



Aplicabilidade de Marcadores SSR em Estudos Genéticos em *Gossypium mustelinum* Miers

Paulo Augusto Vianna Barroso¹

Lúcia Vieira Hoffmann¹

Milena Ferreira Alves²

Rodolfo Barbosa de Freitas³

O interesse acerca do estudo e da preservação da biodiversidade tem aumentado, principalmente devido à necessidade de novas fontes de variabilidade genética. Essa variabilidade é utilizada para suprir carências de genes ausentes dentro do pool gênico adaptado e que controlam características de herança simples com elevada importância agrônômica, como por exemplo, a resistência a algumas doenças, ou para ampliar a base genética de caracteres complexos, como a produtividade. O caso do algodão não é diferente, pois os ganhos contínuos em produtividade atingidos nos últimos anos podem ser reduzidos ou deixarem de ocorrer, caso a diversidade usada nos programas de melhoramento do algodoeiro não seja ampliada. Uma espécie de algodão que poderia representar uma valiosa fonte de variabilidade genética seria *Gossypium mustelinum* Miers.

G. mustelinum, a única espécie de algodão endêmica do Brasil, é típica de matas ciliares, existindo como séries de indivíduos dispersos nas margens de lagos e riachos, em algumas regiões do Nordeste (BARROSO et al., 2005). Entretanto, a

espécie nunca sofreu nenhum tipo de seleção ou exploração comercial (BARROSO e FREIRE, 2003), sendo, assim, ainda pouco conhecida. BARROSO et al. (2006), estudando alguns indivíduos, verificaram significativo número de alelos exclusivos, entretanto, demonstraram que esta espécie apresenta baixa diversidade genética e elevada endogamia. A baixa diversidade associada a riscos que está sujeita em campo, resultam em alta vulnerabilidade da espécie.

Marcadores do tipo SSR (Simple Sequence Repeats) consistem de um a seis pares de bases, cujas seqüências se repetem em tandem (uma atrás da outra) ao longo do genoma. O número de repetições é altamente polimórfico, e podem ser analisados pela utilização de um par de iniciadores específicos complementares às seqüências que flanqueiam o SSR e que, ao contrário, são altamente conservadas. Segmentos amplificados a partir desses sítios são muito variáveis, com alelos que se distinguem por um número diferente de unidades repetitivas, refletidas por diferenças de tamanho, medidas em pares de bases. Locos SSR possuem expressão codominante, ou seja, ambos os alelos de um

¹ Eng. Agrôn., D.Sc., da Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, CEP 58.107-720, Campina Grande, PB. E-mail: pbarroso@cnpa.embrapa.br

¹ Eng. Agrôn., D.Sc., da Embrapa Algodão. E-mail: hoff@cnpa.embrapa.br

² Mestranda da Universidade de Federal do Rio Grande do Norte - Natal - RN. E-mail: milenafalves@yahoo.com.br

³ Graduando em Ciências Biológicas, UEPA, estagiário da Embrapa Algodão. E-mail: rodolfobfreitas@hotmail.com

indivíduo heterozigoto são visualizados. Estes marcadores moleculares têm sido utilizados nos mais diversos campos do estudo genético de espécies cultivares e selvagens, como na identificação de origem parental, atribuição de linhagens, construção de mapas genéticos, avaliação do germoplasma e populações de melhoramento e na estimativa de similaridade ou diversidade genética. Neste aspecto, marcadores SSR têm sido intensamente utilizados para estimar a diversidade genética de algodão (ALMEIDA, 2007; BERTINI, et al., 2006; LACAPE et al., 2007). Além de estudos visando traçar estratégias adequadas para a conservação *in situ* e *ex situ* de *G. mustelinum*, marcadores SSR podem auxiliar na definição de métodos de introdução da variabilidade da espécie nos programas de melhoramento. Para isso, um grande número de primers deve ser usado para que um perfil genético adequado possa ser utilizado em estudos de mapeamento e genômicos visando à realização de seleção assistida por marcadores.

Este trabalho teve como objetivo determinar os alelos SSR de indivíduos de *G. mustelinum* presentes em localidades da região semi-árida do Nordeste. Este estudo avaliou genótipos de *G. mustelinum* com marcadores SSR para verificar a aplicabilidade destes marcadores em estudos de mapeamento e de diversidade genética em que a espécie estiver envolvida.

Resultados e Discussão

O DNA de dez indivíduos foi extraído a partir de sementes segundo procedimento desenvolvido por Shuster et al. (2004). As reações PCR para amplificação dos alelos SSR foram realizadas segundo (NGUYEN, et al. 2004) e a coloração dos géis denaturantes de poliacrilamida 5% foi realizada segundo Creste et al. (2001). Foram analisados 53 pares de primers cujas seqüências foram desenvolvidas pelo CIRAD (CIR) ou no Brookhaven National Laboratory (BNL), que amplificaram 61 locos, dos quais 34 foram polimórficos (58%) entre os acessos incluídos no estudo (Tabela 1). Os pesos moleculares dos alelos variam de 98 pb a 316 pb e as diferenças entre os alelos de um mesmo loco foi de dois a 29 pares de bases. A Figura 1 apresenta um gel de poliacrilamida demonstrando o padrão de amplificação do primer CIR 203 e os novos alelos

Tabela 1. Tamanho, em pares de bases, dos alelos amplificados no conjunto de genótipos de *G. mustelinum* e dos alelos descritos na base de dados CDM, segundo o primer.

PRIMER	Loco	CMD	Embrapa
CIR 212	1	156,38	154,76
		161,86	158,36
CIR 222	1	273,80	274,86
	2	284,09	284,60
CIR 203	1	237,13	238,27
			243,48
			267,35
CIR 039	1	172,58	162,52
			164,69
			170,19
	2	211,52	205,14
		209,53	
CIR 043	1	276,95	276,88
		278,69	282,33
CIR 048	1	125,43	127,37
	2	132,35	134,17
CIR 049	1	224,75	230,50
		230,27	234,32
			236,37
		238,46	
CIR 060	1	159,30	164,36
			166,56
CIR 063	1	150,33	158,64
CIR 148	1	146,40	142,80
			146,74
CIR 249	1	190,21	192,56
CIR 239	1	150,93	162,52
		162,82	164,89
CIR 017	1	117,64	
	2	127,41	127,43

Continua...

Tabela 1. Continuação...

PRIMER	Loco	CMD	Embrapa
CIR 020	1		164,85
CIR 030	1	275,78	280,74
CIR 034	1		144,06
CIR 038	1	115,66	110,00
CIR 122	1	134,89	134,20
			136,53
			138,03
CIR 133	1	104,38	
	2	121,46	111,51
CIR 141	1	173,02	170,98
			173,08
	2		113,18
			115,50
CIR 218	1	167,06	178,94
		179,70	182,56
		186,00	186,69
CIR 158	1	122,39	125,74
BNL 1434	1	239,64	239,00
			241,05
			255,13
BNL 3479	1	242,31	242,13
BNL 1705	1	166,98	166,04
			163,61
BNL 3994	1	89,71	
	2	100,08	100,26
BNL 1414	1	124,06	124,39
BNL 3084	1	157,71	155,28
			157,18
BNL 3255	1	219,80	220,29
		316,35	
BNL 840	1	157,31	148,38
			152,33
			156,44

Continua...

Tabela 1. Continuação...

PRIMER	Loco	CMD	Embrapa
BNL 3449	1	135,04	135,38
	2	155,91	155,49
			159,34
BNL 3599	1	188,43	188,64
			190,70
			194,66
BNL 3816	1	188,47	186,36
			188,89
			200,73
BNL 448	1	202,56	202,20
	2	220,61	220,16
BNL 3558	1	206,63	206,70
			208,88
BNL 1721	1	170,90	167,52
			169,76
BNL 2544	1	215,98	215,11
BNL 3895	1	179,09	171,66
	2	190,53	181,13
			183,27
BNL 3034	1	154,25	151,02
			153,76
BNL 3646	1	147,46	147,59
BNL 1059	1	220,31	220,40
BNL 3649	1	189,85	189,03
BNL 3261	1	216,61	193,92
			208,47
			216,49
BNL3556	1	128,85	127,95
BNL 2634	1	192,56	192,95
		197,37	198,43
	2	262,68	261,67
			267,73

Continua...

Tabela 1. Continuação...

PRIMER	Loco	CMD	Embrapa
BNL 1672	1	98,81	98,53
			100,79
			108,67
BNL 3034	1	154,25	154,11
BNL 1665	1	171,13	171,00
			169,20
BNL 3902	1	173,98	174,55
			176,75
BNL 3835	1	196,78	180,42
			182,14
			187,97
			193,87
BNL 2570	1	233,55	233,15
BNL 1030	1	231,48	231,62
BNL 3147	1	158,38	159,17
	2	180,01	179,28

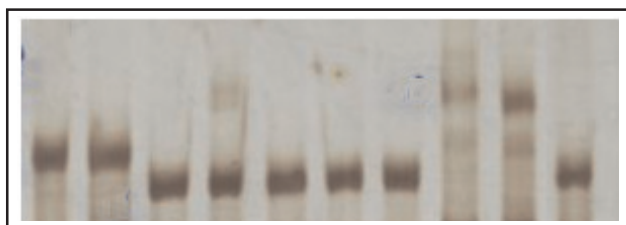


Fig. 1. Gel de poliácridamida demonstrando o padrão de amplificação do primer CIR 203 e os novos alelos encontrados em *Gossypium mustelinum*.

encontrados em *Gossypium mustelinum*. Os primers CIR 222, 039, 048 e 141, e BNL 3147, 2634, 3449, 448, 3895 amplificaram mais de um loco. O número médio de alelos por loco foi 1.77, com valor máximo de quatro e mínimo de um alelo. Os primers que amplificaram o maior número de alelos foram o CIR 049 e o BNL 3835, que geraram quatro alelos.

Os alelos amplificados foram comparados aos descritos no Cotton Microsatellite Database - CDM (BLENDA et al., 2006), um banco de dados de marcadores SSR desenvolvidos para algodão, utilizados para analisar as diferentes espécies cultivadas e exóticas do gênero. Quarenta alelos não

descritos no CMD para *G. mustelinum* foram encontrados. Este elevado valor foi atribuído ao maior número de indivíduos avaliados neste estudo. O primer CIR 020, que não foi incluído no painel apresentado no CMD, caracterizou apenas um alelo de 165pb no presente estudo. Do mesmo modo, o primer CIR 034 não apresentou resultados anteriores para *G. mustelinum*, mas foram encontrados 141pb no presente estudo.

Apesar de *G. mustelinum* não apresentar características agrônômicas e de fibras adequadas, possui genes que podem contribuir para a melhoria dos cultivares de algodoeiro herbáceo. Não é possível usar diretamente os acessos de *G. mustelinum* como genitores de populações de melhoramento, pois seus descendentes apresentariam características indesejáveis em cultivares. É necessária uma etapa intermediária, em que os genes de interesse sejam transferidos para genótipos sem graves defeitos. Este pré-melhoramento pode ser realizado de modo mais eficiente caso seja possível acompanhar a segregação dos genes que controlam as características para as quais se deseja aumentar a variabilidade de *G. mustelinum*. O acompanhamento pode ser realizado, caso se identifique um marcador molecular que co-segredue com genes de interesse agrônômico. Para isso é necessário que um mapa genético baseado em marcadores moleculares entre *G. mustelinum* e *G. hirsutum r. latifolium* seja construído ou que estudos de associação sejam realizados. Como os alelos encontrados em *G. mustelinum* foram, quase sempre, diferentes dos relatados para *G. hirsutum r. latifolium* no CMD, marcadores SSR devem permitir que mapas genéticos saturados sejam construídos com relativa facilidade e que associações sejam encontradas entre marcadores e genes de interesse.

Os marcadores também podem ser usados para quantificar a diversidade genética da espécie, o que define o número de acessos a serem mantidos nos bancos de germoplasma e o modo como proceder nas multiplicações de sementes quando as taxas de germinação atingirem o limite crítico. Além disso, eles podem ser empregados para determinar como a diversidade está estruturada entre e dentro das populações naturais. Esta informação é importante, pois permite determinar o número de populações

que devem ser preservadas e identificar quais devem ser priorizadas. A presença de alelos diferentes entre os acessos de *G. mustelinum* em 58% dos locos qualifica os marcadores SSR para estudos de diversidade na espécie. Os marcadores que apresentaram o maior número de alelos devem ser preferidos para realizar o estudo das populações, pois permitirão identificar com maior precisão as diferenças entre e dentro das populações.

Conclusão

Os marcadores SSR são adequados para realizar estudos genéticos em que acessos de *Gossypium mustelinum* estiverem envolvidos.

Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, V. C. **Caracterização genética e in situ de *Gossypium barbadense* na região norte do Brasil.** 2007. 67 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.
- BARROSO, P. A. V.; FREIRE, E. C. Fluxo gênico em algodão no Brasil. In: PIRES, C. S. S.; FONTES, E. M. G.; SUJII, E. R. (Ed.). **Impacto ecológico de plantas geneticamente modificadas: o algodão resistente a insetos como estudo de caso.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: CNPq, 2003. p. 163-193.
- BARROSO, P. A. V.; FREIRE, E. C.; AMARAL, J. A. B. do; SILVA, M. T. **Zonas de exclusão de algodoeiros transgênicos para preservação de espécies de *Gossypium* nativas ou naturalizadas.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. 7 p. (Embrapa Algodão, Comunicado técnico, 242).
- BARROSO, P. A. V.; BATISTA, C. E. A.; HOFFMANN, L. V.; CIAMPI, A. Y. Genetic structure of and in situ conservation of natural populations of *Gossypium mustelinum*. In: RESEARCH CONFERENCE OF INTERNATIONAL COTTON GENOME INITIATIVE, 1., 2006, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF, 2006. Disponível em: <<http://icgi.tamu.edu/meeting/2006/p2.html>>. Acesso em: set. 2007.
- BERTINI, C. H. C. M.; SCHUSTER, I.; SEDIYAMA, T.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. Characterization and genetic diversity analysis of cotton using microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, p.321-329, 2006.
- BLENDA, A.; SCHEFFLER, J.; SCHEFFLER, B.; PALMER, M.; LACAPE, J. M.; YU, J. Z.; JESUDURAI, C.; JUNG, S.; MUTHUKUMAR, S.; YELLAMBALASE, P.; FICKLIN, S.; STATON, M.; ESHELMAN, R.; ULLOA, M.; SAHA, S.; BURR, B.; LIU, S.; ZHANG, T.; FANG, D.; PEPPER, A.; KUMPATLA, S.; JACOBS, J.; TOMKINS, J.; CANTRELL, R.; MAIN, D. CMD: A Cotton Microsatellite database resource for gossypium genomics. **BMC Genomics**. v. 7, p. 132, 2006.
- 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**. Athens, v. 19, p. 1-8, 2001.
- LACAPE, J. M.; DESSAUW, D.; RAJAB, M. Microsatellite diversity in tetraploid *Gossypium* germplasm: assembling a highly informative genotyping set of cotton SSRs. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 19, p. 45-58, 2007.
- NGUYEN, T. B.; GIBAND, M.; BROTTIER, P.; RISTERUCCI, A. M.; LACAPE, M. Wide coverage of the tetraploid cotton genome using newly developed microsatellite markers. **Theoretical and applied genetics**, Berlin, v. 109, p. 167-175, 2004.
- SHUSTER, I.; QUEIROZ, V. T.; TEIXEIRA, A. I.; BARROSO, E. G.; MOREIRA, M. A. Determinação da pureza varietal de sementes de soja com o auxílio de marcadores moleculares microsatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, p. 247-253, 2004.

Comunicado Técnico, 345

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Algodão
Rua Osvaldo Cruz, 1143 Centenário, CP 174
58107-720 Campina Grande, PB
Fone: (83) 3315 4300 Fax: (83) 3315 4367
e-mail: sac@cnpa.embrapa.br
1ª Edição
Tiragem: 500

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**



Comitê de Publicações

Presidente: Nair Helena Castro Arriel
Secretária Executiva: Nivia Marta Soares Gomes
Membros: Demóstenes Marcos Pedroza de Azevêdo
Everaldo Paulo de Medeiros
Fábio Aquino de Albuquerque
Francisco das Chagas Vidal Neto
João Luiz da Silva Filho
José Wellington dos Santos
Luiz Paulo de Carvalho
Nelson Dias Suassuna

Expedientes: Supervisor Editorial: Nivia Marta Soares Gomes
Revisão de Texto: Nisia Luciano Leão
Tratamento das ilustrações: Oriel Santana Barbosa
Editoração Eletrônica: Oriel Santana Barbosa