

ANÁLISE DE LIGAÇÃO ENTRE MARCADORES DO TIPO MICROSSATÉLITES EM UMA PROGENIE DE MAPEAMENTO DO PROGRAMA DE MELHORAMENTO CANA – IAC

**RAFAEL ROSSI VALENTIM¹; THAÍS MONTEIRO FÁVERO²; SILVANA CRESTE³;
VICENTE EUGÊNIO ROSA JÚNIOR⁴; MARCOS LANDELL⁵; ANETE PEREIRA DE SOUZA⁶,
LUCIANA ROSSINI PINTO⁷.**

Nº 0700024

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo identificar e mapear marcadores moleculares em dose única, provenientes de microssatélites genômicos (g-SSRs) em uma população segregante oriunda do cruzamento bi-parental, entre o clone IACSP95-3018 e a variedade IACSP93-3046, ambos do Programa de Melhoramento Cana IAC. Dos 50 locos gSSR iniciais, 37 geraram 171 marcas confiáveis para a análise. Destas, 118 (69%) estavam em dose única e foram utilizadas para a construção de um mapa prévio de ligação a LOD 3,0 e frequência de recombinação de 0,45. Dos 118 marcadores utilizados, 54 (46%) foram ligados originando 21 grupos de co-segregação perfazendo uma cobertura de 330 cM e densidade de uma marca a cada 16,5 cM. Das marcas ligadas, 9 (17%) são do tipo D1, 19 (35%) do tipo D2 e 26 (48%) do tipo C. Os 21 grupos de co-segregação foram agrupados em 5 grupos de homologia (GH). Embora o mapa obtido encontra-se condizente com o número de marcadores em dose única utilizados até o momento para a sua construção, fica evidente que para uma maior cobertura do genoma será necessário adicionar outros tipos de marcadores moleculares, tais como AFLP e marcadores funcionais.

Abstract

The aim of the present work was to identify and map single dose markers obtained from genomic microsatellites (gSSRs) in a progeny derived from the cross between the elite clone, IACSP95-3018 and the variety IACSP93-3046, both from the Sugarcane Breeding Program

-
1. Bolsista PIBIC; Graduação em Ciências Biológicas, USP, Ribeirão Preto- SP, axebio@yahoo.com.br
 2. Bolsista de Capacitação Técnica FAPESP, Centro de Cana – IAC, Ribeirão Preto -SP,
 3. PQ1, Centro de Cana – IAC, Ribeirão Preto –SP,
 4. PQ1, Recursos Genéticos Vegetais, IAC, Campinas-SP,
 5. PQ6, Diretor, Centro de Cana – IAC, Ribeirão Preto –SP,
 6. Colaborador: Depto de Genética e Evolução, CBMEG/UNICAMP, Campinas, SP,
 7. Orientador: PQ1, Centro de Cana – IAC, Ribeirão Preto –SP

Program of the Campinas Agronomic Institute. Of the 50 gSSR evaluated, 37 produced 171 reliable markers of which, 118 (69%) were at single dose. These makers were used for the linkage analysis at LOD score of 3 and recombination frequency of 0.45. Of the 118 single dose markers, 54 (46%) were linked in 21 co-segregation groups achieving a mapping coverage of 330 cM and a map density of one marker each 16,5 cM. Nine markers (17%) were of the D1 type, 19 (35%) of the D2 type and 26 (48%) of the C type. The 21 co-segregation groups were assembled into 5 homology groups (HGs). Although the size of the previous map agree well with the number of markers that was used for its construction, it is clear that a high number of single dose markers derived from AFLP and functional markers will be required to enhance the map coverage.

Introdução

A construção de mapas de ligação pode auxiliar na elaboração de estratégias a serem introduzidas no programa de melhoramento de forma a acelerar o desenvolvimento de novas variedades, visto que, uma das aplicações diretas da construção de mapas genéticos é a localização de genes de importância econômica ou locos de características quantitativas – QTLs (*Quantitative trait loci*). A identificação de marcadores fortemente ligados às características de interesse pode auxiliar o melhorista a selecionar, de forma mais eficiente, os clones com as características desejadas, ainda na fase juvenil (*seedlings*), e os parentais para a realização de cruzamentos. Em organismos poliplóides, como a cana-de-açúcar, a construção de mapas genéticos de ligação é conduzida pela análise da segregação de marcadores em dose única. A construção de mapas de ligação em cana-de-açúcar requer muito esforço, uma vez que, devido à magnitude de seu genoma, é necessário um grande número de marcadores moleculares, em dose única, para a saturação do mapa de ligação. Os primeiros mapas publicados para a cana-de-açúcar utilizaram progênies derivadas de cruzamentos interespecíficos (Da Silva et al. 1993, Al-Janabi et al. 1993, Guimarães, 1999). Entretanto, nos últimos anos, o mapeamento genético tem sido direcionado para progênies oriundas de cruzamentos biparentais entre clones elites (Garcia et al. 2006) ou variedades de cana-de-açúcar (Aitken et al. 2005, Raboin et al. 2006). Tais progênies, por derivarem de materiais elites, apresentam maior concentração de alelos favoráveis e permitem identificar marcadores moleculares úteis para seleção assistida.

O presente trabalho teve como objetivo identificar e mapear marcadores moleculares em dose única, provenientes de microssatélites genômicos (g-SSRs) em uma população segregante oriunda do cruzamento bi-parental, entre o clone IACSP95-3018 e a variedade IACSP93-3046, ambos do Programa de Melhoramento Cana IAC. Esta pesquisa é parte de um projeto cujo objetivo principal é iniciar um programa de mapeamento genético para o Programa Cana IAC utilizando marcadores moleculares do tipo AFLP (polimorfismos de comprimento do DNA amplificado), microssatélites genômicos (gSSRs) e microssatélites provenientes de seqüências expressas (EST-SSRs) para a detecção e mapeamento QTLs de interesse para os programas de melhoramento de cana-de-açúcar.

Materiais e Métodos

Embora a população de mapeamento seja constituída por 200 indivíduos, inicialmente, foram genotipados 89 indivíduos da progênie. O DNA genômico total foi extraído segundo o método CTAB (Hoisington et al. 1994). Foram utilizados cerca de 50 microssatélites genômicos. As reações de PCR foram efetuadas segundo Pinto et al. (2006). Os alelos foram revelados pela coloração com prata de acordo com o protocolo estabelecido por Creste et al. (2001). Para a análise da segregação dos marcadores em dose única, os indivíduos da progênie e os genitores foram genotipados com base na presença (1) e ausência (0) do marcador. A cada marca foi aplicado o teste estatístico qui-quadrado (χ^2) para avaliar a distorção de segregação em relação às proporções 1:1 (marcador em dose única em apenas um dos genitores) e 3:1 (marcador em dose única em ambos genitores) utilizando a correção de Bonferroni para múltiplos testes. Os marcadores foram classificados como: D1 para o marcador presente somente na IACSP95-3018, D2 para o marcador presente apenas na IACSP93-3046 e C, para o marcador presente em ambos genitores. A análise de ligação entre os marcadores em dose única foi feita pelo programa JoinMap, sendo as distâncias, em centiMorgans (cM) estimadas pela função de Kosambi. Os grupos de homologia foram identificados com base na presença, nos diferentes grupos de co-segregação, de alelos provenientes de um mesmo loco gSSR.

Resultados e Discussão

Dos 50 locos gSSR iniciais, 37 contribuíram para a obtenção de 171 marcas confiáveis na análise final. Destas, 118 (69%) estavam em dose única e foram utilizados para a construção do

mapa de ligação. Foram encontrados 45 (26%) marcadores do tipo D1, sendo que 29 apresentam segregação de 1:1, além de 48 marcas do tipo D2 (28%), destas, 35 em dose única. O número de marcas do tipo C conseguido foi de 79 (46%), de forma que 54 possuem segregação e de 3:1 (Tabela01).

Tabela 1. Relação de marcadores microsatélites em dose única com sua respectiva origem e número de marcadores que foram ligados.

Origem do Marcador	Nº de Alelos	Dose Única	Ligados
D1	45	29	9
D2	48	35	19
C	79	54	26
Total	171	118	54

D1: Marcador presente em IACSP95-3018; D2: Marcador presente em IACSP95-3018. C: marcador presente em ambos genitores.

Dos 118 marcadores utilizados na construção do mapa de ligação 54 (46%) foram mapeados dando origem a 21 grupos de ligação, sendo que o grupo de co-segregação 5 não foi desenhado pelo programa (Figura 01). Os marcadores que foram ligados apresentaram uma cobertura de 330 cM, o que resulta numa densidade de uma marca a cada 16,5 cM. Das marcas ligadas 9 (17%) são do tipo D1, 19 (35%) do tipo D2 e 26 (48%) do tipo C. Os 21 grupos de co-segregação foram agrupados em 5 grupos de homologia (GH), formados pelos seguintes grupos de ligação: GH I- 2, 3, 13,19 ; GH II- 1, 8 9 18 ; GH III- 16, 10, 7, 12 ; GH IV- 11, 14, 17 ; GH V- 4, 15, 21. Quando se atenta à proporção de marcadores em dose única e marcadores em diferentes doses encontrados, pode-se verificar que a proporção está de acordo com o relatado sobre outras populações segregantes, entre 79 e 65% de marcadores em dose única (Garcia et al., 2006; Rossi et al. 2003 ; Hoarau et al. 2001 ; Guimarães et al. 1999). Pode-se ainda, destacar a elevada proporção de marcadores tipo C em relação aos marcadores tipo D. Apesar de menos informativos, marcadores tipo C auxiliam na ligação entre marcadores D1 e D2 nos grupos de co-segregação (Wu et al. 2000). É notável que o número de grupos de co-segregação e grupos de homologia encontrados (21 e 5, respectivamente) é menor do que o esperado para cana-de-açúcar segundo trabalhos similares realizados anteriormente com clones-elite (Garcia et al., 2006) ou com variedades (Aitken et al. 2005, Raboin et al. 2006). Todavia espera-se que com a adição de novas marcas no decorrer do projeto, os marcadores não ligados possam formar outros grupos de ligação, aumentando assim a cobertura do genoma.

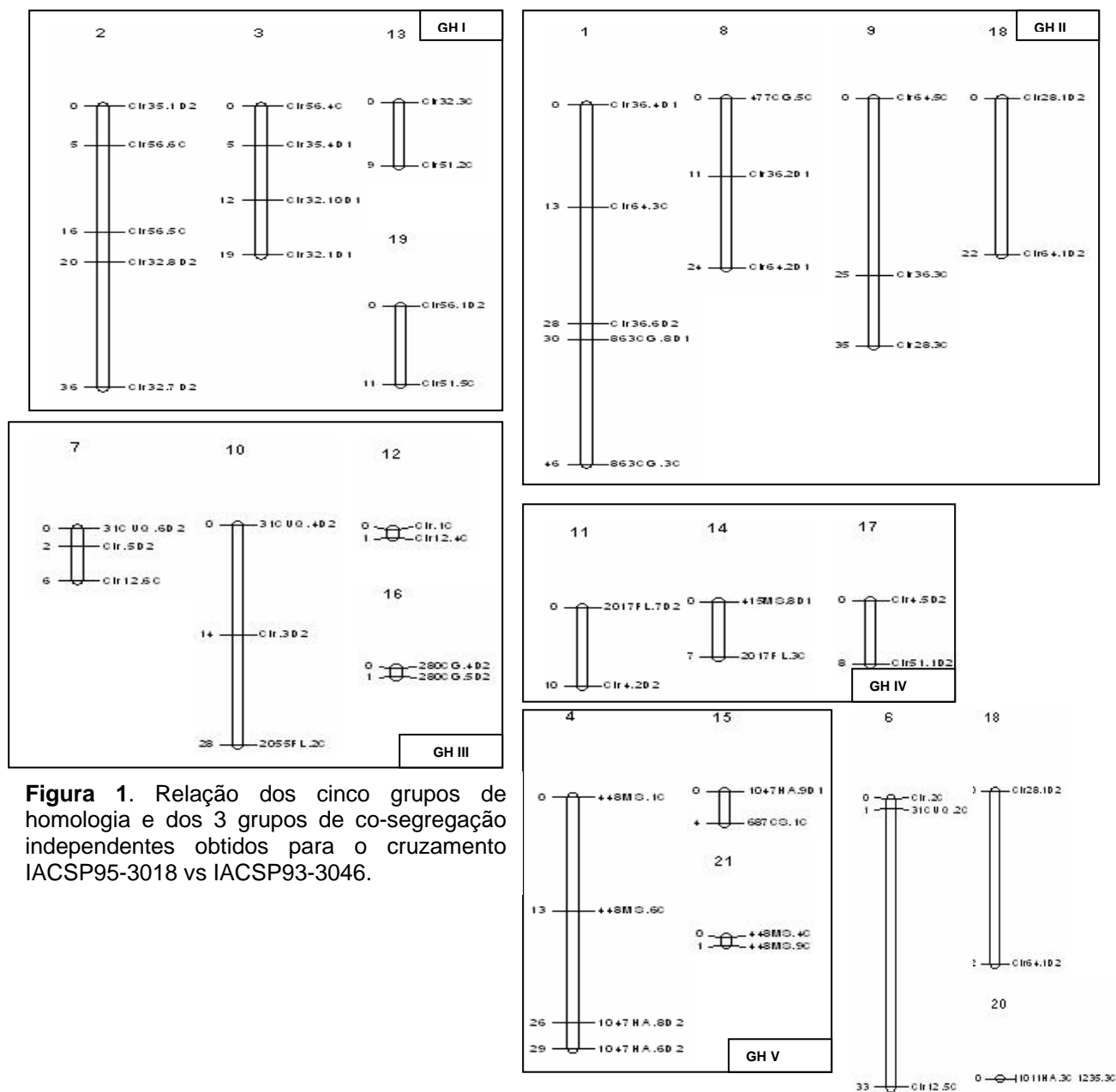


Figura 1. Relação dos cinco grupos de homologia e dos 3 grupos de co-segregação independentes obtidos para o cruzamento IACSP95-3018 vs IACSP93-3046.

Conclusão

Pelo exposto é possível concluir que a quantidade de marcadores em dose única obtidos, até o momento, para a construção do mapa de ligação é satisfatório, tendo em vista o número de locos utilizados. Dessa forma, o mapa prévio obtido, encontra-se condizente com o número de marcadores em dose única utilizado para a sua construção. Todavia para uma maior cobertura do extenso genoma da cana é imprescindível que seja adicionado a este mapa vários tipos de marcadores moleculares, tais como marcadores do tipo AFLP e marcadores funcionais.

Referências

- AITKEN, K.S., JACKSON, P.A., MCINTYRE, C.L. A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homo(eo)logous linkage groups in a sugarcane cultivar. *Theoretical and Applied Genetics*, v.110, 789-801, 2005.
- AL-JANABI S.M., HONEYCUTT, R.J., MCCLELLAND, M., SOBRAL, B.W. S. A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L, 'SES 208'. *Genetics*, v.134, p.1249-1260, 1993.
- CRESTE, S., TULMANN NETO, A., FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gel by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.19, p. 299-306, 2001.
- DA SILVA, J. A. G., SORRELLS, M. E., BURNQUIST, W. L., TANKSLEY, S. D. RFLP linkage map and genome analysis of *Saccharum spontaneum*. *Genome*, v.36, p.782-791, 1993.
- GARCIA, A.A.F., KIDO, E.A., MEZA, A.N., SOUZA, H.M.B., PINTO, L.R., PASTINA, M.M., LEITE, C.S., DA SILVA, J.A.G., ULIAN, E.C., FIGUEIRA, A.V.O., SOUZA, A.P. Development of an integrated genetic map of a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross based on a maximum-likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 112 p. 298-314, 2006.
- GUIMARÃES, C. T., HONEYCUTT, R. J., SILLS, G. R., SOBRAL, B.W.S. Genetic maps of *Saccharum officinarum* L. and *Saccharum robustum* Brandes & Jew. Ex. Grassl. *Genetics and Molecular Biology*, v.22: 125-132, 1999.
- HOARAU, J. Y., GRIVET, L., OFFMANN, B., D'HONT, A., RISTERUCCI, A. M., ROQUES, D., GLASZMANN, J. C., GRIVET, L. Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.) I. Genome mapping with AFLP markers. *Theor Appl Genet*, v.103, p. 84-97, 2001.
- HOISINGTON, D., KHAIRALLAH, M., GONZÁLEZ-DE-LEÓN, D. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. CIMMYT, Mexico, DF, 1994. 51p.
- RABOIN, L.M., OLIVEIRA, K.M., LECUNFF, E.L., TELISMART, H., ROQUES, E.D., BUTTERFIELD, E.M., HOARAU, J.Y., D'HONT E.A. Genetic mapping in sugarcane, a high polyploid, using bi-parental progeny: identification of a gene controlling stalk colour and a new rust resistance gene. *Theor Appl Genet*, v. 112, p. 1382-1391, 2006.
- WU, R., MA, C., X., PAINTER, I., ZENG, Z. B. Simultaneous maximum likelihood estimation of linkage and linkage phases in outcrossing species. *Theoretical population Biology*, v. 61, p.349-363, 2002.