

DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA DE TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) PARA ANÁLISES GENÉTICAS EM MANDIOCA

Gilmara Alvarenga Fachardo Oliveira⁽¹⁾, Eder Jorge de Oliveira⁽²⁾ e Vanderlei da Silva Santos⁽²⁾

⁽¹⁾Estudante de Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, e-mail: gfachardo@yahoo.com.br; ⁽²⁾Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Rua da Embrapa, s/n, Caixa Postal 007, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA e-mail: eder@cnpmf.embrapa.br; vssantos@cnpmf.embrapa.br

Introdução

Os desafios impostos ao melhoramento da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) são grandes e impõem a agregação de novas ferramentas no estudo da variabilidade e da herança a fatores bióticos e abióticos. Neste sentido a incorporação de ferramentas de biotecnologia aos programas tradicionais de melhoramento é uma realidade, para maximizar os ganhos genéticos e os estudos de conservação, diversidade e seleção assistida.

Diversos tipos de marcadores têm sido utilizados para os estudos moleculares na cultura da mandioca, a exemplo do RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) (Fregene et al., 1997); microsatélites e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Kunkeaw et al., 2010); AFLP, microsatélites genômicos, derivados de EST e SRAPs (*Sequence-Related Amplified Polymorphisms*) (Chen et al., 2010).

Os diferentes tipos de marcadores exploram polimorfismos em diversas regiões do genoma da mandioca. Contudo, a grande disponibilidade de dados de sequências expressas de DNA tem possibilitado o desenvolvimento de marcadores fisicamente associados a regiões codificantes. Assim, a tarefa de utilizar estas sequências de DNA em estudos de associação com fenótipos de especial importância agrônômica depende do desenvolvimento de marcadores moleculares. Neste sentido, a técnica chamada de TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) utiliza informações de EST (*Expressed Sequence Tags*) para gerar polimorfismos relacionados a genes candidatos. Neste caso são combinados iniciadores fixos desenhados a partir das ESTs de interesse com um iniciador arbitrário com um núcleo rico em AT ou GC. Esta técnica possui como vantagens, a alta reprodutibilidade, simplicidade, o acesso a regiões relacionadas a genes e a capacidade de produzir padrão de bandas semelhantes ao da técnica de AFLP (Hu & Vick, 2003). Assim, o objetivo desse trabalho foi otimizar e validar a técnica de TRAP para as mais diversas análises genéticas em mandioca.

Material e Métodos

Foram desenhados 99 iniciadores fixos a partir de sequências EST-alvo obtidas no banco de dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Estes iniciadores foram utilizados em reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) juntamente com quatro iniciadores arbitrários, constituídos por sequências aleatórias com a região central rica em AT ou CG, com alta afinidade para anelamento em regiões contendo introns ou exons, respectivamente.

Para otimização das condições de reação e amplificação desses locos foi utilizado DNA das variedades BRS Jari, Fécula branca e BRS Formosa, sendo estes acessos pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura. O DNA foi extraído utilizando-se o protocolo com CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) descrito por Doyle & Doyle (1987), com algumas modificações.

As reações de amplificação foram otimizadas em volume final de 15 µL, concentração de DNA de 10 ng; 0,2 uM dos iniciadores; 1,0 U de *Taq* DNA Polimerase; dNTP 0,2 mM; MgCl₂ 2,0 mM e concentração do tampão de 1X. As amplificações foram feitas em termociclador Veriti®96-well (Applied Biosystems), de acordo com o seguinte programa: 94 °C por 2 min; 5 ciclos a 94 °C por 45s, 35° por 45s e 72 °C por 1 min; seguidos por 30 ciclos a 94 °C por 45s, 40° por 45s, 72 °C por 1 min e etapa de extensão final de 72 °C por 7 min. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, com coloração de brometo de etídeo e visualizados sob luz UV.

Resultados e Discussão

Das 396 combinações de iniciadores de TRAP avaliadas, 231 apresentaram polimorfismo nos genótipos analisados (Figura 1). O número total de bandas variou entre 1 e 12 e o número de bandas polimórficas entre 1 e 9 (Tabela 1). Considerando a presença de pelo menos cinco bandas polimórficas, observa-se que de modo geral a combinação dos iniciadores fixos com os aleatórios Arbi1 e Arbi2 apresentaram maior número de combinações altamente polimórficas, 21 e 18, respectivamente. Por outro lado, foram observadas 10 e 2 combinações com o Arbi3 e Arbi4, respectivamente, contendo mais de cinco bandas polimórficas por combinação (Tabela 1).

A percentagem de polimorfismo observada nos marcadores TRAP na análise de apenas três genótipos de mandioca variou de 44,4% (Arbi2+Trap7, Arbi2+Trap43 e Arbi2+Trap27) a 100% (Arbi1+Trap2, Arbi1+Trap8, Arbi1+Trap13, Arbi1+Trap14, Arbi1+Trap16, Arbi1+Trap18, Arbi1+Trap22, Arbi1+Trap34, Arbi1+Trap47, Arbi1+Trap68, Arbi1+Trap98, Arbi2+Trap26, Arbi2+Trap49, Arbi2+Trap70, Arbi2+Trap71, Arbi2+Trap94, Arbi3+Trap75, Arbi3+Trap82 e Arbi4+Trap63). Estes resultados são superiores ao 13 a 16% de polimorfismo observado em trigo (Liu et al., 2005). Como foram utilizados apenas três genótipos para a otimização, vale ressaltar a possibilidade de ser encontrado um número maior de combinações polimórficas promissoras quando os iniciadores forem analisados em um grupo maior de acessos.

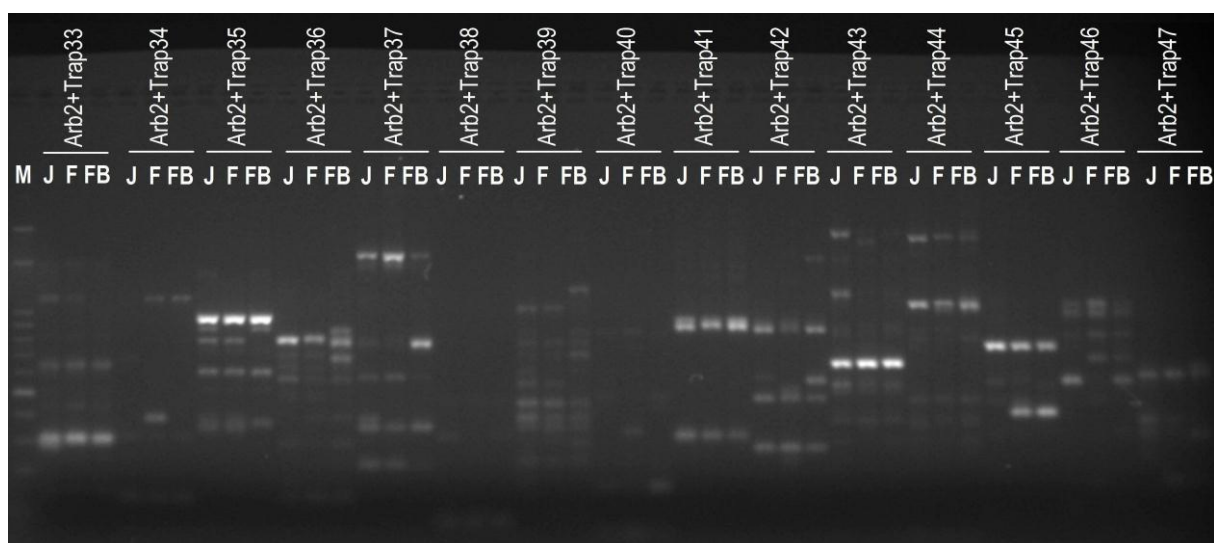


Figura 1. Gel de agarose 2% ilustrando o padrão de amplificação obtido para a combinação Arbi2 / Trap 33 ao 46; M: marcador de peso molécula Ladder 50 pb, J: BRS Jari, F: BRS Formosa e FB: Fécula branca.

Algumas combinações de iniciadores arbitrários permitiram a identificação de polimorfismo nos mesmos iniciadores fixos, a exemplo do Trap2, Trap22, Trap26, Trap39, Trap40, Trap43 e Trap63 (Tabela 2).

De modo geral observa-se para diferentes espécies de plantas que a técnica de TRAP revela múltiplos fragmentos com ótimo padrão de amplificação, para uso nas diversas atividades relacionadas à conservação, caracterização de germoplasma e nos programas de melhoramento. Como o polimorfismo está relacionado a um conjunto de genes candidatos, é possível implementar a caracterização para um conjunto de genes relacionados a diversas rotas metabólicas, muitas delas conhecidas.

Desde que marcadores TRAP foram desenvolvidos, suas aplicações foram direcionadas para acessar variabilidade genética em cana-de-açúcar (Alwala et al., 2006), em *fingerprint* em cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) (Hu et al., 2005), e em mapeamento de QTLs (Liu et al., 2005), e identificação dos principais genes de resistência que controlam ferrugem e antracnose em feijão (Miklas et al., 2006). Portanto, o potencial de uso desta técnica nas diversas etapas dos programas de melhoramento genético de mandioca é alto, pois além de todas as vantagens mencionadas anteriormente o TRAP permite a detecção de polimorfismo em regiões próximas a genes de interesse, o que o torna vantajoso em estudos para identificação de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) ou em estudos de mapeamento associativo, no sentido de acelerar o processo de seleção assistida por marcadores (SAM).

Tabela 1. Características dos 51 Iniciadores considerados promissores, em relação ao número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP) e percentagem de polimorfismo por marcador.

Combinações	NTB	NBP	% pol	Combinações	NTB	NBP	% pol
Arbi1+Trap2	9	9	100,00	Arbi2+Trap27	11	5	45,40
Arbi1+Trap8	7	7	100,00	Arbi2+Trap36	11	8	72,70
Arbi1+Trap11	8	5	62,50	Arbi2+Trap37	6	4	66,60
Arbi1+Trap13	6	6	100,00	Arbi2+Trap39	12	7	58,30
Arbi1+Trap14	7	7	100,00	Arbi2+Trap40	5	4	80,00
Arbi1+Trap16	4	4	100,00	Arbi2+Trap43	9	4	44,40
Arbi1+Trap18	7	7	100,00	Arbi2+Trap49	4	4	100,00
Arbi1+Trap20	6	5	83,30	Arbi2+Trap52	5	4	80,00
Arbi1+Trap22	5	5	100,00	Arbi2+Trap70	7	7	100,00
Arbi1+Trap32	5	4	80,00	Arbi2+Trap71	9	9	100,00
Arbi1+Trap34	6	6	100,00	Arbi2+Trap72	6	4	66,60
Arbi1+Trap39	5	4	80,00	Arbi2+Trap89	5	4	80,00
Arbi1+Trap40	7	6	85,70	Arbi2+Trap94	6	6	100,00
Arbi1+Trap43	7	6	85,70	Arbi3+Trap2	5	4	80,00
Arbi1+Trap45	5	4	80,00	Arbi3+Trap22	8	5	62,50
Arbi1+Trap46	6	5	83,30	Arbi3+Trap26	7	4	57,10
Arbi1+Trap47	4	4	100,00	Arbi3+Trap35	5	4	80,00
Arbi1+Trap68	5	5	100,00	Arbi3+Trap44	6	4	66,60
Arbi1+Trap70	5	4	80,00	Arbi3+Trap55	7	5	71,40
Arbi1+Trap73	7	6	85,70	Arbi3+Trap63	5	4	80,00
Arbi1+Trap98	5	5	100,00	Arbi3+Trap75	5	5	100,00
Arbi2+Trap1	6	4	66,60	Arbi3+Trap79	7	4	57,10
Arbi2+Trap5	7	5	71,40	Arbi3+Trap82	4	4	100,00
Arbi2+Trap7	9	4	44,40	Arbi4+Trap43	5	4	80,00
Arbi2+Trap9	6	4	66,60	Arbi4+Trap63	4	4	100,00
Arbi2+Trap26	5	5	100,00				

Tabela 2. Iniciadores promissores que apresentaram polimorfismo em diferentes combinações

Iniciador fixo	Arbi1 e 2	Arbi1 e 3	Arbi2 e 3	Arbi3 e 4	Arbi1, 2 e 4
Trap2		x			
Trap22		x			
Trap26			x		
Trap39	x				
Trap40	x				
Trap43					x
Trap63				x	

Conclusão

A técnica de TRAP permite a seleção de combinações de iniciadores fixos e arbitrários com alto nível de polimorfismo em genótipos de mandioca, que faz deste marcador uma opção promissora na genotipagem de germoplasma e na identificação de genes relacionados a características agronômicas desejáveis, de forma a otimizar os ganhos genéticos nos programas de melhoramento.

Agradecimentos

Ao BID, CNPq e Fapesb pelo apoio financeiro para desenvolvimento da pesquisa.

Referências

- ALWALA, S.; SUMAN, A.; ARRO, J.A.; VEREMIS, J.C.; KIMBENG, C.A. Target Region Amplification Polymorphism (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germplasm collections. **Crop Science**, v.46, p.448–455, 2006.
- CHEN, X.; XIA, Z.; FU, Y., LU, C.; WANG, W. Constructing a genetic linkage map using an F1 population of non-inbred parents in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Molecular Biology Reporter**, v.28, p.676–683, 2010.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1987.
- FREGENE, M.; ANGEL, F.; GÓMEZ, R.; RODRÍGUEZ, F.; ROCA, W.; TOHME, J.; ONIERBALE, M.A. A molecular genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.431–441, 1997.
- HU, J.; OCHOA, O.E.; TRUCO, M.J.; VICK, B.A. Application of the TRAP technique to lettuce (*Lactuca sativa* L.) genotyping. **Euphytica**, v.144, p.225–235, 2005.
- HU, J.; VICK, B.A. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.21, p.289-294, 2003.
- KUNKEAW, S.; TANGPHATSORNNUANG, S.; SMITH, D.R.; TRIWITAYAKORN, K. Genetic linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on AFLP and SSR markers. **Plant Breeding**, v.129, p.112–115, 2010.
- LIU, Z.H.; ANDERSON, J.A.; HU, J.; FRIESEN, T.L.; RASMUSSEN, J.B.; FARIS, J.D. A wheat intervarietal genetic linkage map based on microsatellite and target region amplified polymorphism markers and its utility for detecting quantitative trait loci. **Theoretical and Applied Genetics**, v.111, p.782-794, 2005.
- MIKLAS, P.N.; HU, J.; GRÜNWALD, N.J.; LARSEN, K.M. Potential application of TRAP (target region amplification polymorphism) markers for mapping and tagging disease resistance traits in common bean. **Crop Science**, v.46, p.910-916, 2006.