

VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS À REAÇÃO À PRESENÇA DO PATÓGENO *USTILAGO SCITAMINEA* NA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR

Luiz Gustavo da Mata Borsuk¹, Bruna Sisti Michelin de Polli², Hugo Zeni Neto³, Adriana Gonela⁴, Renato Frederico dos Santos⁵, Lia Mara Moterle dos Santos⁶

¹Doutorando do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Campus de Maringá/PR, Universidade Estadual de Maringá - UEM. Bolsista CAPES-UEM. lgborsuk@hotmail.com

²Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Maringá – UEM. Bolsista CAPES-UEM. brunadepolli@gmail.com

³Orientador, Doutor, Professor do Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá - UEM. hzneto@uem.br

⁴Professora do Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá - UEM. adriana.gonela68@gmail.com

⁵Doutorando no programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá-UEM. agrofs@hotmail.com

⁶Doutora em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá-UEM lmoterle@hotmail.com

RESUMO

A cana-de-açúcar tem uma grande importância econômica no Brasil, o qual se destaca como o maior produtor mundial. Entretanto, doenças afetam diretamente a produtividade da cultura, podendo levar a perdas totais na colheita. Uma das principais doenças é o carvão da cana-de-açúcar, cujo agente etiológico é o fungo *Ustilago scitaminea*. Considerando a importância e a grande incidência dessa doença nas áreas em que se cultiva a cana-de-açúcar e a perda de resistência das cultivares em uso, o presente trabalho teve como objetivo validar marcadores moleculares identificados *in silico* em sequências genômicas associadas a genes de resistência a doenças. Neste contexto, 25 pares de iniciadores desenhados para anelar nas sequências supracitadas foram testados. Para tanto, foi utilizado DNA de genótipos de cana-de-açúcar resistentes e suscetíveis ao carvão para padronizar a de PCR. Os fragmentos foram analisados em gel de agarose 1,7%. Conforme resultados obtidos, 17 pares de iniciadores do estudo anelaram e amplificaram regiões específicas do genoma da cana-de-açúcar e, conseqüentemente, estão aptos para serem utilizados em estudos posteriores.

PALAVRAS-CHAVE: *Saccharum* spp., carvão de cana-de-açúcar, marcadores moleculares

1 INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), tem uma grande importância no cenário da economia do Brasil, sendo o país com a maior produção desta *commodity*, com uma produção na safra de 2020/21 de 654,8 milhões de toneladas, em uma área total de 8,62 milhões de hectares (CONAB, 2021).

Dentre muitos fatores que afetam a produtividade da cultura, o ataque de patógenos sem dúvidas é um dos principais. O carvão (*Ustilago scitaminea*) é uma das principais doenças que atacam a cana-de-açúcar, levando a perdas significativas na lavoura, como ocorrido por exemplo na década de 1980, quando foram registradas perdas de produtividade de 80% nas lavouras implantadas com a variedade NA56-79, que ocupava cerca de 50% de toda área cultivada de cana-de-açúcar (RAGO; CASAGRANDE; MASSOLA JÚNIOR, 2009)

Uma das ferramentas que podem ser utilizadas auxiliando os programas de melhoramento genético a identificar genes putativos de resistência à doenças, são os marcadores moleculares de DNA. Alguns trabalhos vem demonstrando a eficácia destas ferramentas, como é o caso do gene *Bru1* de resistência a ferrugem marrom (PARCO et al., 2017), também utilizados para genes putativos a resistência da ferrugem laranja (FIER et al., 2020).

Diante o cenário atual, o presente trabalho teve como objetivo validar marcadores moleculares identificados *in silico* em sequências genômicas associadas a genes de resistência a doenças, padronizando as condições de amplificação em cultivares de cana-de-açúcar com diferentes reações à presença do patógeno.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O genoma de AP85-441 foi utilizado como base para selecionar sequências de cana-de-açúcar, levando em consideração os resultados previamente descritos na literatura que indicavam domínios conservados associados a genes de resistência a doenças. A partir disso, vinte e cinco pares de iniciadores foram desenhados e analisados *in silico*.

O material vegetal era composto por plantas de cana-de-açúcar onde observa-se a presença e ausência natural do patógeno. Com isso, têm-se amostras contrastantes sobre a possível resistência ou suscetibilidade a doença do carvão. O DNA foi extraído a partir das folhas mais jovens, utilizando a metodologia adaptada de Hoisington et al. (1994).

As condições da PCR foram então padronizadas, considerando os seguintes parâmetros: concentrações de DNA, iniciadores, MgCl₂, dNTPs, temperatura de anelamento e o programa da PCR, considerando o número de ciclos e tempo.

Os segmentos de DNA amplificados pela PCR foram identificados no gel de agarose a 1,7%. Após a eletroforese o gel foi corado em brometo de etídio a 0,5 µg·mL⁻¹. Para marcar o peso molecular foi utilizado o padrão molecular conhecido de 100 pares de base em cada gel. O gel foi fotografado em um transiluminador com luz ultravioleta (UV), da *Loccus Biotecnologia* e software *L-Piximage*.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

De acordo com a padronização o mix da PCR foi composto por 2,0µL de tampão PCR 1X (Invitrogen, Life Technologies Corporation), 2,0µL de MgCl₂ (2mM), 0,2 mM de cada dNTP, 0,2µL de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen) (1U), 1,0µL do iniciador da fita senso (10 µM), 1,0µL do iniciador da fita anti-senso (10 µM), 3,0µL de DNA genômico (10 ng·µL⁻¹) e 10,0µL de água Milli-Q (Millipore Corporation).

O programa de PCR definido foi o *Touchdown-PCR* (TD), conforme DON et al. (1991). A temperatura máxima para o programa TD foi definida em 67°C para a temperatura máxima de anelamento e 55°C para a menor temperatura.

A partir desta padronização, foi possível confirmar a validação da maioria dos iniciadores. Vale ressaltar que a visualização em gel de alguns pares de iniciadores foi mais evidente que em outros, mas o resultado de amplificação das regiões específicas de cada iniciador foi confirmado para 17 dos 25 pares de iniciadores.

Os resultados de validação obtidos para os pares de iniciadores testados neste estudo estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Padronização de iniciadores

| Nome do iniciador | Tamanho do Amplicon |
|-------------------|---------------------|
| Sspon.01 | 186pb |
| Sspon.02 | 161pb |
| Sspon.03 | 274pb |
| Sspon.04 | 277pb |
| Sspon.05 | 277pb |
| Sspon.06 | 257pb |
| Sspon.07 | 134pb |
| Sspon.08 | - |
| Sspon.09 | - |
| Sspon.10 | 157pb |
| Sspon.11 | 184pb |
| Sspon.12 | 292pb |

| | |
|----------|-------|
| Sspon.13 | 183pb |
| Sspon.14 | 182pb |
| Sspon.15 | 104pb |
| Sspon.16 | 125pb |
| Sspon.17 | 221pb |
| Sspon.18 | 121pb |
| Sspon.19 | 260pb |
| Sspon.20 | - |
| Sspon.21 | - |
| Sspon.22 | - |
| Sspon.23 | - |
| Sspon.24 | - |
| Sspon.25 | - |

TD – *Touchdown*;

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após o processo de padronização foi possível estabelecer condições para o uso os 17 marcadores que podem ser utilizados para o tanto para estudos de resistência ao carvão da cana-de-açúcar, quanto para outros estudos genéticos. Assim, espera-se que o presente trabalho possa agregar informações que auxiliem os programas de melhoramento genético da cultura da cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: Cana-de-açúcar. Safra 2020/21. Quarto levantamento. **Quarto levantamento**, v. 7, n. 4, p. 57, 2021.

DON, R. H. et al. "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 14, p. 4008, 1991.

FIER, Í. et al. Field resistance and molecular detection of the orange rust resistance gene linked to G1 marker in Brazilian cultivars of sugarcane. **Summa Phytopathologica**, v. 46, n. 2, p. 92–97, 2020.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZALEZ DE LEON, D. **Laboratory Protocols: CIMMYT, Applied Molecular Genetic Laboratory**: 2 ed. México, Cimmyt, 1994, 88p.

PARCO, A. S. et al. Distribution and frequency of Bru1, a major brown rust resistance gene, in the sugarcane world collection. **Plant Breeding**, v. 136, n. 5, p. 637–651, 2017.

RAGO, A. M.; CASAGRANDE, M. V.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Variabilidade patogênica de *Ustilago scitaminea* no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 2, p. 93–97, 2009.

UNTERGASSER, A. et al. Iniciador3Plus, an enhanced web interface to Iniciador3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. SUPPL.2, p. 71–74, 2007.