



CONSTRUÇÃO DE UM MAPA GENÉTICO DE MACIEIRA DE ALTA DENSIDADE UTILIZANDO MARCADORES FUNCIONAIS TIPO SNP

CAROLINA TESSELE¹; LUÍS FERNANDO REVERS²; SÉRGIO AMORIM DE
ALENCAR³, GEORGIOS JOANNIS PAPPAS Jr.⁴ E CARLA ANDRÉA DELATORRE⁵

INTRODUÇÃO

Os mapas genéticos, além de possibilitarem o estudo e a localização dos QTLs e a determinação de seus efeitos, permitem a pesquisa em diferentes áreas, tais como, o conhecimento da estrutura do genoma, a clonagem de blocos de genes de interesse e o estudo de sintenia em espécies relacionadas (LIU, 1998). Os marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) são baseados na detecção de polimorfismos decorrentes da alteração de uma única base no genoma – A, T, C ou G. O sequenciamento do genoma heterozigoto da cultivar Golden Delicious de macieira resultou na descoberta de milhares de polimorfismos de DNA, cerca de 4,4 SNPs por quilobases (kb) (VELASCO et al., 2010). A possibilidade de explorar este tipo de polimorfismo em ferramentas de genotipagem massiva de alta densidade permitirá avanços significativos na consolidação do uso de marcadores moleculares para planejamento e cruzamentos, seleção assistida e na identificação de genes e QTLs associados a fenótipos de interesse agrônômico. Como forma de alicerçar o desenvolvimento de ferramentas aplicadas ao melhoramento da macieira, o objetivo deste trabalho foi construir um mapa genético de ligação em população clonal F₁ baseada em uma estratégia de genotipagem massal com marcadores SNP funcionais.

MATERIAL E MÉTODOS

Uma população F₁, originada do cruzamento entre ‘M13/91’ e ‘Fred Hough,’ desenvolvida pelo programa de melhoramento da Epagri - Estação Experimental de Caçador (SC) foi utilizada.

O DNA genômico dos genitores e dos 192 genótipos da população foram extraídos de folhas jovens, segundo metodologia modificada descrita por Lefort e Douglas (1999). A quantificação do DNA foi determinada em espectrofotômetro (GeneQuant *pro*, Amersham Biosciences®). A qualidade foi avaliada pelas razões A₂₆₀/ A_{230nm} e A₂₆₀/ A_{280nm} e em gel de agarose 0,8 % contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL). A genotipagem da população com os marcadores tipo SNP foi

¹Eng. Agr., estudante de pós-graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-RS, e-mail: carolina.tessele@ufrgs.br

² Pesq. A da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-RS, e-mail: luis@cnpuv.embrapa.br

³Bols. de DTII do CNPq CnPQ-CENAREN-DF, e-mail: sergiodealencar@gmail.com

⁴Pesq. A do Centro nacional de recursos genéticos e biotecnologia – CENARGEN-DF

⁵Eng. Agr., Prof. Adjunta, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-RS, e-mail: cadtorre@ufrgs.br

realizada utilizando-se o chip RosBREED_Apple_10k fabricado pela Illumina, Inc (San Diego, Califórnia). O serviço de genotipagem foi realizado pelo Laboratório de Análises Genéticas e Genotipagem, no Centro Interdisciplinar de Pesquisas em Biotecnologia (ICBR) da Universidade da Flórida, utilizando o protocolo descrito por Fan et al. (2006). A validação dos SNPs foi realizada pelo emprego do algoritmo desenvolvido para a ferramenta R por Alencar e Pappas (comunicação pessoal) e os escores obtidos foram utilizados para a seleção final dos marcadores. Os escores variaram de 0 a 1, sendo que marcadores com pontuação $\geq 0,6$ são admitidos para uso em mapeamento.

O mapa genético foi construído utilizando a estratégia do duplo-pseudocruzamento teste, conforme descrito por Grattapaglia e Sederoff (1994), utilizando-se o software JoinMAP® 4 (VAN OOIJEN, 2006). Os dados dos genitores foram mantidos em separado. Para verificar a segregação mendeliana de cada loco, foi aplicado o teste de ajustamento de segregação (teste de aderência qui-quadrado (χ^2)), sendo estabelecido um nível de decisão: $\chi^2 \leq 15,00$. Os locos que apresentaram um valor até o limite do χ^2 calculado de 15,00 foram incluídos nas análises, pois nem sempre as taxas de recombinação são as mesmas em todo o genoma. Marcas segregando 1:2:1 (tipo hk x hk) foram incluídas na geração dos mapas para ambos os genitores, pois permitem a identificação dos cromossomos homólogos e a possibilidade de integração dos mapas (MALIEPAARD et al., 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No mapa molecular construído para o genitor paterno ‘M13/91’, 66,45% dos marcadores (tipo nn x np e hk x hk) foram incluídos. O mapa gerado apresentou 17 grupos de ligação (GL) com 17 a 69 marcadores por GL, faixa de tamanho de 41 a 95cM, com média de 63cM em um mapa com cobertura total de 1066cM. A distância média entre marcadores por grupo de ligação foi de 1,7cM. O grupo com o maior número de marcadores foi GL 2. Para alcançar esses resultados foram utilizados 1070 marcadores SNPs na geração do mapa, sendo que 711 foram distribuídos em grupos de ligação, 207 não foram ligados a nenhum grupo e 152 não se posicionaram (Tabela 1).

O mapa molecular para genitor materno ‘Fred Hough’ utilizou 59,08% do total dos marcadores (lm x ll e hk x hk). O mapa construído resultou em 17 grupos de ligação (Tabela 1), apresentando de 20 a 69 marcadores, com variação de tamanho de 49 a 103cM, média de 80cM e com cobertura total de 1361cM. A distância média entre marcadores por grupo de ligação foi de 2,0cM. O grupo de ligação 2 apresentou o maior número de marcadores. Na construção desse mapa utilizou-se 1234 marcadores SNPs, sendo que 729 foram distribuídos em grupos de ligação, 254 não foram ligados a nenhum grupo e 251 não se posicionaram (Tabela 1).

O maior comprimento de regiões livres de marcadores, os chamados *gaps*, foi de 40,8 cM (GL 5) para o genitor ‘M13/ 91, enquanto que, para o genitor ‘Fred Hough’, 11 regiões de *gaps* foram identificadas, variando entre 10 e 20 cM (Tabela 1).

Em macieira, encontra-se um número significativo de mapas genéticos construídos a partir de diferentes cultivares e que apresentam tamanhos superiores a 1000 cM. Os mapas saturados com marcadores moleculares, tipo AFLP, RAPD, SSR e SCAR, para as cultivares Fiesta x Discovery, apresentaram tamanhos de 1144 cM e 1455 cM, respectivamente (LIEBHARD et al., 2003). Mapas para ‘Telamon’ x ‘Braeburn’ apresentaram comprimentos de 1039,3 cM e 1245,1 cM, respectivamente (KENI e KEULEMANS, 2005). Nos mapas gerados para ‘Ralls Janet’ x ‘Delicious’, os comprimentos foram de 1082 cM e 1031 cM, respectivamente (IGARASHI et al., 2008). Van Dyk et al. (2010) geraram mapas para duas populações distintas – ‘Golden Delicious’ x ‘Anna’, com comprimentos de 1124,5 cM e 1292,6 cM, respectivamente, e ‘Sharpe’s Early’ x ‘Anna’, com tamanhos de 1012,9 cM e 1050,6 cM, respectivamente. Os mapas consenso gerados por Celton et al. (2011) para as cultivares Starkrimson x Granny Smith apresentaram comprimento de 1027 cM, enquanto que para o cruzamento das cultivares X3263 x Belrène, o comprimento foi de 1068 cM. Com base nos tamanhos desses mapas, pode-se concluir que o tamanho observado para a população em estudo assemelha-se aos encontrados na literatura. Foi observado o número de 17 cromossomos para macieira, corroborando com os resultados relatados por Maliepaard et al. (1998), com os mapas construídos na última década para macieira e com os resultados do sequenciamento do genoma da macieira (VELASCO et al., 2010)

Tabela 1 - Características dos mapas genéticos para os genitores ‘M13/ 91’ x ‘Fred Hough’ construídos com marcadores SNPs utilizando a estratégia do duplo-pseudocruzamento teste.

Características	M13 /91	Fred Hough
Número de marcadores analisados	1070	1234
Número de marcadores mapeados	711	729
Número de marcadores não agrupados*	207	254
Número de marcadores não posicionados**	152	251
Número de grupos de ligação (GL)	17	17
Média de marcadores/GL	42	43
Número de marcadores/amplitude GL	17-69	20-69
Comprimento total (cM)	1066	1361
Comprimento médio do GL (cM)	63	80
Comprimento/amplitude GL (cM)	41-95	49-103
Distância média mapeada entre locos (cM)	1,7	2,0
Número de lacunas entre 10 e 20 cM	7	11
Número de lacunas > 20 cM	1	0

*Não foram atribuídos a nenhum GL. **Não utilizados por apresentarem conflitos de localização ou ligação insuficiente com outros locos.

A disponibilidade das sequências do genoma da macieira em associação a um mapa de ligação de alta densidade permite seu uso como uma poderosa ferramenta para o desenvolvimento de

mecanismos para seleção assistida, pois 90,2% dos genes possuem sua localização identificada nos cromossomos. Portanto, a escolha da ferramenta baseada no chip RosBREED_Apple_10k (*Illumina Infinium*) foi justificável para a estratégia de mapeamento realizada neste estudo. Os resultados aqui obtidos comprovaram seu potencial de uso, já que o tamanho do mapa, o comprimento dos GL e a densidade de marcadores são similares aos mapas construídos com marcadores tipo AFLP, SSR, SCAR e RAPD. É, igualmente importante, o fato dos marcadores moleculares que compõem o chip RosBREED_Apple_10k terem sido desenvolvidos a partir de sequências ESTs homólogas à genes de interesse, possibilitaram a construção dos mapas genéticos com marcadores funcionais completamente informativos.

CONCLUSÕES

Utilizando exclusivamente marcadores funcionais tipos SNP, foi possível construir mapas genéticos dos genitores ‘M13/91’ e ‘Fred Hough’ com 711 e 729 marcadores, respectivamente. Dezesete grupos de ligação foram obtidos para cada genitor, cobrindo 1066cM e 1361cM para M13/91 e Fred Hough, respectivamente. As posições dos marcadores mapeados foram consistentes com as sequências genômicas publicadas da macieira.

REFERÊNCIAS

- CELTON, J. M. et al. Deciphering the genetic determinism of bud phenology in apple progenies: a new insight into chilling and heat requirement effects of flowering dates and positional candidate genes. **New Phytologist**, Cambridge, v. 1, n. 192, p. 378–392, 2011.
- FAN, J.B. et al. Illumina universal bead arrays. **Methods in enzymology**, United States, v. 1, n. 410, p. 57-73, 2006.
- GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, Berlin, v. 137. p. 1121–1137, 1994.
- KENIS, K.; KEULEMANS, J. Genetic linkage maps of two apple cultivars (*Malus X domestica* Borkh.) based on AFLP and microsatellite markers. **Molecular Breeding**, Netherlands v. 1, n. 15, p. 205–219, 2005.
- LEFORT, F.; DOUGLAS, G.C. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. **Annals of Forest Science**, Versailles, v. 56, p. 259-263, 1999.
- LIEBHARD, R. et al. Creating a saturated reference map for the apple (*Malus X domestica* Borkh). **Theoretical and Applied Genetics**, Nova Iorque, v.106, n. 8, p. 1497-1508, 2003.
- LIU, B. H. **Statistical genomics. Linkage, Mapping and QTL Analysis**. CRC Press, Boca Raton, Florida, 605 p., 1998.

- MALIEPAARD, C. et al. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. **Theor Appl Genet**, v. 1, n. 97, p. 60—73, 1998.
- VAN DYK, M. M. et al. Identification of a major QTL for time of initial vegetative budbreak in apple (*Malus x domestica* Korkh.). **Tree Genetics & Genomes**. Germany, v. 1, n. 6, p. 489–502, 2010.
- VAN OOIJEN, J.W., JoinMap® 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations, **Kyazma B.V.**, Wageningen, Netherlands, 2006.
- VELASCO; et al., The genome of the domesticated apple (*Malus X domestica* Borkh.). **Nature Genetics Advance**, v. 42, n. 10, 2010.