Esta população, contendo a mistura, apresenta metade das plantas com fenótipo dominante simplesmente por serem plantas do progenitor feminino. A outra metade da população apresenta uma segregação 3:1. Assim, na sua totalidade, esta população deverá ter 7/8 de plantas com fenótipo dominante (3/4 + 4/4) e 1/8 de fenótipo recessivo, o que resulta em uma proporção 7:1 ou 14:2, que é muito próxima da razão teórica de 15:1 esperada para dois genes. Considerando-se que no caso da população avaliada para resistência à doença azul, a proporção de plantas do progenitor feminino misturadas na população F_2 foi próxima a 60%, a razão entre os fenótipos dominante:recessivo aproximou-se ainda mais da razão teórica esperada para a segregação de dois genes.

Após a purificação da população com os marcadores microssatélites, a hipótese de resistência condicionada por um gene passou a ser aceita (P=89,32%) (Tab. 2).

Tabela 1. Número de plantas excluídas da população supostamente F_2, classificadas como resultantes da autofecundação do progenitor feminino, e probabilidade associadas à tomada de decisão.

Locos Avaliados Homozigotos Maternos	Número de Plantas[1]	Probabilidade (%)[2]
6	2	99.9756
8	1	99.9985
9	1	99.9996
10	1	99.9999
12	1	100.0000
13	1	100.0000
14	2	100.0000
15	3	100.0000
16	1	100.0000
17	1	100.0000
18	1	100.0000
20	4	100.0000
21	2	100.0000
22	6	100.0000
23	3	100.0000
24	1	100.0000
25	11	100.0000
23	31	100.0000
27	2	100.0000
28	0	100.0000
29	4	100.0000
30	2	100.0000
31	4	100.0000
32	1	100.0000
33	6	100.0000
34	5	100.0000
35	11	100.0000
Total de plantas eliminadas	108	

[1] Número de plantas classificadas como autofecundação do progenitor feminino com base no número de locos relacionado na primeira coluna.
[2] Probabilidade da planta ser resultado de autofecundação do progenitor feminino, com base no número de locos avaliados.

É importante observar que a utilização de marcadores moleculares permitiu a purificação da população F_2 e, caso esta purificação não ocorresse, uma falsa hipótese teria sido aceita. Em espécies que se reproduzem por autofecundação, é possível que algumas supostas sementes F_1 sejam, na verdade, resultado da autofecundação do genitor feminino antes da polinização. Por este motivo, devem ser redobrados os cuidados com a certificação da natureza híbrida das plantas F_1. Deve-se observar a presença de genes marcadores nas plantas F_1, e no caso de não haver genes marcadores, marcadores moleculares podem ser utilizados para certificar a natureza híbrida destas plantas (GUIMARÃES et. al, 2006).

Tabela 2. Análise de segregação de uma população F_2 de algodoeiro para resistência à Doença Azul antes e depois da purificação com o uso de marcadores moleculares microssatélites.

F_2 antes da purificação com marcadores moleculares				
Classe	**Observado**	**Esperado – 2 genes dominantes e independentes (15:1)**	**χ^2**	**P**
R	182	182,8125	0,0577	81%
S	13	12,1875		
F_2 após a purificação com marcadores moleculares				
Classe	**Observado**	**Esperado – 1 gene dominante (3:1)**	**χ^2**	**P**
R	56	55,5	0,018	89,32%
S	18	18,5		

Esta certificação pode ser realizada inclusive nas populações segregantes, tais como na geração F_2, uma vez que os marcadores moleculares podem amostrar diversos locos; com a utilização de marcadores co-dominantes, pode-se acessar o genótipo de cada indivíduo da população nestes diversos locos.

CONCLUSÕES

A utilização de marcadores moleculares permitiu a purificação da população F_2.

CONTRIBUIÇÃO PRÁTICA E CIENTÍFICA DO TRABALHO

Este trabalho demonstrou, pela primeira vez, a utilização de marcadores moleculares na purificação de populações segregantes, e a importância da obtenção de populações segregantes livres de contaminação, para a correta tomada de decisão em estudos genéticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DUDLEY, J.W. Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. **Crop Sciences,** v.33, p.660-668, 1993.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 2 ed. Brasília: Embrapa – Cenargen, 1996. 220p.

GUIMARÃES, C.T.; SCHUSTER, I.; MAGALHÃES, J.V.; SOUZA JÚNIOR, C.L. Marcadores moleculares no melhoramento de plantas. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T (Eds.) **Marcadores moleculares.** Viçosa, MG, [s.n.], 2006.p.107-144.

PEREIRA, M.G., PEREIRA, T.N.S. Marcadores moleculares no pré-melhoramento. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T (Eds.) **Marcadores moleculares.** Viçosa, MG: [s.n.], 2006.p.85-106,

SCHUSTER, I.; VIEIRA, E.S.N.; PADILHA, L. Marcadores moleculares no pós-melhoramento. . In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T (Eds.) **Marcadores moleculares.** Viçosa, MG: [s.n.], 2006. p.205-230,

SENIOR, M.L.; CHIN, E.C.L.; LEE, M.; SMITH, J.S.C.; STUBER, C.W. Simple sequence repeat markers developed from maize sequences found in the GenBank database: map construction. **Crop Science,** v.36, p.1676-1683, 1996.

TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics,** v.27, p.205-233, 1993.