MICROSSATELITES NA ANÁLISE DE POLIMORFISMO GENETICO NO BANCO DE GERMOPLASMA DE MACIEIRA (*Malus x domestica* Borkh.)

Diego Vivarelli[1], Camila Junkes[2], Gustavo Klabunde[3], Adriana Cibele de Mesquita Dantas[4], José Itamar Boneti[5]

[1]Bolsista Iniciação Tecnológica –CNPq, Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, UERGS, Bento Gonçalves, RS; [2] Bolsista Iniciação Tecnológica Industrial do CNPq - Nível A, UERGS, Bento Gonçalves, RS; [3]Doutorando em Recursos Genéticos Vegetais, Centro de Ciências Agrárias, UFSC, Florianópolis, SC, [4] Prof. Ajunta em Biotecnologia, UERGS, Bento Gonçalves, RS; [5]Pesqusiador, Estação Experimental da Epagri, São Joaquim, SC.

Introdução

O Banco de germoplasma de *Malus* spp. apresentam diversas fontes de material genético Usados como matéria prima para os programas de melhoramento genético, de domesticação De novas espécies. Isto implica em dispor de coleções de uma ampla variabilidade genética de espécies, tanto cultivadas como silvestres pertencentes a um mesmo acervo genético. A utilização de marcadores microssatélites (SRRs) permite acessar diferenças entre genótipos que não podem ser Identificadas fenotípicamente, pela análise de DNA repetitivo é possível detectar polimorfismo mesmo quando é relativamente pequena. Os microssatelites são separados de acordo com diferenças de tamanho por eletroforese e a variação do segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente de um mesmo loco, ou seja, cada microssatélite constitui um loco genético altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo que, combinado com a especificidade e rapidez da tecnologia de PCR (Gianfranceschi et al. 1998; Liebhard et al., 2002).

OBJETIVOS

Avaliar a diversidade genética do Banco Ativo de Germoplasma da EPAGRI-Caçador a partir de marcadores moleculares SSR, a fim de determinar O número de alelos amplificados envolvidos em seu mecanismo de resistência, através da genotipagem em sequenciador automático.

Material e Métodos

MATERIAL VEGETAL

O material genético utilizado nos experimentos de análise de diversidade genética do Banco Ativo de Germoplasma da EPAGRI - Caçador foi extraído a partir de aproximadamente 270 mg de tecido de folhas jovens de 169 acessos coletadas no início do ciclo vegetativo pelo método de extração CTAB (DOYLE & DOYLE, 1987).

Amplificação dos fragmentos

O mix padrão das reações continha 4 µL de DNA diluído para a concentração de 10 ng/µL, 1,75 µL de primer *foward*, contendo a respectiva marcação de fluorescência e 1,75 µL de primer *reverse*, cada qual diluído na concentração de 3 µM, 2,2 µL de água ultrapura autoclavada, 1,5 µL de tampão de PCR 10x, 1,5 µL de dNTP diluído para uma concentração de 2,5 µM por desoxinucleotídeo, 0,8 µL de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) 50 mM e 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase 500 unidades da Invitrogen, de forma que cada reação continha um volume final de 13,7 µL.

Eletroforese capilar em sequenciador MegaBACE 1000 (GE Healthcare)

As amostras de DNA dos indivíduos selecionados do BAG foram ampliadas por técnica de PCR em termociclador Martercycler Gradient (Eppendorf) por 30 ciclos, com a alteração de volume para os olinonucleotídeos no mix de reação 1 µL de cada uma das sequências, devido à não incorporação em produtos de amplificação. Os fragmentos da PCR são separados pelo tamanho e revelados pela fluorescência: os iniciadores marcados com o fluoróforo 6-Hex®. O marcador, por sua vez, emite uma florescência na cor vermelha. Os resultados são analisados depois de uma hora e meia de corrida.

Resultados e Discussão

Eletroforese capilar

Decorridas as análises da população selecionada, foram encontradas diferenças no número de alelos e peso molecular dos fragmentos amplificados quando comparados à literatura (Tabela 1). Os 11 pares de primers geraram multiplos fragmentos (alelos) quando amplificados em reações de SSR com DNA genômico dos 152 acessos do BAG de macieira. Uma análise comparativa da freqüência alélica entre os acessos indicou uma média de 22,82 alelos por *loco*. O *loco* mais polimórfico observado foi o correspondente ao iniciador Ch01g12, com 29 alelos amplificados, seguido de Ch02g09, com 27 alelos e do iniciador Ch02b10, com 26 alelos. Foram identificados 11 novos alelos para o *loco* Ch03c02; 14 alelos para Ch02b10; 9 para Ch05a05; 1 para Ch05c06; 3 para Ch02c11; 7 para Ch02b03, 11 para Ch01g12, 19 para Ch02g09; 16 para Ch03b06 e 8 para Hi03g06. No caso do SSR Nz02b01 (Tabela 1).

Tabela 1. Tamanho e número de alelos encontrados no presente trabalho.

Loco	Dados de Referência		Dados encontrados neste trabalho	
	Peso molecular dos alelos (pb)	Número de alelos	Peso molecular dos alelos (pb)	Número de alelos
Ch03c02	116-136[1]/106-162[4]	5[1]/12[4]	92-218	23
Ch02b10	121-159[1]/ 114-157[3]	8[1]/12[3]	106-182	26
Ch05a05	198-230[1]/202-257[4]	6[1]/13[4]	160-250	22
Ch05c06	104-126[1]/84-130[4]	8[1]/16[4]	92-226	17
Ch02c11	219-239[1]/202-236[4]	7[1]/14[4]	200-250	17
Ch02b03	77-109[1]/75-107[4]	8[1]/13[4]	76-124	20
Ch01g12	112-186[1]/106-186[4]	6[1]/18[4]	96-188	29
Nz02b01	212-238[2]/194-246[5]	7[2]/18[5]	190-260	16
Ch02g09	98-138[1]	8[1]	90-212	27
Ch03b06	111-131[1]	5[1]	90-154	21
Hi03g06	182-204[1]/175-215[4]	5[1]/16[4]	164-240	24

Análise da Diversidade Genética

Análise da similaridade genética entre os diferentes acessos, que foram separados em dois grandes grupos com 8% de similaridade, e vários outros sub-grupos de acordo com a proximidade genética (Figura 1). O primeiro grande grupo inclui os acessos: Winter Gold, *M. atrosanguinea*, *M. elley* e *M. aldenhamensis*, e o segundo, os demais acessos do BAG. Dentro do grupo 1, o acesso Winter Gold apresentou maior diferença, com um coeficiente de dissimilaridade de 0,82, o que indica 18% de similaridade entre os demais acessos na mesma ramificação. As cultivares *M. atrosanguinea* e *M. elley* são as mais próximas entre si, com coeficient de 0,47, enquanto a cultivar *M. aldenhamensis* difere de ambas em com um coeficiente de 0,37. No segundo grupo, os acessos *M. robusta* e Pome 28 diferem dos demais tão logo ocorreu à primeira divisão, apresentando um coeficiente de dissimilaridade de 0,97 entre si e os outros (Figura 1).

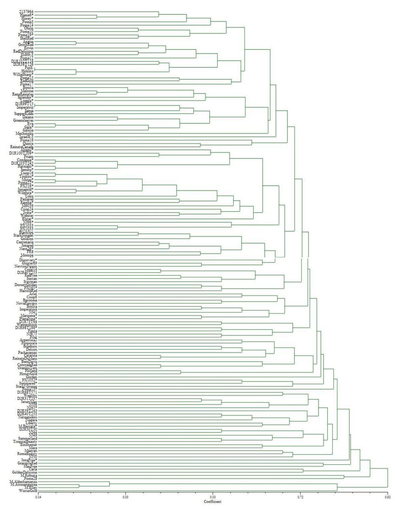

Figura 1. Dendograma elaborado pelo método UPGMA dos 152 acessos analisados do BAG de maçã a partir da utilização de 11 marcadores SSR. Indivíduos caracterizados com * são considerados fenotipicamente suscetíveis a MFG. Em destaque os acessos de Gala e Fuji Suprema. A escala representa o coeficiente de dissimilaridade entre os acessos.