

VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES LIGADOS A GENES DE RESISTÊNCIA DA FERRUGEM MARROM PARA A FERRUGEM LARANJA DA CANA-DE-AÇÚCAR

DÉBORAH M. SIQUEIRA¹, HAIKO E. SAWAZAKI², CASSIARA R. N. C. B. GONÇALVES³, LUIZ A. N. de SÁ⁴, VERA L. P. POLEZ⁵, RENATO F. A. VEIGA⁶

Nº 11109

RESUMO

Atualmente, a ferrugem alaranjada é a mais nova doença na cultura de cana-de-açúcar, causada pelo basidiomiceto *Puccinia kuehnii*. Nas regiões onde ocorre esse tipo de ferrugem, o controle é feito basicamente com o plantio de cultivares resistentes, porque o uso de fungicidas não é considerado prático e nem econômico. Além da ferrugem alaranjada, a ferrugem marrom causada pela *Puccinia melanocephala* é também encontrada no Brasil. A literatura já relatou vários marcadores relacionado ao gene principal de resistência a ferrugem marrom denominado Bru1 e o relato da ação de resistência deste gene a diversos isolados de fungo. Tendo-se em vista que a etiologia e sintomas da ferrugem marrom e ferrugem alaranjada são semelhantes, o objetivo deste trabalho foi validar alguns marcadores ligados ao gene de resistência a ferrugem marrom Bru1, para resistência a ferrugem alaranjada, através de triagem de variedades resistentes e susceptíveis por análises de PCR. Os resultados de análises de PCR, em 30 variedades de cana-de-açúcar, com dezoito pares de iniciadores relacionados ao gene de resistência à ferrugem marrom e 70 interações entre iniciadores localizados quase no mesmo sítio genômico, mostraram que apesar de algumas variações observadas entre variedades susceptíveis e resistentes, em algumas interações, o resultado não foi consistente para todas as variedades consideradas resistentes ou suscetíveis.

1

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Farmácia Bioquímica, UNISAL, Campinas, SP

² Orientadora: Pesquisadora, CRGV/IAC, Campinas-SP.

³ Colaborador: Pesquisador, CTC, Piracicaba-SP

⁴ Colaborador: Pesquisador, EMBRAPA, Jaguariúna-SP

ABSTRACT

Currently, the orange rust is the newest disease in the crop of cane sugar, caused by the basidiomycete *Puccinia kuehnii*. In regions where this type of rust occurs, control is basically made by the planting of resistant cultivars, since the use of fungicides is not considered practical or economical. In addition to orange rust, the brown rust caused by *Puccinia melanocephala* is also found in Brazil. The literature has reported several markers related to the major gene for resistance to brown rust called Bru1 and reported the action of this gene for resistance to different rust isolates. Keeping in mind that the etiology and symptoms of orange rust and brown rust are similar, the objective of this work was to validate some markers linked to resistance to brown rust Bru1 for resistance to orange rust through screening of resistant and susceptible varieties by PCR analysis. The results of PCR analysis in thirty varieties of sugarcane, with eighteen pairs of primers linked to the gene of resistance to brown rust and seventy interactions between primers located almost in the same genomic site, showed that despite some variations observed between susceptible and resistant varieties in some interactions, the result was not consistent for all varieties considered susceptible or resistant.

INTRODUÇÃO

A doença mais recente na cultura de cana-de-açúcar é a ferrugem laranja causada pelo basidiomiceto *Puccinia kuehnii* (Krug.)Butl. Nos lugares onde esse tipo de ferrugem ocorre o controle é feito basicamente com o plantio de cultivares resistentes, porque o uso de fungicidas não é considerado prático e nem econômico (RYAN & EGAN, 1989).

Ambas ferrugens, conhecidas como marrom (*Puccinia melanocephala* Syd. & P. Syd.) e alaranjada, têm etiologia e sintomas semelhantes, e já são conhecidos diversos marcadores de resistência para ferrugem marrom ligados ao gene maior Bru, oriundos de trabalhos com RFLP (Asnaghi et al. 2000), RGAs e AFLP (Asnaghi et al, 2004). Em um trabalho mais recente, Lê Cunff et al.(2008) mapeou 13 marcadores cosegregando com este gene principal de resistência Bru1. Estes marcadores foram

⁵ Colaborador: Pesquisador, EMBRAPA, Brasília-DF

⁶ Colaborador: Pesquisador, CRVG/IAC, Campinas-SP

relacionados com o gene de efeito simples ou principal relatado na cultivar R570, denominado Bru1, para resistência a ferrugem marrom (Daugrois et al. 1996). Devido ao relato da resistência deste gene a diversos isolados de fungo (Asnaghi et al. 2001), testes preliminares de PCR com os iniciadores relacionados a estes marcadores, foram realizados com o objetivo de validar marcadores de resistência a ferrugem marrom para resistência a ferrugem alaranjada, em variedades relatadas como resistentes e suscetíveis.

MATERIAL E MÉTODOS

O DNA foliar de vinte variedades de cana-de-açúcar (Tabela 1) foi extraído pela metodologia modificada de Doyle & Doyle (Focus, 12:13-15, 1990). O PCR foi feito para reações de 15 µl utilizando-se 1µM dos primers desenvolvidos pelo laboratório; 1,1X tampão 10X; 2,5mM dNTP; 3,3mM MgSO₄, 20 a 40ng DNA e 0,75 unidades de Taq Platinum (Invitrogen), nas condições de 95°C/5 min, mais 2 a 3 ciclos de 94°C/1min, temperatura anelamento mais alta/2min, 72°C/2 min, 2 a 3 mesmos ciclos com temperatura anelamento intermediária e mais baixa e 30 ciclos de 94°C/50s, temperatura anelamento mais baixa/1min, 72°C/1 min e 5 min a 72°C.

Foram desenvolvidos dezoito pares de iniciadores (Tabela2) a partir dos marcadores conhecidos pela literatura para resistência a ferrugem marrom. Foram desenhados a partir de nove regiões de genomas de plantas de cana-de-açúcar conhecidos como Sonda CDSR029 (Acesso GenBank: BQ478976.1); Sonda pPAP05H10 (Acesso GenBank: BM084336); Sonda PSB0927 (Acesso GenBank: BH245571); Probe pPAP08G01 (Acesso GenBank: BM084566); Sonda pSB0084 (Acesso GenBank: BH246325); Sonda pSB1565 (Acesso GenBank: BH245983); Sonda PSB1723 (Acesso GenBank: BH246106); Sonda pSB1445 (Acesso GenBank: BH245871); Sonda C673 (Acesso de RFLP de arroz: C673RFLP). Após localização dos sítios genômicos das sondas dos iniciadores, foram realizadas as análises de PCR das interações entre os iniciadores cujas sondas (C673 x pSB1565 x CDSR029), (pPAP05H10 x PSB0927), (pPAP09G01 x pSB0084) estão praticamente quase no mesmo sítio genômico da cana-de-acúcar (Tabela 3).

TABELA 1: Variedades de cana-de-açúcar amostradas

Amostra	Variedade	Grau de resistência
1	SP79-1011	Intermediária
2	SP89-1115	Suscetível
3	SP80-1842	Resistente
4	SP80-3280	Resistente a marrom

5	SP91-1049	Resistente
6	SP83-2847	Resistente
7	SP81-3250	Resistente
8	RB72-454	Suscetível
9	RB86-7115	Intermediária
10	RB85-5453	Resistente
11	SP84-2025	Suscetível
12	CTC1	Resistente
13	CTC2	Resistente
14	CTC3	Susceptível
15	CTC4	Resistente
16	CTC5	Resistente
17	CTC6	Resistente
18	CTC7	Resistente
19	CTC8	Resistente
20	CTC9	Susceptível
21	CTC11	Resistente
22	CTC12	Resistente
23	CTC13	Resistente
24	CTC14	Resistente
25	CTC15	Intermediária
26	CTC16	Resistente
27	CTC17	Resistente
28	CTC18	Resistente
29	CTC19	Susceptível
30	CTC20	Resistente

Tabela 2. Iniciadores desenvolvidos para testes de resistência a ferrugem alaranjada

Iniciador	Seqüência 5'-3'	Comprim	Tm	Pb fragm	Temp anel°C
293BH245571F	TGT MRA CGA AGA KGC GGA YG	20	71	490	50
782BH245571R	TTT URA YRY ATG MAT GRA GC	20	63	490	50
191BH245871F	GCAAGCTTCTCGTCCGCCAT	20	78	215	57
405BH245871R	TAG CAT TTC CTC CGC GGG TA	20	76	215	57
10BH245983F	TCA CCA ACA GCA TCC CTC CA	20	75	365	53
374BH245983R	TCAGCCTGCGCATGTGTTCT	20	75	365	53
163BH246106F	ATG CAT CCA CCA CG CTT CAA	21	75	288	51
450BH246106R	GCA TTA TCT CCC TCC TAG TT	21	63	288	51
4BH246325F	CAG CTG CTT CAT CAT CAT CGC	21	74	319	56
322BH246325R	GAC GCC GTA ACC CGT TCC	18	72	319	56
100BM084336F	CCG CTT ACC TSC ACR TCS TC	20	69	510	56
608BM084336R	ACA GCC ACG AAG TCG GTG AA	20	74	510	56
237BM084566F	CCA SAT CRT CTR GCG TCT AC	20	62	421	50
765BM084566R	GAG TCA TYM ACA AGT KGT GC	20	63	421	50
134C673F	TGC KWG GGA CAW KAR AKTTT	20	71	360	53
493C673R	CCR CCW YAK CAA GCT CYR GS	20	70	360	53
117BQ478976F	TGT GAG TGA TGG CGA ATT GG	20	73	451	54
489BQ478976	ATTTGCTTGCTTGCTTGCATTG	20	74	451	52
1H571F	CTGCAGAGAGAGGGAACAGG	21	72	915	53
915H571R	GCTGCGTGGACATGACTACA	20	70	915	53
4H871F	CAGACACCGCCAAGAAACCA	20	74	401	57
405H871R	TAGCATTCTCTCCGCGGGTA	20	76	401	57
14H983F	CAACAGCATCCCTCCAGCCA	20	77	428	55
441H983R	GCGAAGCAGGACGAGAAGGT	20	75	428	55
1H106F	CTGCAGAAAGTACAATGGCT	20	66	450	51
450H106R	GCATTATCTCCCTCCTAGTT	20	63	450	51
9FH325F	GCTTCATCATCATCGCCGAC	20	72	301	56
309H325R	TTCCCTCACCTCCCTGCTTA	20	74	301	56
33M336F	CGTCCAGACCCACCTCAAGCT	21	76	924	56
956M336R	CGTCCAGACCCACCTCAAGCT	20	77	924	56
24C673F	CGTCCAGACCCACCTCAAGCT	16	57	426	48
449C673R	AGC ATT CCA AGG GAT	15	56	426	48
35Q976F	TCCATCTGGATCGACCTC	18	65	451	52

485q976R	CGCTTGGCTTGCATT G	15	67	451	52
37M566R	TTTAGGGCCTCACAGTTTCA	20	69	837	52
873M566R	ATATGCAAAGGTGCCAATCC	20	70	837	52

Tabela 3. Interação de iniciadores localizados em sítio genômico muito próximo.

Int	Iniciador	Seqüência 5'-3'	Comprim	Tm	Pb fragm	Temp anel°C
A	293BH245571F	TGT MRA CGA AGA KGC GGA YG	20	71	623	52
	915H571R	GCTGCGTGGACATGACTACA	20	70	623	52
B	1H571F	CTGCAGAGAGAGGGAAACAGG	21	72	782	51
	782BH245571R	TTT URA YRY ATG MAT GRA GC	20	63	782	51
C	191BH245871F	GCAAGCTTCTCGTCCGCCAT	20	78	215	57
	405H871R	TAGCATTTCTCCGCGGGTA	20	76	215	57
D	10BH245983F:	TCA CCA ACA GCA TCC CTC CA'	20	75	431	53
	441H983	GCGAAGCAGGACGAGAAGGT	20	75	431	53
E	14H983	CAACAGCATCCCTCCAGCCA	20	77	374	53
	374BH245983R:	TCAGCCTGCGCATGTGTTCT	20	75	374	53
F	163BH246106F	ATG CAT CCA CCA CGC TTC AA	21	75	288	51
	450H106	GCATTATCTCCCTCCTAGTT	20	63	288	51
G	4BH246325F:	CAG CTG CTT CAT CAT CAT CGC	21	74	306	56
	309H325	TTCCCTCACCTCCCTGCTTA	20	72	306	56
H	9FH325	GCTTCATCATCATCGCCGAC	20	74	314	56
	322BH246325R:	GAC GCC GTA ACC CGT TCC	18	76	314	56
I	33M336	CGTCCAGACCCACCTCAAGCT	21	76	576	56
	608BM084336R	ACA GCC ACG AAG TCG GTG AA	20	74	576	56
J	98BM084336F	GCG CTT ACC TSC ACR TCS TC	20	74	859	56
	956M336	AGGCAGGCAGGATTCCGAGT	20	76	859	56
K	134C673F	TGCKW GGG ACA WKA RAK TTT	20	71	316	48
	449C673	AGC ATT CCA AGG GAT	15	56	316	48
L	24C673	TTG CTA TGC ATG TGC T	16	57	470	48
	493C676R	CCR CCW YAK CAA GCT CYR GS	20	70	470	48
M	35Q976	TCCATCTGGATCGACCTC	18	65	455	52
	489BQ478976	ATTTGCTTGGCTTGCATTG	20	74	455	52
N	873M566	ATATGCAAAGGTGCCAATCC	20	70	637	50
	765BM084566R	GAG TCA TYM ACA AGT KGT GC	20	63	728	50
O	37M566	TTTAGGGCCTCACAGTTTCA	20	69	448	52
	485q976	CGCTTGGCTTGCATT G	15	67	448	52
P	237BM084566F	CCA SAT CRT CTR GCG TCT AC	20	62	636	50
	873M566	ATATGCAAAGGTGCCAATCC	20	70	636	50
Interação C673xBH871x BQ976						
A1	134C673F	TGC KWG GGA CAW KAR AKTTT	20	71	360	53
	405BH245871R	TAG CAT TTC CTC CGC GGG TA	20	76	215	57
B1	134C673F	TGC KWG GGA CAW KAR AKTTT	20	71	360	53
	489BQ478976R	ATTTGCTTGGCTTGCATTG	20	74	451	52
C1	134C673F	TGC KWG GGA CAW KAR AKTTT	20	71	360	53
	485q976R	CGCTTGGCTTGCATT G	15	67	451	52
D1	24C673F	TTG CTA TGC ATG TGC T	16	57	426	48
	405BH245871R	TAG CAT TTC CTC CGC GGG TA	20	76	215	57
E1	24C673F	TTG CTA TGC ATG TGC T	16	57	426	48
	489BQ478976R	ATTTGCTTGGCTTGCATTG	20	74	451	52
F1	24C673F	TTG CTA TGC ATG TGC T	16	57	426	48
	485q976R	CGCTTGGCTTGCATT G	15	67	451	52
G1	191BH245871F	GCAAGCTTCTCGTCCGCCAT	20	78	215	57
	493C673R	CCR CCW YAK CAA GCT CYR GS	20	70	360	53
H1	191BH245871F	GCAAGCTTCTCGTCCGCCAT	20	78	215	57
	449C673R	AGC ATT CCA AGG GAT	15	56	426	48
I1	191BH245871F	GCAAGCTTCTCGTCCGCCAT	20	78	215	57
	489BQ478976R	ATTTGCTTGGCTTGCATTG	20	74	451	52
J1	191BH245871F	GCAAGCTTCTCGTCCGCCAT	20	78	215	57
	485q976R	CGCTTGGCTTGCATT G	15	67	451	52
K1	4H871F	CAGACACCGCCAAGAAACCA	20	74	401	57
	449C673R	AGC ATT CCA AGG GAT	15	56	426	48

L1	4H871F	CAGACACCGCCAAGAAACCA	20	74	401	57
	489BQ478976R	ATTTTCGCTTGGCTTGCATTG	20	74	451	52
M1	4H871F	CAGACACCGCCAAGAAACCA	20	74	401	57
	485q976R	CGCTTGGCTTGCATT G	15	67	451	52
N1	4H871F	CAGACACCGCCAAGAAACCA	20	74	401	57
	493C673R	CCR CCW YAK CAA GCT CYR GS	20	70	360	53
O1	35Q976	TCCATCTGGATCGACCTC	18	65	455	52
	449C673R	AGC ATT CCA AGG GAT	15	56	426	48
P1	35Q976	TCCATCTGGATCGACCTC	18	65	455	52
	493C673R	CCR CCW YAK CAA GCT CYR GS	20	70	360	53
Q1	35Q976	TCCATCTGGATCGACCTC	18	65	455	52
	405BH245871R	TAG CAT TTC CTC CGC GGG TA	20	76	215	57
R1	35Q976	TCCATCTGGATCGACCTC	18	65	455	52
	485q976R	CGCTTGGCTTGCATT G	15	67	451	52
Interação BM566 x BH325						
A2	237BM084566F	CCA SAT CRT CTR GCG TCT AC	20	62	421	50
	322BH246325R:	GAC GCC GTA ACC CGT TCC	18	72	319	56
B2	237BM084566F	CCA SAT CRT CTR GCG TCT AC	20	62	421	50
	309H325R	TTCCCTCACCTCCCTGCTTA	20	74	301	56
C2	37M566R	TTTAGGGCCTCACAGTTTCA	20	69	837	52
	322BH246325R:	GAC GCC GTA ACC CGT TCC	18	72	319	56
D2	37M566R	TTTAGGGCCTCACAGTTTCA	20	69	837	52
	309H325R	TTCCCTCACCTCCCTGCTTA	20	74	301	56
E2	4BH246325F:	CAG CTG CTT CAT CAT CAT CGC	21	74	319	56
	765BM084566R	GAG TCA TYM ACA AGT KGT GC	20	63	421	50
F2	4BH246325F:	CAG CTG CTT CAT CAT CAT CGC	21	74	319	56
	873M566R	ATATGCAAAGGTGCCAATCC	20	70	837	52
G2	9FH325F	GCTTCATCATCATCGCCGAC	20	72	301	56
	765BM084566R	GAG TCA TYM ACA AGT KGT GC	20	63	421	50
H2	9FH325F	GCTTCATCATCATCGCCGAC	20	72	301	56
	873M566R	ATATGCAAAGGTGCCAATCC	20	70	837	52
Interação BM336 x BH571						
A3	100BM084336F	CCG CTT ACC TSC ACR TCS TC	20	69	510	56
	782BH245571R	TTT URA YRY ATG MAT GRA GC	20	63	490	50
B3	100BM084336F	CCG CTT ACC TSC ACR TCS TC	20	69	510	56
	915H571R1	GCTGCGTGGACATGACTACA	20	70	915	53
C3	33M336F	CGTCCAGACCCACCTCAAGCT	21	76	924	56
	782BH245571R	TTT URA YRY ATG MAT GRA GC	20	63	490	50
D3	33M336F	CGTCCAGACCCACCTCAAGCT	21	76	924	56
	915H571R1	GCTGCGTGGACATGACTACA	20	70	915	53
E3	293BH245571F	TGT MRA CGA AGA KGC GGA YG	20	71	490	50
	608BM084336R	ACA GCC ACG AAG TCG GTG AA	20	74	510	56
F3	293BH245571F	TGT MRA CGA AGA KGC GGA YG	20	71	490	50
	956M336R	AGGCAGGCAGGATTCCGAGT	20	77	924	56
G3	1H571F	CTGCAGAGAGAGGGAAACAGG	21	72	915	53
	608BM084336R	ACA GCC ACG AAG TCG GTG AA	20	74	510	56
H3	1H571F	CTGCAGAGAGAGGGAAACAGG	21	72	915	53
	956M336R	AGGCAGGCAGGATTCCGAGT	20	77	924	56

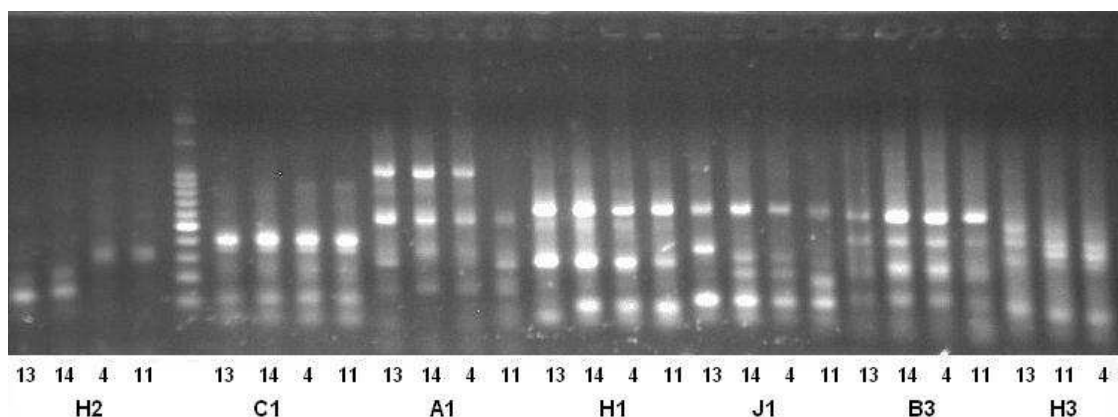


FIGURA 1. Perfil PCR das variedades de cana-de-açúcar conforme Tabela 2, analisados com os iniciadores H2, C1, A1, H1, J1, B3, H3, conforme Tabela 3.

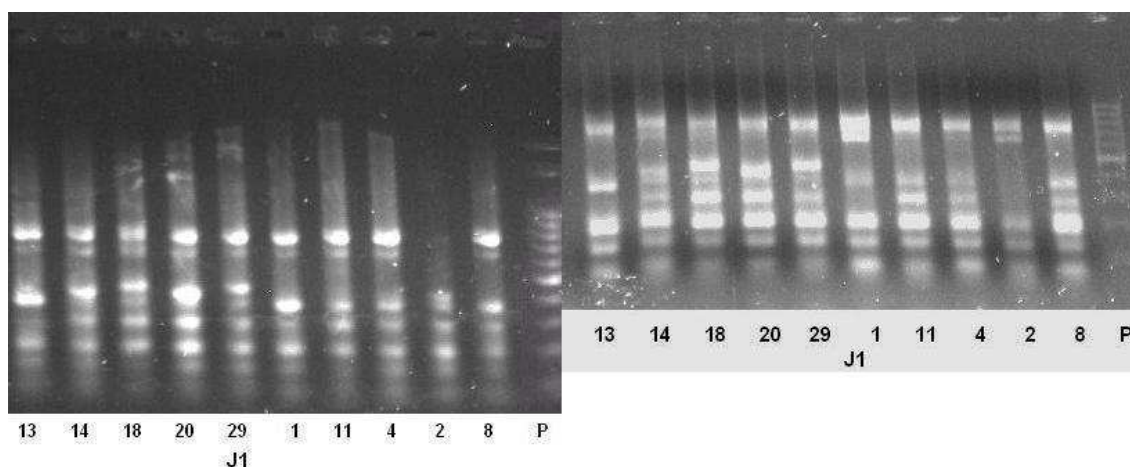


FIGURA 2. Perfil PCR das variedades de cana-de-açúcar conforme Tabela 2, analisados com o iniciador J1 conforme Tabela 3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises de PCR entre os dezoito iniciadores da Tabela 2 e das interações entre os iniciadores da Tabela 3 mostraram várias diferenças de amplificação de fragmento entre variedades resistente e suscetível de acordo com os iniciadores utilizados, conforme pode ser vista pela Figura 1, em que ocorrem diferenças entre as variedades resistente CT2 (13) e suscetível CT3 (14) ou resistente a ferrugem marrom SP80-3280 (4) e suscetível SP84-2025 (11) para os iniciadores A1 (134C673Fx405BH245871R), J1 (191BH245871F x 485q976R) e H3 (1H571Fx956M336R), porém, similaridade entre as variedades suscetível CTC3 e resistente a ferrugem marrom SP80-3280. A Figura 2 mostra que um fragmento de cerca de 500pb foi amplificado pelo iniciador J1, apenas pelas resistentes CTC7 (18) e resistente CTC19 (29), porém não pelas resistentes CTC2 (13) e SP80-3280 (4), enquanto as suscetíveis CTC3 (14), intermediária CTC9 (20), intermediária SP79-1011 (1), suscetível SP8425 (11), suscetível SP89-1115 (2) e suscetível RB72-454 (8) não

amplificaram, confirmando que as diferenças não foram consistentes.

CONCLUSÃO

Os resultados de análise de PCR, em 30 variedades de cana-se-açúcar, com dezoito pares de iniciadores e 70 interações entre os iniciadores localizados quase no mesmo sítio genômico, mostraram que apesar de algumas variações observadas entre variedades susceptíveis e resistentes, em algumas interações, o resultado não é consistente para todas as variedades consideradas resistentes ou suscetíveis.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ/PIBIC, pela bolsa concedida e CNPQ/MAPA Edital 64/2008 pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASNAGHI, C., F. PAULET, C. KAYE, L. GRIVET, J. C. GLASZMANN et al. Application of synteny across the Poaceae to determine the map location of a rust resistance gene of sugarcane. **Theor. Appl. Genetics**, v.10, p. 962–969, 2000.
- ASNAGHI, C., A. D'HONT, J. C. GLASZMANN AND P. ROTT. Resistance of sugarcane cultivar R570 to *Puccinia melanocephala* isolates from different geographic locations. **Plant Disease**, v.85, p. 282–286, 2001.
- ASNAGHI C, ROQUES D, RUFFEL S, KAYE C, HOARAU JY, TÉLISMAH H, GIRARD JC, RABOIN LM, RISTERUCCI AM, GRIVET L, D'HONT A. Targeted mapping of a sugarcane rust resistance gene (Bru1) using bulked segregant analysis and AFLP markers. **Theor Appl Genetics**, v.108, n.4, p.759-64, 2004.
- DAUGROIS, J. H., L. GRIVET, D. ROQUES, J. Y. HOARAU, H. LOMBARD ET AL. A putative major gene for rust resistance linked with an RFLP marker in sugarcane cultivar R570. **Theor. Appl. Genetics**, v.92, p. 1059–1064, 1996.
- LE CUNFF, L. GARSMEUR, O.,& D'HONT, A. Diploid/Polyploid Syntenic Shuttle Mapping and Haplotype-Specific Chromosome Walking Toward a Rust Resistance Gene (Bru1) in Highly Polyploid Sugarcane ($2n \sim 12x \sim 115$). **Genetics**, v.180, n.1, p.649–660, 2008.
- RYAN, C. C.; EGAN, B. T. RUST. In: Ricaud, C.; Egan, B. T.; Gillaspie Junior, A. G.; Hughes, C. G. **Diseases of sugarcane**. Amsterdam: Elsevier, p. 189-210, 1989.