



AVANÇOS NA SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES PARA RESISTÊNCIA DE ALGODOEIRO À DOENÇAS E NEMATÓIDES.

Nelson Suassuna¹, Paulo Augusto Barroso¹, Lucia Hoffman², Fernanda Oliveira C. Magalhães², Camilo Morello¹

¹ Embrapa Algodão (nelson.suassuna@embrapa.br), ² Embrapa

O ecossistema cerrado, principal região produtora de algodão do país, tem entre suas principais demandas tecnológicas o desenvolvimento de cultivares com elevado potencial produtivo de pluma, resistência ou tolerância às principais doenças e alta qualidade tecnológica da fibra, bem como características conferidas por transgenes. Aliado a avaliações fenotípicas realizadas em condições de campo e casa-de-vegetação, o uso de marcadores moleculares associados à resistência a quatro doenças específicas, mancha angular, doença azul e aos nematóides das galhas e reniformes garante maior segurança às avaliações fenotípicas e permite a seleção de linhagens em condições de escape da doença, em maior escala ou em etapas preliminares do processo de melhoramento. Na safra 2011/2012 foram genotipadas 1463 plantas individuais e duas cultivares controle (Delta Opal e FM 966). A extração de DNA foi realizada a partir de uma semente, conforme o protocolo DART (2009). Quatro pares de primers de SSR marcados com fluorocromo (DC20027, CIR246, CIR 316, BNL 3279 e BNL 3661) foram usados na genotipagem. Estes primers foram selecionados por estarem fisicamente ligados a genes que confere resistência a bacteriose, a doença azul e aos nematóides das galhas e reniformes. As reações de PCR foram conduzidas em sistema multiplex usando o Kit PCR Multiplex (Qiagen) para volume final de 5µL, contendo 10 ng de DNA, 2,5µL de 2x Qiagen multiplex PCR Master mix (HotStarTaq DNA Polymerase, PCR amplification buffer, 3mM de MgCl₂), 0,5 de Q-solution, cada par de primer (forward e reverse) em concentrações otimizadas 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. Em seguida foi preparado um mix contendo 0,5µL 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 padrão de bandas para o marcador BNL 3279 foi 114/124 para 1460 plantas (99,8%) e apenas 3 plantas apresentaram o padrão de resistência 116/124, o que indica que apenas três plantas testadas possui o gene, oriundo do acesso LonRen, de resistência associado ao marcador. O marcador CIR 316 teve padrão de bandas 198/201 para 98,43% das plantas testadas, o que implica em apenas 1,57% das plantas com presença do marcador ligado ao gene de resistência. Para BNL 3661, a percentagem de plantas com o marcador foi de 5,47. Para esses dois marcadores foram usado como controle positivo a cultivar M315, resultando, nesse caso, no padrão de bandas 201/210, o que confirma a eficácia do marcador. Os marcadores CIR 246 e DC 20027 tiveram os maiores percentuais de plantas resistentes, com 52,28 e 52,7%, respectivamente, resultado da escolha de parentais resistentes para gerarem populações segregantes e da herança monogênica dominantes para essas doenças.