



DEFINIÇÃO DE METODOLOGIAS ASSOCIADAS À UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A DOENÇAS EM ALGODOEIROS

Fernanda Oliveira da Cunha Magalhães¹; Neiamarte Oliveira da Cunha²; Paulo Augusto Viana Barroso¹; Nelson Dias Suassuna¹; Lucia Vieira Hoffman¹; Laísa Nogueira Allem²; Irandilson Pessoa Pinto de Menezes²; Amanda Alves Branquinho²

¹ Embrapa Algodão; ² Bolsista Embrapa Algodão

RESUMO- O uso de marcadores moleculares microssatélites requer extração e quantificação de DNA, amplificação por PCR e comparação dos alelos em géis de acrilamida ou em sequenciador capilar. Com o objetivo de comparar metodologias de genotipagem em relação à determinação de genótipos e seus respectivos erros e cuidados para a validação do uso de marcadores SSR para seleção de plantas de algodoeiro resistentes à doença azul, as mesmas amostras foram genotipadas utilizando géis de acrilamida corados com nitrato de prata, sequenciador ABI 3100 e o RT-PCR. Conforme relatado na literatura, quando utilizado o marcador SSR DC20027 para identificar as plantas que apresentam o gene de resistência para doença azul, o marcador apresentou um alelo de 200pb em plantas suscetíveis e 202pb em plantas resistentes e, conseqüentemente, pode-se utilizar esse dado como guia para seleção assistida. Os resultados demonstraram diferenças significativas na determinação do genótipo e entre os heterozigotos. Foi observado que a prata está mais suscetível a apresentar erros de genotipagem de heterozigotos em relação às outras duas metodologias. O RT-PCR é uma técnica com menor erro de genotipagem, porém, com maior custo que as demais.

Palavras-chave- *Gossypium*, marcadores microssatélites, seleção assistida, sequenciador

INTRODUÇÃO

A utilização de marcadores moleculares para seleção de plantas resistentes a algumas doenças vem se viabilizando há alguns anos com a identificação de marcadores moleculares microssatélites ou SNPs ligados a genes de resistência a doença azul (FANG et al., 2010), bacteriose (XIAO et al., 2010) ou nematóides (WANG et al., 2006).

Há dois motivos principais que torna mais factível a utilização de marcadores moleculares ligados à resistência de plantas em relação a outros usos de utilização de marcadores moleculares. O primeiro é devido à resistência ser conferida por um pequeno número de genes ou loci gênicos – quando comparado, por exemplo, a características de fibra, controlada por um número maior de loci gênicos. Isto é importante para facilitar a utilização efetiva pelo resultado conferido pelo marcador pelo programa de melhoramento, já que os genes inferidos pela presença do marcador têm um efeito importante na resistência, enquanto que, caso fossem um número grande de genes, possivelmente

cada um apresentasse um pequeno efeito. O segundo motivo que ressalta a importância do uso de seleção assistida para resistência a doenças é a necessidade da presença do patógeno para caracterizar a resistência da planta.

Biotecnologia

O melhoramento então depende da distribuição natural ou artificial da doença, que pode ser variável ano a ano, dependente de inóculo ou de clima, enquanto que a distribuição artificial pode ser especialmente difícil no caso dos vírus transmitidos por vetores. Com o uso do marcador, pode-se inferir, mesmo se o patógeno não estiver presente, se a planta ou genótipo é resistente ou suscetível.

No caso da doença azul, o uso dos marcadores moleculares SSR ou SNPs para seleção assistida depende da efetiva correlação entre a resistência apresentada pela planta e a presença do marcador a ser verificado, além da utilização de metodologias eficientes e confiáveis no laboratório (OLIVEIRA et. al., 2010). O uso de marcadores moleculares microssatélites requer extração e quantificação de DNA, amplificação por PCR e comparação dos alelos em géis de acrilamida ou em sequenciador capilar.

O Real Time PCR refere-se ao conjunto de tecnologias que utiliza sondas químicas fluorescentes para controlar o acúmulo de produto de PCR em uma reação em tempo real, e não apenas no fim do processo como acontece na PCR convencional (GLYNN et al., 2006).

Neste trabalho estão descritos comparações destes métodos e cuidados para a validação do uso de marcadores SSR para seleção de plantas de algodoeiro resistentes a doença azul.

METODOLOGIA

Onze plantas de algodoeiro de cinco diferentes variedades foram inoculadas com seis pulgões por planta, previamente alimentados em plantas com sintomas típicos de doença azul por 48 horas. A extração do DNA das plantas foi realizada conforme protocolo recomendado em www.diversityarrays.com onde o tecido foliar foi colocado em microtubos de capacidade de 2,0 mL contendo uma esfera de 3 mm de diâmetro. Adicionou-se 1000 µL de tampão de extração, pré-aquecido a 65 °C, composto por 0,35M de Sorbitol, Tris HCl (pH 7,5), EDTA (pH 7,5), 2M de NaCl, CTAB 2%, Sarcosyl 5%, PVP (2% v/v) e Bissulfito de Sódio (0,5% v/v). A suspensão foi incubada em banho-maria, a 65 °C por 60 minutos e emulsionada, por inversão do microtubo, 30 vezes, com 1000 µL de clorofórmio e álcool isoamilico (24:1). Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 13200 rpm por 20 minutos. À fase aquosa foram adicionados 500 µL de isopropanol gelado, invertendo-se por aproximadamente 30 vezes até o ácido nucléico tornar-se visível. As amostras foram levadas ao

freezer -20°C por 2h e, posteriormente, centrifugadas a 13200 rpm por 30 minutos. O DNA precipitado foi lavado três vezes, sendo duas com álcool 70% (v/v) e a última com álcool absoluto, e ressuspenso em tampão T.E.

Biotecnologia

As amostras extraídas foram quantificadas por três diferentes procedimentos que foram comparados entre si. Para quantificação por Sybr Gold ou brometo de etídeo, o DNA foi aplicado em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2 mM; ácido bórico 89 mM), submetido à eletroforese por 1h a 160 V, corado no caso do brometo e visualizado com transluminador de luz ultravioleta, comparando as amostras com concentrações conhecidas de DNA *Lambda* (50; 100; 200 e 300 ng). As mesmas amostras foram quantificadas com Sybr Gold utilizando a mesma técnica do brometo. O terceiro método de quantificação foi realizado utilizando o Espectrofotômetro Nanovue Plus da GE Healthcare pipetando 2 µL diretamente sobre a placa utilizada para medição.

As amostras quantificadas foram diluídas para 5ng de DNA e genotipadas com o *primer* DC20027 (FANG et al., 2010), que amplifica um marcador microsatélite ligado ao gene que confere resistência a doença azul. Como controles para os alelos ligados ao marcador ligado ao gene de resistência utilizou-se as variedades Delta Opal, enquanto que a variedade FM966 serviu como controle onde o gene de resistência não está presente, utilizando as metodologias de gel de acrilamida corado com nitrato de prata ou sequenciador ABI 3100.

A reação para coloração com nitrato de prata foi realizada para volume final de 15 µL, contendo Tampão1X, 3,5mM MgCl₂, 0,6 µM de cada Primer (forward e reverse), 0,2mM dNTP, 1U TAQ e 15 ng de DNA. Esta reação foi submetida ao programa de ciclagem com denaturação inicial a 95 °C por 3 minutos; seguido de 35 ciclos contendo uma etapa de denaturação a 94 °C por 45s; uma de anelamento a 55°C por 45s e uma de extensão a 72 °C por 1 minuto. E por fim, 72 °C por 10 minutos de extensão final. Foi aplicado 5 µL do produto de PCR com 2 µL do tampão de carregamento (azul de bromofenol e xileno ciano) e os fragmentos do DNA produzidos foram separados em de gel de poliacrilamida 6% e corados com nitrato de prata (CRESTE, 2001).

A PCR para o sequenciador foi conduzida em sistema usando o Kit PCR Multiplex (Qiagen). Esta reação foi realizada para volume final de 5 µL, contendo 10 ng de DNA, 2,5 µL de 2x Qiagen multiplex PCR Master mix (HotStarTaq DNA Polymerase, PCR amplification buffer, 3mM de MgCl₂), 0,5 de Q-solution, 0,24µM de cada par de primer (forward e reverse) e água livre de RNAase. A programação da PCR em termociclador seguindo as etapas: denaturação inicial a 95°C por 15 minutos;

seguido de 34 ciclos e cada consistindo de uma etapa de denaturação a 95 °C por 1 minuto; uma de anelamento a 55 °C por 1,5 minuto e uma de extensão a 72 °C por 1 minuto. E por fim, 60 °C por 30 minutos de extensão final.

Biotecnologia

Em seguida foi preparado um mix contendo 0,5 µL desta diluição, 0,08µL de Rox 500 GeneScan e formamida a 94,2%. Este foi denaturado a 95°C por 5 minutos e submetido a eletroforese de capilar em sequenciador automático ABI 3100. O tamanho dos fragmentos amplificados em pares de bases foi estimado usando o programa Genemapper versão 3.5.

O SNP NG0204310 foi revelado em reação com 20 µL para o Real Time contendo TaqMan Genotyping Master Mix, Primer e sonda NG0204310 (Applied Biosystems) e 10ng de DNA. As condições de amplificação foram: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, com 40 ciclos de 92 °C 15 s e 60 °C 1 min, usando o equipamento ABI 7300 Real-Time PCR System e os alelos genotipados com software SDS 1.1 (Applied Biosystems).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação de DNA com brometo de etídio ou Sybr Gold foi comparada em 18 amostras para as mesmas quantidades de DNA de algodão. Verificou-se que quantidades menores de 30ng foram reveladas por Sybr Gold (Figura 1) e que as mesmas quantidades não foram reveladas pelo brometo de etídio. Assim, a comparação para quantificação de DNA mostrou o Sybr Gold mais sensível que o brometo de etídio para detecção de baixo nível de DNA, com maior robustez por incluir a possibilidade de uso de pequenas quantidades de DNA, de até cerca de 30 ng. As duas quantificações foram realizadas por estimativa ao comparar com concentrações conhecidas de *Lambda* DNA, e não se diferenciaram entre si para quantidades maiores que 50 ng. Ao usar o Nanovue obteve uma quantificação rápida e precisa da concentração das amostras utilizando menor volume de amostra e com possibilidade de recuperação da mesma utilizando uma pipeta o que proporciona uma maior facilidade de manuseio de amostras.

Todas as onze plantas que apresentaram sintomas de doença azul quando inoculadas com pulgão vetor apresentaram o alelo de 200pb não ligado ao gene de resistência quando genotipadas com o marcador SSR DC20027 com gel de acrilamida e coloração com nitrato de prata. A genotipagem das plantas foi compatível com o comportamento apresentado pelas linhagens às quais pertenciam estas plantas no campo quanto a resistência a doença azul.

A comparação da genotipagem pelo marcador DC20027 pelo gel de acrilamida ou sequenciador capilar foram feitas em 74 plantas do programa de melhoramento. Os resultados foram idênticos para 72 das 74 plantas. Duas das plantas apresentaram-se como possíveis heterozigotas nos

Biotecnologia

géis de acrilamida, em um perfil que gerava dúvida devido ao fato de uma das bandas apresentar intensidade maior que a outra, o que não deveria ocorrer no caso de heterozigotos. A genotipagem no sequenciador mostrou claramente que não se tratavam de heterozigotos, e sim sombreamento no gel. A homozigidade das amostras foi confirmada pelos SNPs revelados com sondas no termociclador em tempo real.

No uso em rotina, não existe a necessidade da confirmação dos resultados em diferentes metodologias, utilizadas apenas para validação inicial.

CONCLUSÃO

O Espectrofotômetro Nanovue possui uma técnica mais rápida e precisa para quantificação de DNA, pois mesmo o Sybr Gold sendo mais sensível que o brometo ambas são realizadas por estimativa. O RT-PCR é uma técnica com menor erro de genotipagem, porém, com maior custo que as demais.

Observou-se que o uso de controles com mesmos alelos para verificar o perfil do pico no sequenciador diminui os erros, porém, na prática há uma maior probabilidade de erros porque mesmo usando o controle isso não impede a formação de sombra nas amostras ocasionando os falsos heterozigotos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, n. 04, p. 299-306, 2001.

FANG, D. D.; XIAO, J. H.; Canci, P. C. A new SNP haplotype associated with blue disease resistance gene in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 120, n. 5, p. 943-953, 2010.

GLYNN, B.; LAHIFF, S.; WERNECKE, M.; BARRY, T.; SMITH, T.J.; MAHER, M. Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, n. 2, p. 126-139, 2006.

OLIVEIRA, T. S.; HOFFMANN, L. V.; ALVES, P. F.; LUCENA, V. S.; SILVA FILHO, J. L. Validação de métodos laboratoriais aplicadas a análises com marcadores microssatélites. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 2, p. 279-284, 2010.

WANG, C.; ULLOA, M.; ROBERTS, P. A. Identification and mapping of microsatellite markers linked to a root-knot nematode resistance gene (*rkn1*) in Acala NemX cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, n. 4, p. 770-777, 2006.

XIAO, J.; FANG, D. D.; BHATTI, M.; HENDRIX, B.; CANTRELL, R. A SNP haplotype associated with a gene resistant to *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Molecular Breeding**, v. 25, n. 4., p. 593-602, 2010.