



VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA À FERRUGEM MARROM (*PUCCINIA MELANOCEPHALA*) EM CANA-DE-AÇÚCAR

Paulo E. **Compachiarl**^{1a}; Silvan G. **Silva**^{1c}, Dilermando **Perecin**^{3c}, Fernanda R.C dos **Santos**^{2c}, Luciana Rossini **Pinto**^{2b}

¹Unesp, Jaboticabal-sp; ²Instituto Agronomico de Campinas, IAC; ³Departamento de Ciências Exatas, Unesp, Jaboticabal

Nº 13130

RESUMO - A ferrugem marrom é considerada uma das mais importantes doenças da cana-de-açúcar. Esta doença tem causado perdas consideráveis, o que leva à necessidade da adoção de variedades resistentes para o seu controle. O objetivo deste trabalho foi validar marcadores moleculares do tipo microssatélites previamente associados à ferrugem marrom em um grupo de 28 cultivares e clones de cana-de-açúcar resistentes e susceptíveis. Foram avaliados 16 pares de primers SSRs nos grupos de resistência e susceptibilidade. A presença e ausência das marcas entre os grupos foram estatisticamente comparadas para verificar a existência de associação entre o marcador e a característica de resistência à ferrugem com base na estatística Kappa e F utilizando pelo software SAS. A maior diferença entre os dois grupos ocorreu com a marca SCB236.4, seguida das marcas SCA53.8 e SCB130.4. Não foram encontradas marcas totalmente exclusivas aos dois grupos de resistência e susceptibilidade. Os marcadores SCB236.1 e SCB130.10 se mostraram eficientes na identificação da maioria dos genótipos de susceptibilidade e provavelmente representam marcas próximas aos alelos de susceptibilidade à ferrugem marrom. Os marcadores SCA53.6 e SCB248.3 são restritamente associáveis a alelos de resistência.

Palavras-chaves: melhoramento, resistência, doenças de plantas

^aBolsista CNPq; Graduação em Eng. Agrônoma, Unesp, Jaboticabal-SP. ✉ paulocompachiarl@yahoo.com.br.

^bOrientador, ^cColaborador



ABSTRACT - Sugarcane brown rust is considered one of the most important diseases causing considerable losses in productivity leading to the need of the adoption of resistant varieties for its control. The aim of this study was to validate microsatellite markers previously associated with brown rust in a group of 28 resistant and susceptible sugarcane cultivars. We analyzed 16 pairs of SSR primers in this group of resistance and susceptibility. The presence and absence of the markers between groups were statistically compared to verify the existence of an association between the marker and the rust resistance based on Kappa and F statistics SAS software. The major difference between the two groups was revealed by the SCB236.4 marker followed by the SCA53.8 SCB130.4 markers. None of the markers were totally exclusive to the two groups of resistance and susceptibility. SCB236.1, SCB130.10 markers proved to be efficient in identifying the most susceptible genotypes and probably represent markers close to susceptibility alleles to brown rust. The SCA053.6 and SCB248.3 markers were strictly associated with resistance alleles.

Key-words: breeding, resistance, plant diseases

1 INTRODUÇÃO

A ferrugem marrom, causada pelo fungo *Puccinia melanocephala* é considerada uma das mais importantes doenças da cana-de-açúcar (Matsuoka et al. 2005) e tem causado perdas consideráveis de produtividade, o que leva à necessidade da adoção de variedades resistentes para o seu controle.

Os sintomas da doença se restringem, principalmente, nas partes foliares onde surgem inicialmente pequenas pontuações cloróticas que evoluem na forma de manchas alongadas de cor amarelo-pálida, visíveis em ambas as partes da folha. Em geral, as pústulas (uredosporos) se desenvolvem na parte abaxial das folhas, permanecendo ativas por um longo período de tempo (Asnaghi et al. 2001). A resistência à ferrugem tem sido considerada como de herança quantitativa e herdabilidade moderada a alta sendo a avaliação da reação da planta à doença relativamente fácil baseando-se na severidade do sintoma mensurado via escala de notas (Hogarth et al. 1987, Asnaghi et al. 2001).

Os marcadores moleculares constituem uma ferramenta de grande potencial de aplicação para os programas de melhoramento. A seleção assistida por marcadores moleculares para caracteres como a resistência a doenças pode facilitar e acelerar o processo de desenvolvimento



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

de variedades de cana-de-açúcar. Na seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) o fenótipo é selecionado com base no genótipo de um marcador molecular (Collard et al. 2005).

Os passos necessários para o desenvolvimento de marcadores moleculares a serem usados na SAM envolvem o mapeamento de alta resolução, validação dos marcadores e a possível conversão do marcador (Collard et al. 2005). Desta forma, marcadores identificados pelo mapeamento devem ser validados antes de serem utilizados na seleção assistida.

Marcadores microssatélites genômicos e derivados de ESTs já foram encontrados apresentando associação com a resistência à ferrugem marrom em uma população de mapeamento do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar do Instituto Agronômico de Campinas. Esta população é derivada do cruzamento entre o clone IACSP95-3018 e a variedade IACSP93-3046. Entretanto, é de fundamental importância que se faça a validação de marcadores moleculares associados aos prováveis QTLs detectados antes de sua aplicação como ferramenta de auxílio na seleção de genótipos resistentes. Esta validação pode ser conduzida pela avaliação do marcador em outro background genético, utilizando grupos de variedades ou clones cuja resposta a ferrugem marrom em diferentes ambientes é bem conhecida.

Neste sentido, o presente projeto tem como objetivo validar marcadores moleculares do tipo microssatélites genômicos (gSSRs) e derivados de ESTs (EST-SSRs) previamente identificados em um cruzamento bi-parental entre o clone IACSP95-3018 e a variedade IACSP93-3046 em um grupo de variedades e clones de cana-de-açúcar cuja resposta à ferrugem marrom já é conhecida.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

Foram utilizados um grupo de 28 materiais envolvendo clones e cultivares tanto resistentes à ferrugem marrom como suscetíveis (Tabela 1).



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Tabela 1. Relação de cultivares e/ou clones de cana-de-açúcar utilizados para a validação dos marcadores moleculares.

Resistentes		Suscetíveis	
(1)R570	(8)IACSP91-1099	(15)SP71-1406	(22)IACSP93-1042
(2)IACSP93-2060	(9)IACSP95-3028	(16)IAC52-150	(23)IACSP95-1218
(3)IAC86-2210	(10)IACSP95-5000	(17)SP70-1143	(24)SP79-1011
(4)IAC91-2195	(11)IACSP93-3046	(18)RB83-5486	(25)IACSP95-3018
(5)IACSP93-6006	(12)SP83-2847	(19)IAC86-2480	(26)IACSP96-7586
(6)IACSP94-2094	(13)SP81-3250	(20)IAC91-5155	(27)IACSP96-2008
(7)IACSP94-4004	(14)SP80-3280	(21)IACSP97-6682	(28) IAC5155

2.2 Avaliações com marcadores SSRs

O DNA genômico total foi obtido de 300 mg de tecido foliar fresco moído utilizando o método do CTAB (Hoisington et al. 1994). As reações de PCR foram efetuadas em um volume final de reação de 15 µl contendo (40 ng do DNA molde, 0.2µM de cada par de primer, 100 µM de cada dNTP, 2.0 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, e 0.5 unidades de Taq DNA polimerase). A relação dos SSRs utilizados encontra-se na Tabela 02. O programa de amplificação foi o mesmo utilizado por Pinto et al. (2004). Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante a 6% utilizando ladder de 10 bp como marcador de peso molecular e reveladas pela coloração com prata de acordo com o protocolo estabelecido por Creste et al. (2001).

Tabela 2. Relação dos SSRs avaliados com suas temperaturas de anelamento e tamanho do produto esperado em pares de bases (pb).

SSR	Ta (°C)	Produto (pb)	SSR	Ta (°C)	Produto (pb)
SCB040	63,9	155	SCB007	62	291
SCA053	58,9	186	SCC036	54	166
SCB219	62,7	151	SCB292	58,9	181
SCB130	58,9	124	SCB236	63,9	177
SCB060	61	198	SMC119	50	119
SCB248	61	330	SMC415MS	50	339
SCB246	61	142	SMC2017FL	50	229
SCB232	61	126	CIR23	54	281
SCB007	62	291	SCC036	54	166



2.3 Análise dos dados marcadores microssatélites

Os marcadores foram genotipados com base na sua presença (1) e ausência (0). Para cada marcador, os materiais foram agrupados em duas classes: aqueles que apresentam o marcador e aqueles que não apresentam o marcador. As médias fenotípicas das duas classes para resistência/susceptibilidade à ferrugem marrom foram estatisticamente comparadas para verificar a existência de associação entre o marcador e a característica de resistência à ferrugem com base na estatística Kappa e F utilizando o software SAS ver 9.2.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 16 microssatélites avaliados nos dois grupos de materiais (resistentes e susceptíveis) geraram marcas dentro do tamanho esperado (Figura 1). No total foram obtidos 145 marcadores, os quais foram submetidos às análises estatísticas para a detecção de marcadores que podem ser específicos aos grupos de resistência ou susceptibilidade.

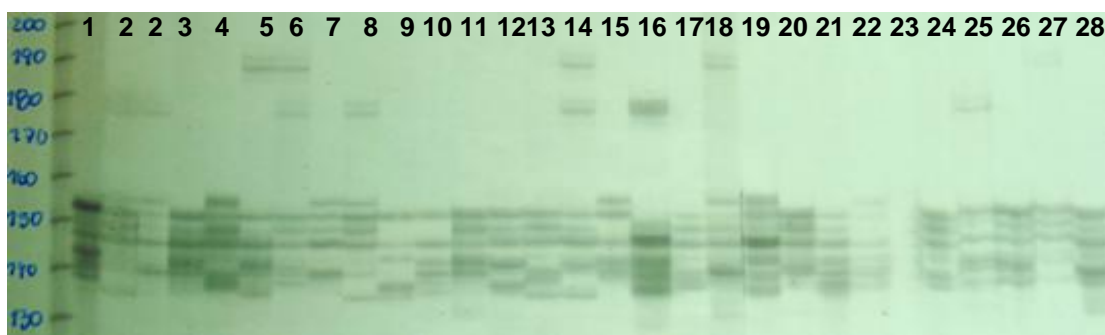


Figura 1. Gel de poliacrilamida corado com prata nos 28 materiais avaliados para o primer SSR (SCB246). (1)R570; (2)IACSP93-2060; (3)IAC86-2210; (4)IAC91-2195, (5)IACSP93-6006; (6)IACSP94-2094; (7)IACSP94-4004; (8)IACSP91-1099; (9)IACSP95-3028; (10) IACSP95-5000; (11)IACSP93-3046; (12)SP83-2847; (13)SP81-3250; (14)SP80-3280 (15)SP71-1406; (16)IAC52-150; (17)SP70-1143; (18)RB83-5486; (19)IAC86-2480; (20)IAC91-5155; (21)IACSP97-6682; (22)IACSP93-1042; (23)IACSP95-1218; (24)SP79-1011; (25)IACSP95-3018; (26)IACSP96-7586; (27)IACSP96-2008; (28) IAC5155.

Na tabela 3 são apresentados os marcadores que mostraram associação à resistência ou susceptibilidade dentro dos grupos avaliados (resistência e susceptibilidade). Quanto maior a estatística F entre os grupos (maior o F-valor), maior a diferença entre os grupos. Para a estatística Kappa, quanto mais negativa mais a discrepância entre os grupos de resistência e susceptibilidade e quanto mais positiva, maior a concordância. Desta forma, verifica-se que a maior diferença entre



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

os dois grupos ocorreu com a marca SCB236.4, seguida das marcas SCA53.8 e SCB130.4. Não foram encontradas marcas totalmente exclusivas aos dois grupos de resistência e susceptibilidade.

Tabela 3. Relação dos marcadores SSRs que mostraram associações dentro de cada um dos grupos (resistência e/ou susceptibilidade) com respectivos valores de F e da estatística Kappa.

Marcas	Resistentes (marca - 0)	Resistentes (presença -1)	Susceptíveis (marca - 0)	Susceptíveis (presença -1)	F (valor)	KAPPA
SCB236.4	12	2	3	11	18,47	0,6429
SCA53.8	8	6	14	0	9,75	-0,4286
SCB130.4	6	8	0	14	9,75	0,4286
SCB248.6	11	3	14	0	3,55	-0,2143
SCB60.3	1	13	0	14	1	0,0714

De acordo com os valores obtidos pela estimativa Kappa, a concordância entre os grupos pode ser classificada em baixa, alta ou média. Desta forma, valores entre $\pm 0,25 - 0,5$ (baixa); $0,5 - 0,75$ (média) e $> 0,75$ (alta). A estimativa F é uma razão entre as marcas (alelos) observadas nos indivíduos resistentes e suscetíveis. Um F ideal é de 0,005 e quanto maior o valor de F maior significa a especificidade de uma marca estar presente em apenas nas variedades suscetíveis ou nas resistentes.

4 CONCLUSÃO

Os marcadores SCB236.1 e SCB130.10 se mostraram eficientes na identificação da maioria dos genótipos de susceptibilidade e provavelmente representam marcas próximas aos alelos de susceptibilidade à ferrugem marrom. Os marcadores SCA053.6 e SCB248.3 são restritamente associáveis a alelos de resistência.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Asnaghi, C.; D'hont, A.; Glaszmann, J. C.; Rott, P. Resistance of sugarcane cultivar R570 to *Puccinia melanocephala* isolates from different geographic locations. **Plant Disease**, v.85, p. 282-286, 2001.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Collard, B. C. Y.; Jahufer, M. Z. Z.; Brouwer, J. B.; Pang, E. C. K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica**, v. 142, p. 169-196, 2005.

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.

Hogarth, D. M., Ryan, C. C., Taylor, P. W. J. Quantitative inheritance of rust resistance in sugar cane. **Field Crops Research**, v. 34, n. 2, p. 187-193, 1993.

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

Matsuoka, S.; Garcia, A. A. F.; Arizono, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. p. 205-251. In A. Borém (Ed). Melhoramento de espécies cultivadas. 2.ed. Editora UFV, Viçosa. 969 p., 2005.

Pinto, L. R.; Oliveira, K. M.; Ulian, E. C.; Garcia A. A.F.; Souza, A. P. Survey in the sugarcane expressed sequence tag data base (SUCEST) for simple sequence repeats. **Genome**, v. 47, p. 795–804, 2004.