

AVALIAÇÃO DE TRANSFERIBILIDADE DE MICROSSATÉLITES FUNCIONAIS DE SORGO (EST-SSR) VISANDO A CONSTRUÇÃO DE MAPAS DE LIGAÇÃO EM CANA

FLÁVIA K. **GONÇALVES**^{1,2} e LUCIANA R. **Pinto**²

Nº 11140

RESUMO

Os Projetos de Seqüenciamento de ESTs (Etiquetas de Seqüências Expressas) de culturas de importância econômica como a cana-de-açúcar e o sorgo têm permitido o desenvolvimento de microssatélites derivados de ESTs (EST-SSRs). Por apresentarem uma alta transferibilidade entre espécies correlacionadas, os EST-SSRs têm sido utilizados como marcadores âncoras em estudos de mapeamento comparativo. Este trabalho teve como objetivo identificar EST-SSRs de sorgo adequados para gerar marcadores em dose única em uma população de mapeamento genético de cana-de-açúcar do Programa Cana IAC. Os 9 EST-SSRs de sorgo que foram amplificados na população de mapeamento produziram 54 marcas, das quais 18 (33,33%) encontraram-se em dose única. Destas, 12 foram adicionadas ao mapa de ligação previamente existente. O mapa obtido apresentou 306 marcas (10.81 cM/marcador) distribuídas em 89 grupos de ligação e com uma cobertura de 3308 cM. O presente resultado é animador, visto que, um grupo pequeno de marcadores oriundos de EST-SSRs pode ser incorporado no mapa de ligação, permitindo no futuro o mapeamento comparativo com o sorgo.

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto-SP, flakato@hotmail.com.

² Orientadora: Pesquisadora, Instituto Agrônomo de Campinas - IAC, Centro de Cana, Ribeirão Preto/SP.

ABSTRACT

The ESTs Projects (Expressed Sequence Tags) of economically important crops such as sugarcane and sorghum have allowed the development of EST derived microsatellite (EST-SSRs). Due to their high transferability between correlated species, EST-SSR markers have been used as anchors markers in comparative mapping studies. The present study aimed to identify sorghum EST-SSRs suitable to generate single dose markers in a sugarcane mapping population from IAC Breeding Program. Nine sorghum EST-SSRs amplified in the mapping population and produced 54 markers, of which 18 (33,33%) were in a single dose. Twelve sorghum EST-SSRs derived markers were added to the previous genetic linkage map giving rise to 89 linkage groups, with a total of 306 markers (10.81 cM / marker) and a coverage of 3308 cM. The present result shows the potential of the sorghum EST-SSRs as anchor markers for sugarcane, as a small number of sorghum derived markers were added to the sugarcane linkage map, allowing to a future comparative map with sorghum.

INTRODUÇÃO

Dentre os diferentes tipos de marcadores moleculares disponíveis para plantas, marcadores do tipo microssatélites tem-se mostrado úteis em diversas aplicações, principalmente devido a sua reprodutibilidade, natureza multialélica, herança co-dominante, abundância e boa cobertura no genoma. Estes marcadores representam seqüências repetitivas compostas por motivos (1 a 6 pares de bases) repetidos lado a lado, e cujas seqüências que o flanqueiam apresentam-se conservadas a ponto de permitir o desenho de um par de iniciadores de síntese específica (*primers*) para a sua amplificação via reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction*).

Os Projetos de Sequenciamento das Etiquetas de Seqüências Expressas (ESTs) de culturas de importância, tais como a cana-de-açúcar (<http://sucest.lad.dcc.unicamp.br/en/>), arroz (<http://redb.ncpgr.cn/>) e sorgo (<http://csgr.agtec.uga.edu/>) têm permitido o desenvolvimento de microssatélites de forma rápida e econômica pela simples mineração de seqüências repetitivas nos bancos de dados. Tais microssatélites por derivarem de ESTs são chamados de microssatélites funcionais (EST-SSRs) e são considerados de grande utilidade para acessar a diversidade ao nível de genes expressos em coleções de germoplasma e

também no mapeamento genético, visto que o polimorfismo gerado permite o mapeamento direto de genes expressos, os quais podem proporcionar a identificação de marcadores funcionais associados a características de interesse. Os EST-SSR por representarem parte de um gene transcrito, amplificam regiões conservadas do genoma e, portanto, apresentam uma maior transferibilidade entre espécies correlacionadas sendo utilizados como marcadores âncoras no mapeamento comparativo.

A cana-de-açúcar pertence à tribo *Andropogoneae*, família das gramíneas, cuja respectiva tribo, inclui também as gramíneas tropicais e subtropicais, tais como os cereais do gênero *Sorghum* e *Zea*. As cultivares atuais são híbridos interespecíficos complexos de elevado nível de ploidia ($2n = 100$ a 120 cromossomos) apresentando, em alguns casos, aneuploidia. Tais características contribuem para dificultar os trabalhos de mapeamento genético e a detecção de características de interesse agrônomo aos programas de melhoramento, especialmente, quando os mapas desenvolvidos se utilizam de variedades comerciais como genitores. Por outro lado, o sorgo, apresenta um genoma pequeno ($2n=20$) e uma vasta adaptação a ambientes severos e tolerância as condições de estresse bióticos e abióticos, o que contribui para que seja apontado como uma importante cultura modelo (ZHI-BEN et al., 2006). A utilização do genoma pequeno do sorgo, como referência, em estudos de mapeamento comparativo, tem contribuído para acelerar a análise do genoma da cana-de-açúcar, principalmente, em relação à detecção de QTLs (locos de características quantitativas) relacionados à resistência a doenças (MCINTYRE et al., 2005) e parâmetros agroindustriais (JORDAN et al., 2004) obtidos através de marcadores provenientes de sondas heterólogas em ensaios de RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*).

Neste contexto, a presente pesquisa tem como proposta identificar EST-SSRs de sorgo adequados para gerar marcadores em dose única em cana-de-açúcar para a sua incorporação em um mapa de ligação derivado do cruzamento entre a variedade IACSP953018 e IACSP93-3046 do Programa Cana IAC.

MATERIAL E MÉTODOS

O DNA genômico foi extraído conforme metodologia descrita por (HOISINGTON et al., 1994) com algumas modificações para cana-de-açúcar e posteriormente quantificado na presença de um padrão de DNA do fago lambda de

quantidades conhecidas em gel de agarose 0.8% (p/v) corado com brometo de etídio. Foram analisados 26 EST-SSRs de sorgo e as reações de PCR foram efetuadas conforme descrito (WANG et al., 2005). As amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante a 5% utilizando ladder de 10 bp como marcador de peso molecular. As bandas foram reveladas pela coloração com prata de acordo com o protocolo estabelecido por CRESTE et al. (2001) e genotipadas de acordo com sua presença (1) ou sua ausência (0). Os marcadores em dose única foram utilizados para a construção do mapa de ligação pelo programa JoinMap.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 26 EST-SSRs de sorgo analisados, apenas 9 foram selecionados para serem genotipados na população de mapeamento. Estes 9 EST-SSRs geraram 54 marcadores, dos quais 18 (33,33%) encontraram-se em dose única. Estes 18 marcadores em dose única foram adicionados aos demais marcadores já existentes, totalizando 1011 marcas utilizadas para a construção do mapa de ligação. Das 1011 marcas que entraram na análise, 306 (30,27%) foram mapeadas com uma densidade de marcas de 10.81 cM e uma cobertura de 3.308 cM (Tabela 01). Dos 18 marcadores em dose única derivados de EST-SSRs de sorgo, 12 foram mapeados. Os marcadores derivados de sorgo puderam ser incorporados em 9 dos 89 grupos de ligação do mapa prévio da cana-de-açúcar (Figura 01), sendo que um grupo de ligação formado unicamente por marcadores derivados de sorgo. Estes marcadores servirão como marcadores ancoras em estudos futuros de mapeamento comparativo entre cana-de-açúcar e sorgo.

Tabela 01. Relação de marcadores em dose única, cobertura do mapa e densidade.

	Marcadores em dose única		Total
	Cana	Sorgo	
Marcadores em dose única	993	18	1011
Mapeados	294	12	306
Cobertura mapa (cM)			3.308
Densidade			10.81

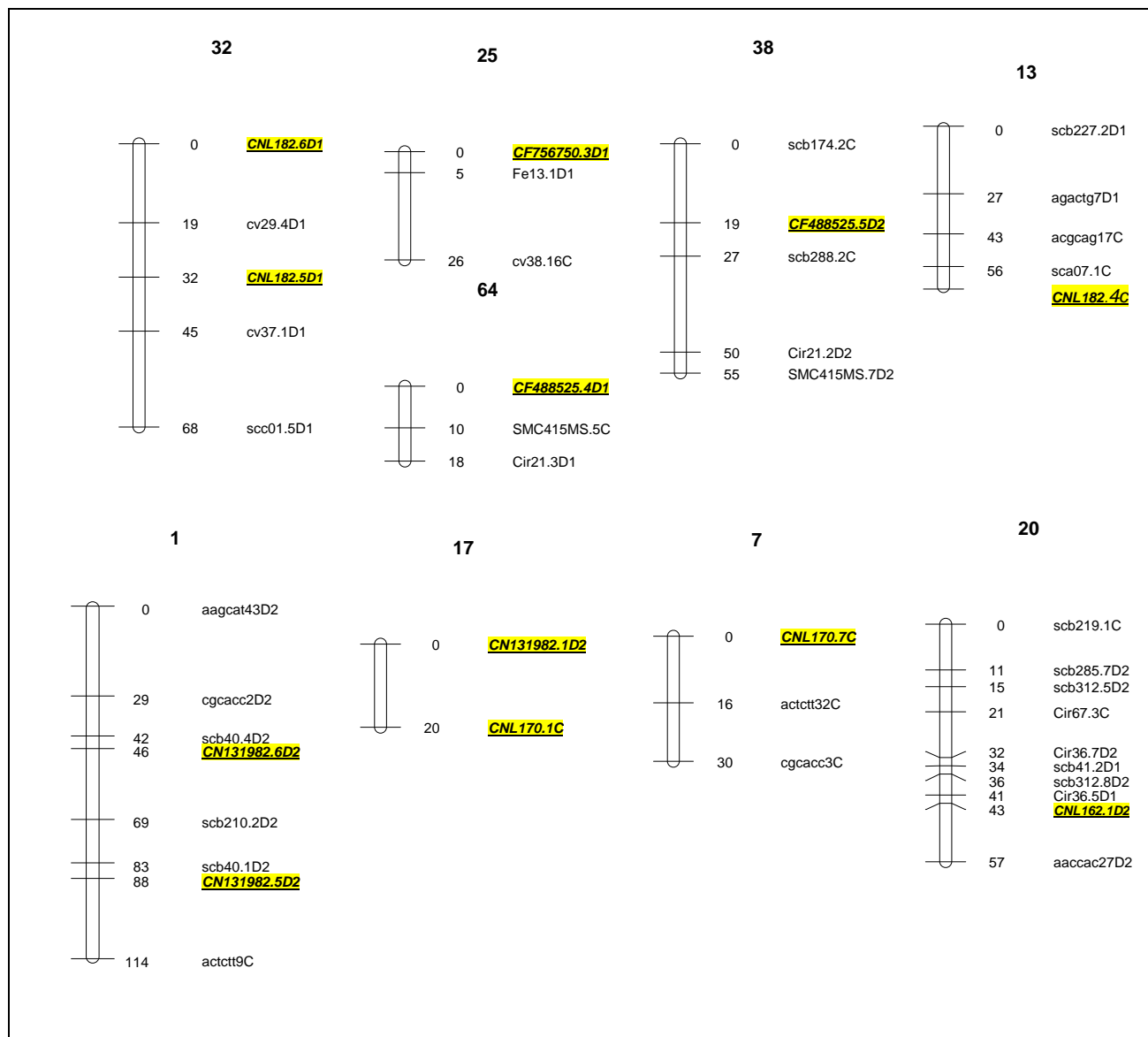


Figura 01. Incorporação de marcadores derivados de EST-SSRs de sorgo nos grupos de ligação pertencentes ao mapa derivado do cruzamento IACSP953018 x IACSP93-3046. Marcadores derivados de EST-SSRs de sorgo encontram-se sublinhados em negrito.

CONCLUSÃO

A estratégia de utilização de marcadores derivados de EST-SSRs de sorgo para o mapeamento de cana-de-açúcar é promissora e permite a incorporação destes marcadores como âncoras para mapeamento comparativo entre Cana e Sorgo.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao Centro de Cana – IAC, pela oportunidade de estágio.

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, p. 299-306, 2001.

Hoisington, D., Khairallah, M., González-De-León, D. *Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*. Mexico: DF, 1994. 51p.

Jordan, D.R., Casu, R.E., Besse, P., Carroll, B.C., Berding, N., McIntyre, C.L. Markers associated with stalk number and suckering in sugarcane colocate with tillering and rhizomatousness QTLs in sorghum. *Genome*, v.47, p.988–993, 2004.

McIntyre CL, Casu RE, Drenth J, Knight D, Whan VA, Croft B, Manners JM. Resistance Gene Analogues in Sugarcane and Sorghum and their Association with QTLs for Rust Resistance. *Genome*, v 48,p.391-400,2005.

Wang, M. L., Barkley, N. A., Yu, J.-K., Dean, R. E., Newman, M. L., Sorrells, M. E., Pederson, G. A. Transfer of simple sequence repeat (SSR) markers from major cereal crops to minor grass species for germplasm characterization and evaluation. *Plant Genetic Resources*, v.3, p.45–57, 2005.



Zhi-Ben,Y., Sun, Y., Xiao-Hong, L., Wei-Jun,Z., Min, Y., Li-Xia, C. Advances in genetic mapping of the sorghum genome. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology, v.3, p.155–161, 2006.