

IDENTIFICAÇÃO DE QTLs LIGADOS À RESISTÊNCIA A *Meloidogyne incognita* RAÇA 3 EM UM CRUZAMENTO DE *Gossypium hirsutum* X *Gossypium barbadense*

Esdras Henrique da Silva¹, Regina M. D. G. Carneiro², Márcio de Carvalho Moretzsohn²

¹Professor EBTT - IFTO, campus Colinas do Tocantins. e-mail: <esdras.silva@ifto.edu.br>

²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Cenargen, Brasília-DF

Resumo: Visando à introgressão de genes de resistência a *Meloidogyne incognita* raça 3 no algodão cultivado, um mapa de ligação foi construído, usando uma população F₂, obtida do cruzamento entre o genótipo *Gossypium hirsutum* FM 966 (suscetível) e o acesso *G. barbadense* CIR1348 (resistente). Esse mapa foi baseado em marcadores microssatélites. No total, 269 marcadores microssatélites já publicados foram usados. Os 269 pares de primers SSR revelaram 313 locos que segregaram na população de mapeamento. Como em outros mapas genéticos de algodão tetraploide publicados, alguns marcadores amplificaram mais de um loco. O mapa genético construído com a população F₂ consistiu de 29 grupos de ligação. Um comprimento total de 4.294 cM foi obtido e os grupos variaram de 52,8 cM (3 marcadores) a 241,3 cM (14 marcadores) com uma distância média de 15 cM entre marcadores adjacentes. Esse mapa foi utilizado para identificação de QTLs ligados à resistência a *M. incognita* raça 3.

Palavras-chave: algodão, marcador microssatélite, nematoide das galhas, seleção assistida.

1 INTRODUÇÃO

Marcadores moleculares são ferramentas muito utilizadas para diversas análises genéticas. Por meio deles pode-se realizar a construção de mapas de ligação e auxiliar a introgressão de genes em programas de melhoramento genético. O principal objetivo dos trabalhos que buscam associar marcadores a um dado caráter é permitir a seleção indireta de indivíduos por meio do uso de marcadores. Este processo é conhecido como seleção assistida por marcadores. Em situações nas quais há dificuldade de seleção por meio de fenotipagem, como é o caso da seleção para resistência ao nematoide das galhas, a identificação de marcadores moleculares ligados a um ou mais genes de resistência é de grande utilidade.

Marcadores microssatélites têm sido utilizados em diversas espécies de plantas para a construção de mapas genéticos, para o mapeamento de QTLs (Quantitative Trait Loci) e para uso em seleção assistida, pois são codominantes, o que possibilita a discriminação de genótipos heterozigotos, e possuem caráter multi-alélico (Guimarães et al, 2006). Ynturi et al (2006) identificaram marcadores microssatélites associados a genes que conferem resistência a *M. incognita*, para serem usados em seleção assistida. Os autores desse trabalho sugeriram que a resistência ao nematoide era proveniente de pelo menos dois genes localizados nos cromossomos

11 e 14, e que os marcadores BNL 3661, 3544 e 3645 estão próximos ao gene localizado no cromossomo 14; e o marcador BNL 1231 próximo ao gene do cromossomo 11.

No Brasil há poucas variedades comerciais de algodão com nível de resistência adequado ao nematoide das galhas. Sendo assim, é importante e necessário a identificação e caracterização de novas fontes de resistência e sua incorporação em germoplasma melhorado. Recentemente, Mota et al. (2012) realizaram análises de novas fontes de resistência do algodoeiro a *M. incognita* raça 3. Acessos de *Gossypium* ssp., alguns deles selvagens, nunca testados no Brasil, foram avaliados quanto à resistência a *M. incognita* em experimentos em casa de vegetação. Na análise citada, vários acessos foram considerados resistentes, dentre eles o acesso CIR1348, o qual é objeto de estudo deste trabalho. O objetivo deste estudo foi identificar marcadores associados à QTLs de resistência ao nematoide das galhas das galhas *M. incognita* raça 3. Para isso, foi construído um mapa genético de ligação para o algodão baseado em marcadores microssatélites já publicados e, com base nesse mapa foram identificados QTLs ligados à resistência a esse nematoide.

2 METODOLOGIA

Material vegetal: Uma população F_2 foi construída por autopolinização de uma única planta F_1 proveniente do cruzamento do genótipo *G. hirsutum* FM 966 (progenitor feminino), suscetível a *M. incognita*, com o acesso resistente *G. barbadense* CIR1348 (progenitor masculino). As sementes das plantas F_2 foram produzidas pelos colaboradores da Embrapa Algodão. O cruzamento foi realizado em casa de vegetação, em condições de temperatura e umidade controladas. Um total de 240 sementes F_2 foi enviado para a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), local do experimento de fenotipagem.

Extração de DNA e PCR dos locos microssatélites: tecidos foliares jovens foram utilizados para a extração do DNA genômico total, utilizando o kit de extração NucleoSpin® (MACHEREY-NAGEL). A concentração de DNA foi estimada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, comparando-se as intensidades de fluorescência de cada amostra corada com brometo de etídio com diferentes padrões de DNA Lambda. O sucesso da extração também foi verificado por meio da amplificação por PCR usando dois pares de primers microssatélites CIR 249 e BNL2496, de padrão de bandas conhecidos e contrastantes entre os dois parentais. Para esse teste, as reações de PCRs foram realizadas em volumes de 13 μ l conforme descrito por Silva, 2014. Esta parte do trabalho foi realizada no Laboratório de Genética Vegetal do Cenargen, sob orientação dos pesquisadores Dr. Márcio Moretzsohn e Dra. Vânia Azevedo.

Genotipagem dos marcadores SSR em sequenciador capilar: A genotipagem das plantas F_2 e dos parentais foi realizada em cooperação com o CIRAD (Centro Internacional de Pesquisa Agrícola para o Desenvolvimento) da França. Para isso, as amostras de DNA de tecidos foliares extraídas no Brasil foram enviadas para Montpellier. A metodologia usada na genotipagem foi descrita por Schuelke (2000). As reações de PCR foram realizadas em placas de 384 poços, num volume final de 10 μ l contendo 5 ng de DNA, tampão de PCR 1X, 0,5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de cada dNTP, 0,08 μ M do iniciador contendo a sequência específica M13, 0,1 μ M do segundo iniciador específico, 0,1 μ M do iniciador M13 de 19 nucleotídeos marcados com fluorocromo, e 1 U de *Taq* DNA polimerase. Os parâmetros de amplificação foram: 5 min. a 94 ° C; 35 ciclos: 30 seg a 94 ° C, 1 min. a 55 ° C, 1 min. a 72 ° C, 30 min. a 72 ° C.

Para os testes preliminares de seleção de marcadores, foram usados apenas os genótipos (DNAs) parentais. Para a genotipagem da população F_2 , foram formados grupos ou “pools” de 8 amplificações, de acordo com o tamanho de cada um dos fragmentos amplificados e o fluorocromo utilizado (dois marcadores por fluorocromo). Dois conjuntos (ou ‘pools’) de oito primers SSR foram testados na mesma placa 384, com os dois parentais e a população F_2 repetidos. Foram adicionados 10 μ l do marcador GeneScan 600 a cada poço e a placa foi, em seguida, colocada em um sequenciador automático capilar ABI 3500XL.

Construção do mapa: um conjunto de 313 marcadores microssatélites publicados (Blenda *et al.*, 2012), foi selecionado conforme sua distribuição nos 26 cromossomos do algodão, tomando como referência um mapa genético consenso de alta densidade (high density consensus -HDC) publicado para o algodão (Blenda *et al.*, 2012). Esses marcadores foram testados primeiramente nos parentais FM966 e CIR1348, para identificação de primers polimórficos e apenas estes foram utilizados para a genotipagem da população F_2 constituída de 180 indivíduos. Alguns marcadores amplificaram mais de um loco e estes foram designados pela adição de uma letra minúscula em ordem alfabética após o nome do loco.

O teste de qui-quadrado (X^2) foi utilizado para testar a hipótese nula de segregação 1:2:1 ou 3:1 de todos os marcadores. Apenas os marcadores que não apresentaram distorções da proporção 1:2:1 esperada, a um limite de significância de 5%, foram utilizados inicialmente para a construção do mapa. As análises de ligação foram feitas usando o programa Mapmaker, versão 2.0 (Lander *et al.*, 1987). Um LOD score mínimo de 5 e uma fração de recombinação máxima (θ) de 0,35 foram utilizados como parâmetros para estabelecimento dos grupos de ligação, usando a função “group”. A ordem mais provável dos marcadores em cada grupo de ligação foi estimada pelo método de máxima verossimilhança, usando a função “first order”. As ordens dos marcadores foram confirma-

das por permutações de todas as trincas de marcadores adjacentes (função “ripple”). O comando “try” foi então usado para determinar a posição exata dos novos marcadores dentro de cada grupo. As novas ordens obtidas foram novamente confirmadas com o comando “ripple”. As frações de recombinação foram convertidas em distâncias de mapa, em centimorgans (cM), usando a função de mapeamento de Kosambi, que leva em consideração a interferência (I).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Construção do mapa genético: no total, 313 marcadores microsatélites foram selecionados de acordo com sua localização no genoma dos parentais. Desses marcadores, 269 mostraram-se polimórficos entre os pais e foram utilizados para genotipagem da população de mapeamento.

Os 269 pares de primers SSR amplificaram 313 locos. Como em outros mapas genéticos de algodão tetraploide publicados, alguns marcadores amplificaram mais de um loco. Duzentos e vinte e seis pares de primers amplificaram um loco, 42 revelaram dois locos, um par de primers amplificou 3 locos. Seis plantas foram excluídas das análises por apresentarem alelos não presentes em nenhum dos pais. Portanto, os dados de genotipagem de 174 plantas F_2 foram utilizados para construção do mapa de ligação e mapeamento de QTLs.

O mapa genético construído com a população F_2 consistiu de 284 marcadores e 29 grupos de ligação. Um comprimento total de 4.294 cM foi obtido e os grupos variaram de 52,8 cM (3 marcadores) a 241,3 cM (14 marcadores), com uma distância média de 15,1 cM entre marcadores adjacentes (Tabela 1). A maioria dos intervalos entre marcadores adjacentes foi maior do que 10 cM.

Os grupos de ligação formados foram classificados comparando-se os marcadores em comum com os 26 cromossomos do mapa HDC. Dessa forma, esses grupos foram atribuídos a cada um dos 26 cromossomos do algodão, sendo que os grupos C3B, C5B e C14B foram atribuídos aos cromossomos C3, C5 e C14, respectivamente, devido à presença de marcadores em comum com o mapa HDC.

Tabela 1 - Características do mapa genético obtido do cruzamento de algodoeiro FM966 (*Gossypium hirsutum*) x CIR1348 (*G. barbadense*).

Cromossomo/ Grupo de ligação	Comprimento em cM	Número de locos
C1	147,8	12
C2	160	13
C3	192,6	12
C4	116	10
C5	159,7	9
C6	185	13
C7	187,2	10
C8	104	7
C9	181,2	11
C10	104,6	8
C11	211,8	13
C12	174,5	9
C13	52,8	3
C14	181,6	11
C15	170,3	13
C16	129,5	7
C17	171,4	12
C18	179,4	10
C19	241,3	14
C20	151,3	10
C21	200,7	17
C22	137,3	8
C23	204,8	13
C24	199,5	11
C25	116,6	7
C26	145,5	10
C3B	23,8	3
C5B	33,1	4
C14B	30,7	4

O mapa genético construído neste trabalho, consistiu de 269 marcadores e 29 grupos de ligação, possui 313 locos e um tamanho de 4.294 cM. Entretanto, na construção do mapa HDC foram

utilizados 6.669 marcadores, ou seja, praticamente todos os marcadores SSR publicados para o algodão (Blenda *et al.*, 2012). O mapa HDC é constituído de 26 cromossomos (grupos de ligação), possui 8.254 locos e tem o tamanho de 4.070 cM. Quando se comparam os dois mapas (o mapa produzido neste trabalho com o mapa HDC), observa-se que os tamanhos de ambos são similares, porém há diferenças no número de locos por grupo de ligação, no tamanho dos grupos e no ordenamento dos marcadores dentro dos grupos são observadas. Segundo Lacape *et al.* (2004), tais diferenças podem ser devidas aos tamanhos das populações F_2 usadas, ao programa utilizado para construção dos mapas e ao número de marcadores usados para confecção dos mapas. Esses mesmos autores relataram que a distância total de um mapa gerado pelo JoinMap foi 28% menor do que o mapa gerado pelo MapMaker, ou seja, o programa JoinMap produz mapa com menor distância, em comparação com MapMaker. Rong *et al.* (2004) desenvolveram um mapa genético para o algodão utilizando MapMaker 3.0 e JoinMap, que utilizam algoritmos diferentes, como consequência, os programas geraram mapas com tamanhos diferentes.

Fang & Yu (2012) adicionaram 455 locos em um mapa genético publicado por Yu *et al.* (2012). Com a adição desses novos locos, observaram-se mudanças na ordem dos marcadores e um erro de mapeamento que envolvia os cromossomos 19 e 22, sendo que no primeiro mapa um grupo de 16 locos estava mapeado no cromossomo 19 e no segundo mapa, após a adição dos novos locos, tal grupo foi mapeado no cromossomo 22.

A distância genética em cM do genoma do algodão tetraploide varia entre 3.380 (Yu *et al.*, 2012) e 5.454 (Zhang *et al.*, 2008). No entanto, o mapa produzido por Zhang *et al.* (2008) apresenta 44 grupos de ligação, assim, a distância total pode estar superestimada. Um mapa produzido por Yu *et al.* (2011), encontrou uma distância genética total de 4.419 cM, mas, de acordo com Fang & Yu (2012) esta distância pode estar superestimada, pois há 35 intervalos maiores que 10 cM, sendo cinco destes maiores do que 20 cM.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento gerado por meio deste estudo é uma contribuição importante visando o uso de uma nova fonte de resistência ao nematoide das galhas. O próximo passo é identificar os QTLs, ou locos de característica quantitativa que conferem resistência no algodoeiro ao nematoide das galhas.

REFERÊNCIAS

- BLENDA, A.; FANG, D.D.; RAMI J. F.; GARSMEUR, O.; LUO, F. & LACAPE, J. M. **A High Density Consensus Genetic Map of Tetraploid Cotton That Integrates Multiple Component Maps through Molecular Marker Redundancy Check.** PLoS ONE. 7(9): e45739. doi:10.1371/journal.pone. 0045739. 2012
- FANG, D.D. & YU, J.Z. **Addition of 455 Microsatellite Marker Loci to the High-Density *Gossypium hirsutum* TM-1 x *G. barbadense* 3-79 Genetic Map.** The Journal of Cotton Science 16:229–248. 2012
- GUIMARÃES, C.T.; SCHUSTER, I.; MAGALHÃES, J.V.DE. & SOUZA JR, C.L.de. **Marcadores Moleculares no Melhoramento de Plantas.** In: Borém, A.; Caixeta, E.T.. Marcadores Moleculares. Viçosa, MG: UFV. Cap. 4, p. 107-144. 2006
- LACAPE, J.M.; JACOBS, J.; ARIOLI, T.; DERIJCKER, R.; FORESTIER- CHIRON, N.; LLEWELLYN, D.; JEAN, J.; RONG, J.K.; ABBEY, C.; BOWERS, J.E.; BRUBAKER, C.L.; CHANG, C.; P. CHEE, W.; T.A.; DELMONTE, X.; et al. **A 3347- locus genetic recombination map of sequence-tagged sites reveals features of genome organization, transmission and evolution of cotton (*Gossypium*).** Genetics 166:389–417. 2004
- LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M.J. & LINCOLN, S.E. **Newburg, L. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic maps of experimental and natural populations.** Genomics, v.1, p.174-181. 1987
- MOTA, F.; ALVES, G.; GIBAND, M.; GOMES, A.; SOUSA, F.; MATTOS, V.; BARBOSA, V.; BARROSO, P.; NICOLE, M. & PEIXOTO, J. **New sources of resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 in wild cotton accessions and histological characterization of the defence mechanisms.** Plant Pathol. doi:10.1111/ppa.12022. 2012
- RONG, J.K.; ABBEY, C.; BOWERS, J.E.; BRUBAKER, C.L.; CHANG, C.; P.W.; et al. **A 3347-locus genetic recombination map of sequence-tagged sites reveals features of genome organization, transmission and evolution of cotton (*Gossypium*).** Genetics 166:389–417. 2004
- SCHUELKE, M. **An economic method for the fluorescent label ling of PCR fragments.** Nature Biotechnology 18: 233-234. 2000
- SILVA, E.H. **Variabilidade genética e fisiológica de populações de *Meloidogyne incognita* e identificação de QTLs de uma nova fonte de resistência do algodoeiro (*Gossypium* spp.) a esse nematoide.** 2014. 162 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- THOMAS, E. & VIOT, C. **A new interspecific, *Gossypium hirsutum* × *G. barbadense*, RIL population: towards a unified consensus linkage map of tetraploid cotton.** Theor. Appl. Genet.119:281–292. 2009.

YNTURI, P.; JENKINS, J.N.; MCCARTY, J.C.; GUTIÉRREZ, O.A. & SAHA, S. **Association of root-knot resistance genes with simple sequence repeat markers on two chromosomes in cotton.** *Crop Sci.* 46:2670–2674. 2016

YU, J.Z.; KOHEL, R.J.; FANG, D.D.; CHO, J.; VAN DEYNZE, A.; ULLOA, M.; HOFFMAN, S.M.; PEPPER, A.E.; STELLY, D.M.; JENKINS, J.N.; SAHA, S.; KUMPATLA, S.P.; SHAH, M.R.; HUGIE, W.V. & PERCY, R.G. 2012b. **A high-density simple sequence repeat and single nucleotide polymorphism genetic map of the tetraploid cotton genome.** *G3, Genes | Genomes Genetics.* 2:43–58. Available online [http://www.nespal.org/peng_lab/papers/John% 20Z%20et %20al%202012.pdf](http://www.nespal.org/peng_lab/papers/John%20Z%20et%20al%202012.pdf) (verified 20 July 2012).

YU, Y.; YUAN D.J.; LIANG, S.G.; LI, X.M.; WANG, X.Q.; LIN, Z.X. & ZHANG, X.L. 2011. **Genome structure of cotton revealed by a genome-wide SSR genetic map constructed from a BC1 population between *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense*.** *BMC Genomics* 12:15.

ZHANG, Y.; LIN, Z.X.; XIA, Q.; ZHANG, M. & ZHANG, X.L.. **Characteristics and analysis of simple sequence repeats in the cotton genome based on a linkage map constructed from a BC1 population between *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense*.** *Genome* 51:534–546. 2008