

Validação de marcadores moleculares SSR para seleção assistida para doenças em soja

RINCÃO, M.P.¹; MARIN, S.R.R.²; MARCELINO, F.C.²; ABDELNOOR, R.V.²

¹Universidade Estadual Norte do Paraná – Faculdade Luiz Meneghel, ximelles@hotmail.com; ²Embrapa Soja

Os programas de melhoramento de cultivares de soja utilizam técnicas visando a obtenção de cultivares com altas taxas de produtividade e melhor adaptação a fatores bióticos e abióticos, que prejudicam a sobrevivência e o desenvolvimento desejável da espécie. No entanto, os fitopatógenos responsáveis pelas principais doenças que diminuem a produção desse grão também evoluem de maneira paralela ao desenvolvimento de novas cultivares, o que dificulta o controle de produção em cada safra.

Phytophthora sojae (causador da podridão-da-raiz por *Phytophthora*) e *Heterodera glycines* (nematóide de cisto - NCS) constituem alguns dos principais patógenos que afetam a produção de soja, ocasionando perdas consideráveis na safra brasileira e mundial do grão, o que acarreta prejuízos para o setor econômico. Deste modo, é crucial que cultivares de soja em desenvolvimento apresentem resistência a esses patógenos.

Para garantia do sucesso da cultivar, e conseqüente fenótipo de resistência frente aos patógenos, durante o desenvolvimento da nova variedade é importante que em cada seleção dos materiais sejam realizados também testes moleculares para confirmação do genótipo de resistência às principais doenças que acometem a cultura.

A complexidade genética e a heterogeneidade das populações de NCS têm limitado o entendimento da natureza da resistência a esse patógeno, e consequentemente, o desenvolvimento de cultivares resistentes (Faghihi et al., 1986a, b). O loco *rhg1*, localizado no Grupo de Ligação G, que confere resistência parcial às cultivares de soja para NCS, tem apresentado mais de 50 % do controle da variação de resistência para essa doença, e o loco *Rhg4*, mapeado no GL A2, tem sido utilizado de maneira eficaz no controle de diversas raças de NCS (Concibido et al., 1997 e 2004).

Para *P. sojae* já foram identificados 8 genes de resistência, denominados *Rps1*, *Rps2*, *Rps3*, *Rps4*, *Rps5*, *Rps6*, *Rps7* e *Rps8*, mapeados nos GL N, J, F, G, G, N, e A2, do genoma da soja, respectivamente (Burnham et al., 2003; Demirbas et al., 2001; Diers et al., 1992; Lohnes e Schmitthenner, 1997; Sandhu et al., 2004; Weng et al., 2001). Apenas dois locos apresentam mais de dois alelos; *Rps1* (*Rps1a*, *Rps1b*, *Rps1c*, *Rps1d*, *Rps1e*, e *Rps1k*) e *Rps3* (*Rps3a*, *Rps3b*, e *Rps3c*). O loco *Rps1* é complexo, contendo cinco alelos funcionais e está ligado ao loco *Rps7* (Bernard e Cremeens, 1981; Lohnes e Schmitthenner, 1997; Weng et al., 2001). Um grande número de marcadores foi mapeado próximo a esses dois locos, principalmente para *Rps1* (Gardner et al., 2001).

Sendo assim, análises fenotípicas para seleção de materiais resistentes a tais patógenos constituem tarefa complexa e trabalhosa, devido a diferentes raças do patógeno, herança qualitativa e quantitativa e ao elevado número de plantas que devem ser analisadas.

A seleção assistida por marcadores moleculares tem auxiliado programas de melhoramento na avaliação dos materiais com base em marcas genotípicas. Tais marcadores permitem a identificação de variações existentes entre gêneros e entre espécies em comum, detectando alterações muito específicas nos segmentos de DNA (Rongwen et al., 1995). Dentre os vários marcadores moleculares descritos, os marcadores do tipo Microsatélites ou Sequências Simples Repetidas (SSR - *Simple Sequence Repeats*; Litt e Lutty et al., 1989),

constituem-se nos mais utilizados até o momento em pesquisas genéticas tais como análises filogenéticas, mapeamento e seleção assistida (Powell et al., 1996).

Os microssatélites destacam-se, ainda, por possuírem caráter codominante, além de considerável quantidade de alelos e ampla distribuição entre o genoma eucariótico. São caracterizados, de maneira geral, por curtas sequências de DNA que se apresentam repetidas em *tandem* e que são compostas, em sua maioria, de um a quatro nucleotídeos. Os SNP's (*Single Nucleotide Polimorphism*; Collins et al., 1998) se caracterizam como um recente e interessante grupo de marcadores moleculares que indicam alterações em um único par de base, constituindo uma ferramenta minuciosa para as pesquisas moleculares em desenvolvimento.

Este estudo tem como objetivo validar marcadores moleculares microssatélites como ferramentas de seleção assistida, facilitando a seleção de plantas de soja resistentes às doenças causadas por nematóide de cisto e por *Phytophthora sojae*, durante o desenvolvimento de cultivares de soja.

As amostras de tecido das cultivares serão coletadas mediante cortes do tecido foliar e submetidas à técnica adaptada de extração de DNA de sementes, pelo método CTAB, descrito por McDonald et al., 1994. Marcadores moleculares SSR e SNP's ligados à resistência aos patógenos nematóide de cisto e *Phytophthora* foram selecionados com base no mapa genético da soja (Cregan, 2003) e na literatura.

A amplificação dos locos de microssatélite será obtida de acordo com a metodologia descrita por Akkaya et al., (1995) e a eletroforese dos fragmentos amplificados será realizada em géis de agarose/synergel 3 % ou poliacrilamida 10 %. Os géis corados com brometo de etídio serão visualizados sob luz ultravioleta e a captação de imagens realizada utilizando-se o sistema digital Kodak de fotodocumentação.

As sequências dos SNP's serão detectadas por meio do sistema de Real

Time PCR, utilizando-se *primers* e sondas TaqMan MGB, desenhados com base no programa *Primer Express 2.0 (Applied Biosystems)* e adquiridos pela *Applied Biosystems*.

Flanqueados ao gene de resistência a NCS *rhg1*, foram selecionados os marcadores SSR Satt309 e Sat_168 e os SNP's BARC-027452-06569 e BARC-015067-02555. Para o gene de resistência a *Phytophthora Rps1* foram selecionados os marcadores SSR Satt530, Satt159 e Satt584 e os SNP's BARC-028619-05977 e BARC-024681-05527. Alguns desses marcadores foram avaliados em 21 cultivares com características de resistência e suscetibilidade a essas duas doenças, o que permitiu avaliar a especificidade da reação e identificar polimorfismos entre os potenciais parentais em cruzamentos para resistência a NCS e *Phytophthora*.

Com a validação desses marcadores, os dados fenotípicos serão comparados com os dados moleculares, visando a identificar marcadores que possam ser utilizados efetivamente no desenvolvimento de cultivares pelos programas de melhoramento genético.

Referências

BERNARD, R.L.; CREMEENS, C.R. Na allele at the *Rps1* locus from the variety Kingwa. **Soybean Genetics Newsletter**, v. 8, p. 40-42, 1981.

BURNHAM, K.D.; DORRANCE, A.E.; FRANCIS, D.M.; FIORITTO, R.J.; ST. MARTIN, S.K. *Rps8*, a new locus in soybean for resistance to *Phytophthora sojae*. **Crop Science**, v. 43, p. 101–105, 2003.

CATELLI, L. L. **Caracterização de cultivares de soja utilizando marcadores moleculares microssatélites**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 104 f, 2005.

CONCIBIDO, V.C.; LANGE, D.A.; DENNY, R.L.; ORF, J.H.; YOUNG, N.D. Genome mapping of soybean cyst nematode resistance genes in 'Peking', PI 90763, and PI 88788 using DNA markers. **Crop Science**, v. 37, p. 258-264, 1997.

CONCIBIDO, V.C.; DIERS, B.W.; ARELLI, P.R. A Decade of Qtl Mapping for Cyst Nematode Resistance in Soybean. **Crop Science**, v. 44, p. 1121-1131, 2004.

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**, v. 41, p.1220–1227, 2001.

DIERS, B.W.; MANSUR, L.; IMSANDE, J.; SHOEMAKER, R.C. Mapping Phytophthora resistance loci in soybean with restriction fragment length polymorphism markers. **Crop Science**, v. 32, p. 377–383, 1992.

FAGHIHI, J.; FERRIS, J.M.; FERRIS V.R. *Heterodera glycines* in Indiana. I. Reproduction of geographic isolates on soybean differentials. **Journal of Nematology**, v. 18, p. 169–172, 1986a.

FAGHIHI, J.; FERRIS, J.M.; FERRIS V.R. *Heterodera glycines* in Indiana. II. Morphology of geographic isolates. **Journal of Nematology**, v. 18, p. 173–177, 1986b.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEM, p. 220, 1998.

GARDNER, M.E.; HYMOWITZ, T.; XU, S.J.; HARTMAN, G.L. Physical Map Location of the *Rps1-k* Allele in Soybean. **Crop Science**, v. 41, p. 1435–1438, 2001.

- GUIMARÃES, C.T.; MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: Borém, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: FUNAPE: UFG, p. 385-438, 2001.
- LOHNES, D.G.; SCHMITTHENNER, A.F. Position of the *Phytophthora* resistance gene *Rps7* on the soybean molecular map. **Crop Science**, v. 37, p. 555-556, 1997.
- POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, v. 1, p. 215-222, 1996.
- RONGWEN, J. S.; AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; LAVI, U.; CREGAN, P.B. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 19, p. 43-48, 1995.
- WENG, C.; YU, K.; ANDERSON, T.R.; POYSA, V. Mapping genes conferring resistance to *Phytophthora* root rot of soybean, *Rps1a* and *Rps7*. **Journal of Heredity**, v. 92, p. 442-446, 2001.