

Desenvolvimento e validação do sistema de genotipagem molecular de cultivares de soja via sequenciador automático com marcadores microssatélites

PASSIANOTTO, A.L. de L.¹; KUWAHARA, M.K.²; NEPOMUCENO, A.L.²; ABDELNOOR, R.V.²; BINNECK, E.²; GONELA, A.¹; MARCELINO, F.C.²

¹Universidade Estadual de Maringá, andrepassianoto@hotmail.com; ²Embrapa Soja

A soja, leguminosa originária da China, é classificada como uma das culturas mais importantes em todo o mundo. No Brasil, ela é responsável por uma parcela substancial da cadeia econômica, ocupando lugar de destaque na produção e exportação de grãos. Embora seja cultivada há mais de 3000 anos, e em diferentes ambientes, a base genética da soja cultivada no país é particularmente estreita. Deste modo, a determinação da identidade genética com base em descritores fenotípicos tem-se mostrado cada vez mais limitada na distinção de materiais geneticamente superiores, principalmente em espécies autógamas (Alcantara, 2001). A caracterização genética, tanto das cultivares quanto dos acessos é de grande valia aos programas de melhoramento, facilitando a escolha das melhores combinações de progenitores bem como a segregação dos acessos e linhagens. Diante dos diversos programas de melhoramento presentes no país, a proteção das cultivares é de extrema importância às empresas detentoras de seus direitos. Contudo, para requerer a proteção é necessária a demonstração de que a cultivar é diferente de qualquer outra da mesma espécie, ou seja, a nova cultivar precisa apresentar distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade. Atualmente, a proteção de cultivares é feita com base em descrições morfológicas, fisiológicas e em características bioquímicas, muitas vezes sensíveis a variações ambientais. Alguns aspectos das

descrições, na maioria das vezes, ainda apresentam a desvantagem de serem inferidos somente quando a planta está adulta ou inteira. Já os marcadores de DNA possuem a capacidade de serem utilizados em qualquer estágio da planta, além de produzirem um padrão exclusivo "fingerprint" para cada cultivar. Os marcadores moleculares se transformaram em uma nova tecnologia de identificação de materiais, e dentre estes, os microssatélites ganham destaque por sua natureza codominante e multialélica, além de serem extremamente conservados dentro da espécie. Assim, o presente trabalho visa a estabelecer um procedimento de rotina semiautomatizado e de elevada precisão pelo emprego de marcadores SSR fluorescentes para identificação molecular de genótipos de soja cultivados no país e caracterizar molecularmente as cultivares selecionadas.

Vinte e uma cultivares de soja foram selecionadas e obtidas a partir do banco de germoplasma da Embrapa Soja em Londrina-PR. As sementes foram semeadas em dois vasos, em casa de vegetação. Cada vaso continha oito plantas, totalizando 16 plantas por genótipo. Após o surgimento do segundo trifólio (estádio V2), foram coletadas em método de bulk as folhas jovens dos materiais de todas as plantas pertencentes a cada genótipo e armazenadas a -80 °C. O DNA das amostras foi extraído de acordo com o procedimento descrito por Keim et al. (1988) e quantificado utilizando o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000. Os primers selecionados foram marcados com fluorescência azul (6FAM), verde (HEX), ou amarela (NED). A amplificação de fragmentos via PCR foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Akkaya et al. (1995). Após a amplificação, as três marcações foram unidas para a montagem do multiplex para posterior desnaturação, análise e identificação das amostras com o auxílio do sequenciador automático ABI PRISM Genetic Analyser® 3100 (*Applied Biosystem*, Foster City, CA). O software GeneScan 672® foi usado para análise da corrida e computação dos dados, e Genotyper® software (AB-PEC, Foster City, CA) foi aplicado para a visualização exata dos alelos e para emissão de dados automaticamente. Para confirmação dos dados as análises foram realizadas em duplicata em duas corridas diferentes.

Os eletroferogramas obtidos por meio do software Genotyper permitiram uma avaliação consistente do tamanho dos alelos apresentados na Tabela 1, contendo os primers mais informativos com seus respectivos tamanhos. O Satt005 foi o primer mais informativo, possuindo 6 alelos diferentes, seguido pelo Satt586 e Satt100, cada um com 5 alelos diferentes e, posteriormente, o Satt540 e Satt114 com 4 alelos, Satt233 e Satt002 com 3 alelos e Satt045 com 2 alelos.

A combinação dos diferentes alelos foi utilizada para identificar os microssatélites mais informativos para cada cultivar (Tabela 2). De acordo com a Tabela 2, cada primer foi identificado por letras. A letra "a" foi utilizada para o alelo de menor tamanho e as demais letras "b", "c", "d", "e" e "f" de acordo com a necessidade de identificação dos alelos maiores. Em alguns primers foi possível identificar indivíduos heterozigotos; isso se deve a uma possível segregação gênica ocorrendo na cultivar, contaminação do DNA da amostra ou ainda mistura de sementes. Por meio da combinação dos primers apresentada foi possível identificar cada uma das 21 cultivares estudadas.

Foram obtidos oito primers SSR capazes de identificar e diferenciar todas as cultivares de soja testadas neste trabalho. Embora o número de primers analisados nesse estudo preliminar seja relativamente pequeno, concluiu-se que dentro do grupo de cultivares selecionadas esses primers possibilitam a identificação de cada uma das cultivares. Primers com grande poder discriminatório são aqueles que geram diversos tamanhos de alelos, possibilitando assim uma maior distinção entre os diferentes genótipos. Concluímos que a informação gerada é de grande valia para os melhoristas, pois pode ser usada para gerar dados de distâncias genéticas entre as cultivares e ainda abre a possibilidade de construir uma futura "fingerprint" de cada cultivar por meio do uso de marcadores microssatélites mais informativos. A busca de outros primers mais informativos e que estejam presentes na maioria dos grupos de ligação da soja é de suma importância para o trabalho.

Tabela 1. Primers analisados, suas seqüências e o tamanho de seus respectivos alelos.

Primers	Seqüência	Tamanho dos alelos
Satt005	F: TATCCTAGAGAAAGAACTAAAAA / R: GTCGATTAGGCTTGAATA	112, 145, 148, 155, 179, 182
Satt586	F: GCGGCTCCAACCTCCAAGTAT / R: GCGCCAAATGTTAATCACTCA	197, 200, 203, 209, 233
Satt100	F: ACCTCATTTGGCATAAA / R: TTGAAAACAAGTAATAAACA	135, 139, 141, 187, 199
Satt540	F: CTGGCGAATCAAGCTTTGTAAC / R: CCGTGATTGCGAAGAGGATTT	145, 152, 164, 167
Satt114	F: GGGTTATCCTCCCAATA / R: ATATGGGATGATAAGGTGAAA	75, 91, 102, 114
Satt233	F: AAGCATACTCGTAAAC / R: GCGGTGCAAAAGATATTAGAAA	185, 197, 205
Satt002	F: TGTGGTAAAAATAGATAAAAAT / R: TCATTTGAAATCGTTGAA	122, 128, 135
Satt045	F: TGGTTTCTACTTCTATAATTATT / R: ATGCCTCTCCCTCCT	130, 136

Tabela 2. Cultivares selecionadas e o resultado dos primers analisados. Nas colunas, os genótipos seguidos da mesma letra possuem alelos comuns. As letras foram atribuídas a partir do alelo menor para o de maior tamanho.

Genótipos	Satt005	Satt586	Satt100	Satt540	Satt114	Satt233	Satt002	Satt045
BRS 246 RR	-	d	c	d	b	b	b	b
BRS 255 RR	f	d	-	a	a	c	a	a
BRS 256 RR	b	a	b	d	a	c	a	b
BRS 270 RR	d	b	c	c	b	a	a	a
BRS Charruá RR	e	d	c	d	b	a	a	b
BRS Gisele RR	c	e	c	b	a	a	c	a
BRSGO Juliana RR	d	a	c	b	b	c	a	b
BRS Pampa RR	e	d	b/d	a	b	b	a	b
BRS Valiosa RR	a/b	e	b/e	b	-	a	c	-
BRS Macota	c	a	b	c	b	b	b	a
BRS Tracajá	e	c	b	a	d	a	b	a
BRS 213	d	a	b	a	b	c	b	a
BRSGO Mineiros	e	c	a	c	c	a	a	a
BRS 184	c	b	b	d	b	a	b	-
BRS 217 [Flora]	b	b	b	c	a	b	b	b
BRS 218 [Nina]	c	d	b	b	a	c	a	a
BRS 232	d	c	b	a	b	c	-	b
BRSGO Goiânia	b	b	b	c	a	a	a	b
BRSGO Luziânia	b	-	b	b	a	b	b	b
BRS Invernada	b	a	b	b	a	c	b	a
BRSMT Pintado	d	b	b	c	b	a	b	a

- dados perdidos.

Referências

ALCÂNTARA NETO, F. de. **Marcadores microssatélites na identificação de cultivares de soja**. 2001. 57 p. Tese de Mestrado em Fitotecnia (Produção Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Orientado por Maurílio Alves Moreira.

AKKAYA, M. S.; SHOEMAKER, R. C.; SPECHT, J. E.; BHAGWAT, A. A.; CREGAN, P. B. Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. **Crop Science**. Madison, v. 35, n. 5, p. 1439-1445, Sept./Oct. 1995.

KEIM, P.; OLSON, T. C.; SHOEMAKER, R. C. A rapid protocol for isolating soybean DNA. **Soybean Genetics Newsletter**, Ames, v.15, p.150-152, Apr. 1988.