



## ALELOS DE LOCOS SSR ASSOCIADOS A GENES DE RESISTÊNCIA A DOENÇAS EM *GOSSYPIUM HIRSUTUM* L. EM *GOSSYPIUM MUSTELINUM* MIERS

Julita Maria Frota Chagas Carvalho<sup>1</sup>; Paulo Augusto Vianna Barroso<sup>2</sup>; Dione Márcia de Sousa<sup>3</sup>; Ákyla Maria Martins Alves<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Dra. Enga. Agro. Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143 - Centenário - CEP 58107-720, Campina Grande, PB. E-mail: [julita@cnpa.embrapa.br](mailto:julita@cnpa.embrapa.br). <sup>2</sup> Dr. Eng. Agro. Embrapa Algodão; <sup>3</sup> Assistente da Embrapa Algodão; <sup>4</sup> Estagiária da Embrapa Algodão, graduanda do curso de Ciências Biológicas da UEPB.

**RESUMO** - Objetivou-se determinar quais alelos ocupam locos microssatélite associados à resistência a doenças em quatro populações naturais de *Gossypium mustelinum* do semiárido da caatinga da Bahia. As quatro populações totalizam uma amostra de 202 plantas, acrescida de seis plantas de *G. hirsutum* e sete de *G. barbadense* coletadas na região. Para genotipagem usou-se quatro pares de primers de SSR sabidamente associado a genes de resistência em *G. hirsutum*: DC20027 - Doença Azul; BNL3279 – nematoide reniforme; CIR246 – mancha angular; CIR316M – nematoide da galha. Três dos quatro pares de primers SSR usados apresentaram apenas alelos únicos para *G. mustelinum*. Esses três primers, DC20027, BNL3279 e CIR316M, podem ser usados para monitorar introgressões de algodoeiros herbáceos em populações naturais de *G. mustelinum*.

**Palavras-chave:** *G. mustelinum*; marcadores SSR; conservação genética

### INTRODUÇÃO

*G. mustelinum* é a única espécie de algodoeiro nativa do Brasil e as populações naturais são restritas à região Nordeste. Ela tem sido tema de trabalhos visando sua conservação, tendo sido identificados alguns riscos associados a sua manutenção *in situ*. No passado recente, a possibilidade de lavouras de algodoeiro herbáceo serem cultivadas na proximidade de populações da espécie selvagem foi considerada remota. Porém, com o aprofundamento do conhecimento, verificou-se que a região de ocorrência é mais ampla do que se imaginava e que a simpatria, hoje inexistente, pode ser possível. O cultivo de lavouras nas proximidades de populações naturais pode resultar em fluxo gênico da espécie cultivada para a selvagem e introduzir ou aumentar a incidência de doenças e pragas. Os eventuais prejuízos à conservação *in situ* dependerão da intensidade com que os cruzamentos ocorrerão e da adaptabilidade dos híbridos e seus descendentes no ambiente natural. Também será função do nível de resistência de *G. mustelinum* às doenças comuns em lavouras do algodoeiro cultivado. Em caso de elevada susceptibilidade, o inóculo oriundo de lavouras comerciais pode ocasionar danos às populações naturais. Portanto, conhecer o comportamento de *G. mustelinum* frente

às principais doenças que acometem o algodoeiro herbáceo auxiliará na realização de predições importantes para o planejamento da conservação in situ de populações simpátricas a lavouras.

Publicações recentes descreveram alelos de locos microssatélites associados a genes de resistência a doenças que acometem o algodoeiro no Brasil (DIGHE et al., 2009; FANG et al., 2010; SHEN et al., 2006; XIAO et al., 2010). Uma parte desses genes é proveniente de espécies diplóides, tendo sido introgrididos para os tetraplóides via formação de híbridos interespecíficos artificiais usados como ponte. Uma proporção relativamente alta dos cultivares possui tanto os genes de resistência quanto aos alelos marcadores descritos. A caracterização de *G. mustelinum* quanto aos alelos microssatélites pode ser um indicativo da presença ou ausência dos genes de resistência na espécie silvestre. Caso sejam os mesmos, os estudos devem ser direcionados para verificar se os genes de resistência estão de fato presentes. Em caso negativo, os alelos ligados aos genes de resistência podem ser usados para identificar indivíduos dentro das populações naturais que descendem de cruzamento entre *G. mustelinum* e algodoeiros herbáceos.

O objetivo com este trabalho foi verificar a presença de alelos de loco SSR associados a genes de resistência a doença em *G. hirsutum* em quatro populações naturais de *G. mustelinum* do Centro Sul da Bahia.

## METODOLOGIA

Duzentas e duas plantas de *G. mustelinum*, seis de *G. hirsutum* e sete de *G. barbadense* coletadas na região de Jequié e Vitória da Conquista foram genotipadas com quatro pares de primers SSRs selecionados por estarem fisicamente ligados a genes que conferem resistência a doenças importantes no algodoeiro: DC20027, ligado ao gene *Rghv1* que condiciona resistência a doença azul (FANG et al., 2010); BNL3279, ligado ao gene *Ren* associado a resistência ao nematoide reniforme (DIGHE et al., 2009), CIR246 ligado ao gene *B12*, de resistência à mancha angular (XIAO et al., 2010) e CIR316M, associado um loco que controla a resistência a nematoide das galhas (SHEN et al., 2006). Três variedades de algodão herbáceo foram usadas como controles de resistência para doença azul e bacteriose (Delta Opal), reniforme (Loren I) e nematoide (M315).

A reação PCR foi conduzida em sistema tetraplex em volume final de 5 µL, contendo 5,0 ng de DNA, 2,5 µL de master mix (2x Qiagen multiplex PCR), 0,5 de Q-solution, 0,2 µM de cada par de primer (forward e reverse) e qsp água livre de RNAase. A amplificação foi realizada usando as seguintes condições: denaturação inicial a 95 °C por 15 min; 34 ciclos de denaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1,5 min e extensão a 72°C por 1 min; uma extensão final a 60°C por 30 min.. A

reação foram diluídos na proporção de 1:2 com água ultrapura. Em seguida, preparou-se mix contendo 0,5 µL da diluição, 0,08 µL de Rox500 e formamida qsp 94,2%. Ele foi denaturado a 95°C por 5 min, submetido a eletroforese de capilar em sequenciador automático ABI 3100 e o tamanho dos fragmentos amplificados estimado com o programa Genemapper versão 3.5.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No loco DC20027, um fragmento de 192 pb foi amplificado em todos os acessos e cultivares. Esse fragmento havia sido descrito como monomórfico por Fang et al. (2010) e observado em todos os genótipos avaliados com esse primer no laboratório de biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão (dados não publicados). No loco associado à resistência à doença azul, o alelo presente nos acessos de *G. barbadense*, 200 pb, foi o mesmo encontrado nos genótipos de algodoeiro herbáceo susceptíveis à doença azul. Um indivíduo da população Jacaré apresentou alelo de 200 pb, provavelmente introgridido de *G. barbadense* que cresce próximo às plantas da espécie silvestre. Em *G. mustelinum*, esse loco apresentou dois alelos ainda não observados em *G. hirsutum*, com tamanho de 196 pb e 198 pb. O alelo de 196 pb apareceu em maior frequência em todas as populações, estando fixado em Jacaré e com a frequência mais baixa em Riacho Riachão (Tabela 1). Considerando a susceptibilidade à doença azul exibida por alguns indivíduos durante ensaio para a multiplicação de sementes, ambos os alelos marcadores não estão associados à resistência a essa virose.

O primer BNL3279 amplificou dois locos, um loco com o alelo de 114 pb presente em todos os indivíduos e outro segregando para os alelos de SSR 120 e 122. O primeiro loco provavelmente corresponde a um alelo do loco SSR associado ao gene de resistência a reniforme, *Ren*, introgridido de *G. longicalix*. Essa inferência foi feita devido ao tamanho similar entre o alelo de *G. mustelinum* com o alelo presente em linhagens contendo a introgressão (116 pb). No outro loco, também com tamanho similar ao observado em diversos acessos de algodoeiro herbáceo, o alelo de 120 pb estava fixado em três das quatro populações estudadas. Na população Jacaré, o alelo mais frequente foi o de 122 pb presente em homozigose em quase todos os indivíduos. Além dos alelos de 120 e 122 pb, um indivíduo dessa população apresentou o mesmo alelo de 106 pb observado em *G. barbadense*.

Da mesma maneira que para os primers anteriores, um novo alelo de 206 pb foi amplificado em *G. mustelinum* usando Cir316M (Tabela 1). Esse alelo pertence ao mesmo loco descrito por Wang et al. (2006) como ligado a QTL que confere maior tolerância a nematoide das galhas. Aparentemente esse alelo é exclusivo de *G. mustelinum*, não existindo entre cultivares de algodoeiro herbáceo. Esse alelo estava presente em homozigose em todos os indivíduos de todas as populações, à exceção de um indivíduo da população Jacaré, que apresentou um alelo de 193 pb. Esse primer também

amplificou um fragmento de 201 pb, presente em todos os acessos incluídos nesse estudo e em todos os materiais já amplificados no laboratório de Biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão.

O único loco em que um alelo presente em algodoeiros herbáceos, de 156 pb e descrito como ligado à susceptibilidade à mancha angular, também estava presente em elevada frequência foi em Cir246. Além desse alelo, outro de 154 pb também foi verificado, aparentemente exclusivo de *G. mustelinum*.

A amplificação de DNA genômico de *G. mustelinum* forneceu padrões de fragmentos similares aos verificados em algodoeiros herbáceos. Porém, os alelos presentes foram diferentes. Isso indica os a espécie também não deve conter os mesmos alelos de resistência a doenças presentes em algodoeiros herbáceos ou nele introgrididos descritos como ligados aos marcadores SSR estudados. Isso não necessariamente representa que *G. mustelinum* seja susceptível a qualquer uma dessas doenças. Outros alelos que conferem resistência a doenças pode estar presente ou a resistência ser controlada por outros locos.

À exceção de Cir246, a maior utilidade desses locos no estudo de *G. mustelinum* será no acompanhamento de introgressões de algodoeiros herbáceos. Isso decorre dos alelos presentes nos genótipos cultivados serem diferentes dos existentes em *G. mustelinum*. A presença dos alelos de algodoeiro herbáceo será um sinal inequívoco de que houve fluxo gênico entre as duas espécies, sendo a intensidade proporcional a frequência dos alelos da espécie cultivada. Isso é particularmente importante para o monitoramento das condições *in situ* das populações, quanto para a estabelecer padrão de qualidade para a manutenção das sementes em bancos de germoplasma.

A ausência de alelos similares de algodoeiros herbáceos em indivíduos de populações naturais de *G. mustelinum* confirma o que havia sido observado a campo: não há qualquer indício de que as populações de *G. mustelinum* contenham introgressões recentes ou antigas de algodoeiros herbáceos. A partir disso pode-se inferir que apesar da ausência de medidas específicas para o controle de fluxo gênico nessas populações de *G. mustelinum* da região de Jequié, a ausência de simpatria com lavouras devido a questões de clima tem sido suficiente a manutenção da identidade genética da espécie silvestre.

## CONCLUSÃO

Os primers DC20027, BNL3279 e CIR316M podem ser usados para o monitoramento de introgressões de algodoeiros herbáceos em populações naturais de *G. mustelinum*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M. F. **Caracterização in situ e estrutura genética de populações de *Gossypium mustelinum* Miers ex Watt**. 2009. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

DArT - Diversity Arrays Technology. **Protocolo de extração de DNA de plantas**. Disponível em: [http://www.DiversityArrays.com/pub/DArT\\_DNA\\_isolation.pdf](http://www.DiversityArrays.com/pub/DArT_DNA_isolation.pdf). Acesso em: 10 jan. 2009.

DIGHE, N. D.; ROBINSON, A. F.; BELL, A. A.; MENZ, M. A.; CANTRELL, R. G. STELLY, D. M. Linkage Mapping of Resistance to Reniform Nematode in Cotton following Introgression from *Gossypium longicalyx* (Hutch. & Lee). **Crop Science**, v. 49, p. 1151-1164, 2009.

FANG, D. D.; XIAO, J.; CANCI, P. C.; CANTRELL, R. G. A new SNP haplotype associated with blue disease resistance gene in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, n. 120, p. 943-953, 2010.

SHEN, X.; BECELAERE, G. V.; KUMAR, P.; DAVIS, R. F.; MAY, O. L.; CHEE, P. QTL mapping for resistance to root-knot nematodes in the M-120 RNR Upland cotton line (*Gossypium hirsutum* L.) of the Auburn 623 RNR source. **Theoretical and Applied Genetics**, n. 113, p.1539-1549, 2006.

XIAO, J.; FANG, D. D.; BHATTI, M.; HENDRIX, B.; CANTRELL, R. A SNP haplotype associated with a gene resistant to *Xanthomonas axonopodis* pv. *Malvacearum* in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Molecular Breeding**, n. 25, p. 593-602, 2010.

**Tabela 1.** Frequência alélica de SSR amplificado para as quatro populações de *G. mustelinum* por loco

Loco	Alelo	População de <i>G. mustelinum</i>				Cultivares	
		Jacaré	Quixaba	Serra Azul	Riacho Riachão	DeltaOpal	Loren
DC20027	182	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	196	0,880	1,000	0,984	0,588	-	-
	198	0,080	-	0,016	0,412	-	-
	200	0,040	-	-	-	-	1,000
	202	-	-	-	-	1,000	-
BNL3279	114	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
	116	-	-	-	-	-	1,000
	120	0,040	1,000	1,000	1,000	-	-
	122	0,940	-	-	-	-	-
	124	-	-	-	-	1,000	1,000
CIR246	146	-	-	-	-	1,000	1,000
	154	0,020	0,976	1,000	0,440	-	-
	156	0,980	0,024	-	0,560	-	-
CIR316M	193	0,021	-	-	-	-	-
	198	-	-	-	-	1,000	1,000
	201	-	-	-	-	1,000	1,000
	206	0,979	1,000	1,000	1,000	-	-
	210	-	-	-	-	-	-