



## VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES LIGADOS AO GENE *Rps1-k* DE RESISTÊNCIA À PODRIDÃO RADICULAR DE FITÓFTORA EM SOJA

VALIDATION OF MICROSATELLITE MOLECULAR MARKERS LINKED TO *Rps1-k* RESISTANCE GENE TO PHYTOPHTHORA ROOT ROT IN SOYBEAN

RINCÃO, M.P.<sup>1</sup>; CATELLI, L.L.<sup>2</sup>; MARIN, S.R.R.<sup>2</sup>; SOARES, R.M.<sup>2</sup>; ARIAS, C.A.A.<sup>2</sup>; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C.<sup>2</sup>; ABDELNOOR, R.V.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Bolsista Mestrado CAPES, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR; e-mail: [ximelles@hotmail.com](mailto:ximelles@hotmail.com)

<sup>2</sup> Embrapa Soja, Londrina, PR.

### Resumo

O fungo *Phytophthora sojae* constitui uma das principais doenças que limitam a produtividade da soja. Com isso esse trabalho objetivou a validação de marcadores moleculares microssatélites ligados ao gene *Rps1-k*, que confere resistência a *P. sojae*, para serem utilizados no programa de seleção assistida ao melhoramento. Para identificar marcadores ligados ao gene que confere resistência a fitóftora, uma população segregante F<sub>2</sub> de 138 indivíduos foram produzidos a partir do cruzamento entre Williams82 (*Rps1-k*) e BRS133 (suscetível). Os resultados das análises fenotípicas apresentaram 108 indivíduos resistentes e 30 suscetíveis na geração F<sub>2</sub>, e o teste de qui-quadrado se ajustou de acordo com a proporção esperada de 3 resistentes: 1 suscetível, sugerindo que a herança de *Rps1-k* é controlada por um gene dominante de herança monogênica. Cinco marcadores microssatélites foram analisados como ligados ao gene *Rps1-k*, no cromossomo 3 da soja, sendo o marcador Satt641 posicionado o mais próximo do gene com distância genética de 6,4cM. Assim este marcador pode conferir uma importante estratégia na seleção de genótipos brasileiros de soja resistentes à podridão radicular por fitóftora.

### Introdução

A doença conhecida como Podridão Radicular de Fitóftora, causada pelo fungo *Phytophthora sojae* (KAUFFMANN E GERDEMANN, 1958) é considerada uma das doenças mais destrutivas da soja, podendo ocasionar perdas no rendimento de até 100% em cultivares altamente suscetíveis. Vários tipos de resistência têm sido descritas no patossistema de *P. sojae*, dentre elas a resistência completa, mediada por genes *R*, foi determinada por 15 genes dominantes já identificados e conhecidos como *Rps*, distribuídos em nove *loci*. A maioria destes genes limita completamente o crescimento de *P. sojae* através de reação de hipersensibilidade no hipocótilo (COSTAMILAN, 2007). O loco *Rps1*, situado no cromossomo 3 da soja, é complexo, contendo cinco alelos funcionais, e um alto número de marcadores moleculares estão mapeados próximos à sua posição.

O alelo *Rps1-k* apresenta grande importância comercial para a cultura da soja no Brasil, visto que confere resistência às populações do fungo presentes no Brasil, e assim contribuindo de maneira significativa na manutenção dos mecanismos de resistência ao fungo *P. sojae*. O uso de marcadores moleculares microssatélite associados a genes que confirmam resistência pode aumentar a eficiência da seleção de caracteres de interesse com base no genótipo, reduzindo o tempo empregado nas práticas de melhoramento. Assim, o objetivo deste trabalho é a validação de marcadores moleculares microssatélites ligados ao gene *Rps1-k* na resistência a *P. sojae*, verificando sua eficiência de seleção para que possam ser utilizados nos programas de seleção assistida por marcadores moleculares (SAM).

## Material e Métodos

Para a validação dos marcadores moleculares foi utilizada uma população  $F_2$  obtida a partir do cruzamento dos genótipos Williams82 (*Rps1-k*) x BRS133 (suscetível). O experimento contendo os genótipos parentais e a geração  $F_2$  (138 plantas) foi instalado em casa de vegetação, sob um delineamento inteiramente casualizado.

As plantas foram inoculadas diretamente na haste por meio da incisão de palitos contendo suspensão do inóculo e as avaliações fenotípicas foram realizadas de 10 a 15 dias após a emergência das plântulas, e cada indivíduo foi classificado como resistente ou suscetível, de acordo com os sintomas observados.

O DNA genômico dos parentais e da população  $F_2$  foi extraído de tecido foliar, coletados em casa-de-vegetação, ainda em estágio  $V_2$ . A extração de DNA foi baseada no método de Keim et al., (1988), com algumas modificações.

A escolha dos marcadores microssatélites foi realizada com base em trabalhos de mapeamento prévios (GARDNER et al., 2001; DEMIRBAS et al., 2001) e também no mapa genético da soja (SONG et al., 2004). Inicialmente os marcadores foram testados para a verificação de polimorfismo entre os parentais e, posteriormente, os marcadores selecionados como polimórficos foram testados em toda a população.

A razão de segregação para os marcadores microssatélites foi submetida ao teste de aderência ao modelo como um único loco, utilizando o teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ( $P > 0,05$ ). As análises de ligação foram realizadas com o auxílio do programa MapMaker/EXP (LANDER et al., 1987), utilizando a função de mapeamento de Kosambi (KOSAMBI, 1944). O critério de ligação utilizou LOD score 3,0 a uma distância máxima de 37,2 cM.

## Resultados e Discussão

Com base na análise dos dados da avaliação fenotípica da população segregante  $F_2$ , foi verificado pelo teste de ( $\chi^2$ ) correspondência com a segregação de um único loco com ação dominante para resistência. Dos 138 indivíduos  $F_2$ , 108 foram resistentes e 30 apresentaram reação de suscetibilidade (Figura 1). O modelo genético com um gene dominante segregando na geração  $F_2$ , produzindo a proporção de 3 resistente:1 suscetível, se adequou satisfatoriamente aos dados ( $\chi^2=0,783$ ) (Tabela 1).



**Figura 1.** Foto ilustrando as lesões típicas de resistência (A - sadia), e suscetibilidade (B - infectada e C - morta).

Um total de 10 marcadores microssatélites testados nos parentais Williams82 e BRS133, apresentaram polimorfismo, sendo 5 destes ligados ao loco *Rps1-k*. A análise de ligação, utilizando o programa Mapmaker/EXP 3.0, resultou na aproximação do marcador Satt641 ao gene *Rps1-k*, no cromossomo 3. Não houve distorção de segregação significativa para nenhum dos locos de microssatélites analisados de acordo com o teste do  $\chi^2$  ( $P > 0,05$ ) (Tabela 1). O loco *Rps1-k* foi encontrado no cromossomo 3 da soja em distância estimada de 6,4 cM do marcador Satt641, o que corrobora os dados de DEMIRBAS et al. (2001).

**Tabela 1.** Resultado das análises de segregação e teste de Qui-quadrado para reação de fitóftora e para os marcadores moleculares microssatélites, realizado na população segregante F<sub>2</sub>.

Marcadores	Observado*			Proporção***			Qui-quadrado±
	A	B	C	R/H	S		
<i>Rps1k</i>	108**			30	103.5:	34.5	0.783 <sup>ns</sup>
Satt641	44	62	32	34.5:	69:	34.5	3.507 <sup>ns</sup>
Satt152	46	57	35	34.5:	69:	34.5	5.928 <sup>ns</sup>
Satt530	43	62	33	34.5:	69:	34.5	2.870 <sup>ns</sup>
Satt675	43	64	31	34.5:	69:	34.5	2.812 <sup>ns</sup>
Satt683	42	66	30	34.5:	69:	34.5	2.348 <sup>ns</sup>

\*A B e C: homocigoto resistente, heterocigoto resistente e homocigoto recessivo, respectivamente.

\*\*Avaliação dos indivíduos com reação de hipersensibilidade no hipocótilo (indivíduos resistentes).

\*\*\*Segregação dos indivíduos: R-resistente, H-heterocigoto e S-suscetível.

± ns= não significativo a 5% pelo teste de Qui-quadrado.

Análises da população segregante F<sub>2,3</sub> serão realizadas para confirmação e correção dos resultados uma vez que estes demonstraram divergências entre as análises fenotípicas e genotípicas. Estas análises podem possibilitar alterações nas distâncias genéticas entre os marcadores microssatélites e o loco *Rps1-k*. A inclusão de alguns marcadores moleculares do tipo SNP's próximos ao gene *Rps1-k* será realizada com a finalidade de aproximar as distâncias genéticas entre o gene e os marcadores.

Os marcadores microssatélites validados neste trabalho representam uma nova ferramenta que poderá auxiliar os programas de melhoramento genético de soja no Brasil, de modo a auxiliar os programas de melhoramento e ainda a combinar vários genes em uma cultivar de forma rápida, precisa e com baixo custo e, assim, obter novas cultivares com resistência a podridão radicular de fitóftora de forma mais eficiente.

### Conclusões

- O trabalho permitiu a validação de 5 marcadores microssatélites na progênie F<sub>2</sub>, os quais podem ser utilizados em estudos moleculares para os genótipos avaliados.
- O marcador molecular microssatélite Satt641 foi posicionado próximo ao gene *Rps1-k* de resistência à fitóftora, no cromossomo 3 da soja em uma distância de 6,4cM.
- Os marcadores ligados ao gene *Rps1-k* são úteis, na seleção assistida para a fitóftora, em estágios iniciais do desenvolvimento das plantas e sem a exposição ao patógeno.

### Referências

COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F.; MORAES, R. M. A. de. **Podridão radicular de fitóftora em soja**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007. 23 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 79). Disponível em: [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do79.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do79.htm)

DEMIRBAS, A.; RECTOR, B.G.; LOHNES, D.G.; FIORITTO, R.J.; GRAEF, G.L.; CREGAN, P.B.; SHOEMAKER, R.C.; SPECHT, J.E. Simple Sequence Repeat Markers Linked to the Soybean *Rps* Genes for Phytophthora Resistance. *Crop Science*. Vol.41, p.1220–1227, 2001.

GARDNER, M.E.; HYMOWITZ, T.; XU, S.J.; HARTMAN, G.L. Physical map location of the *Rps1-k* allele in soybean. *Crop Science*, n. 41, p. 1435-1438, 2001.



LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, J.M.; LINCOLN, S.E.; NEWBERG, L. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, San Diego, v. 1, n. 2, p. 174 - 181, 1987.

KOSAMBI, D.D. The estimation of map distance from recombination values. **Annuaire of Eugenetics**, n. 12, p. 172 - 175, 1944.

KAUFMANN, M. J.; GERDEMANN, J. W. Root and stem rot of soybean caused by *Phytophthora sojae* n. sp. **Phytopathology**, v. 48, p. 201-208, 1958.

SONG, Q.J.; MAREK, L.F.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; CONCIBIDO, V.C.; DELANNAY, X.; SPECHT, J.E.; CREGAN, P.B. A new integrated genetic linkage map of the soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, n. 109, p. 122-128, 2004.