

Marcadores microsatélites associados a cultivares de soja

Camila L. Nunes¹; Nilson Vieira²; Carlos Alberto Arrabal Arias²; Ricardo Vilela Abdelnoor²; Álvaro Manoel Rodrigues Almeida². ¹Estudante de Biologia da UNIFIL; ²Embrapa Soja.

Introdução

Nos anos 1960, pesquisadores descobriram que, ao centrifugar DNA, em gradiente de cloreto de césio, havia formação de duas bandas. A primeira, contendo moléculas maiores de DNA, e outra, menor, contendo inúmeras moléculas constituídas de longas seqüências repetidas. A banda secundária foi denominada banda satélite e, conseqüentemente o DNA nela presente foi denominado DNA satélite. Jeffreys et al (1985), encontraram outras regiões do DNA, menores que aquelas denominadas satélites, as quais continham seqüências repetidas de 15 ou mais nucleotídeos e que eles denominaram minisatélites. Também determinaram que o número de minisatélites variava entre indivíduos, o que os levou a criar a técnica de "DNA-fingerprinting".

Em 1989, outra importante descoberta aconteceu. Três grupos de pesquisadores (Litt & Luty, 1989; Weber & May, 1989; Tautz, 1989), trabalhando independentemente, publicaram a ocorrência de seqüências repetidas no DNA, porém menores que aquelas descritas por Jeffreys et al. (1985). No entanto, entre as três publicações, apenas Litt & Luty denominam a nova descoberta de microsatélites.

Os microsatélites apresentam algumas vantagens no estudo de diversidade genética:

1. especificidade de um *locus* (diferentemente de marcadores multi-*locus* como os minisatélites ou RAPD);
2. são marcadores codominantes (os indivíduos heterozigotos podem ser separados dos homozigotos, diferentemente de RAPD ou AFLP)

3. altamente polimórfico;
4. facilmente analisado pela técnica de PCR.

Estas vantagens foram consideradas neste estudo, onde se procurou identificar microsatélites específicos para algumas cultivares de soja e utilizá-los na identificação de linhagens oriundas de autofecundação, em dialelos obtidos para estudos de herança de resistência.

Ao estudar a herança de resistência ao vírus da necrose da haste da soja (VNHS), utilizando cruzamentos entre a cv. resistente (Pintado) e a cv. suscetível (CD 206), observou-se que a proporção entre plantas suscetíveis e resistentes sugeriam resistência determinada por um gene dominante. No entanto, avaliações posteriores mostraram que algumas plantas assintomáticas apresentaram sintomas de forte deformação foliar, fato que levantou dúvidas quanto à presença de plantas oriundas de autofecundações, na obtenção dos cruzamentos.

Este trabalho mostrou a importância dos microsatélites selecionados na identificação de plantas oriundas de autofecundação ou de cruzamentos bem sucedidos.

Material e Métodos

Cruzamentos. Testes iniciais mostraram que a c.v. Pintado e a cv. CD 206 são resistentes e suscetíveis, respectivamente, ao vírus da necrose da haste (VNHS). Cruzamentos foram feitos entre essas duas cultivares e plantas da geração F₂ foram inoculadas mecânicamente com o VNHS.

Extração de DNA. Folhas de plantas de soja, suspeitas de ser originárias de autocruzamentos, foram maceradas em nitrogênio líquido. A extração de DNA será feita conforme descrição de Keim et al., (1988), a partir de tecido foliar liofilizado e moído...

Microsatélites. Neste estudo, foram utilizados primers de microsatélites de soja descritos por Cregan et al. (1999). Satt341, Satt222, Satt460, Satt316, Satt591, Satt519, Satt546, Satt274, Satt456, Satt380, Satt184, Satt276.

PCR e Eletroforese. As reações foram feitas conforme descrito por Akkaya et al. (1992), com algumas modificações. O volume final da reação de PCR, para cada amostra foi de 10 µl, contendo 1 µl tampão 10x, 0,3 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,52 µl dNTPs (2,5 mM), 1 µl de cada primer R e F, 0,2 µl Taq polimerase, 3 µl H₂O miliq e 3 µl DNA (10 ng/ µl). A amplificação foi feita utilizando termociclador Eppendorf, com uma dissociação inicial a 94 °C por 7 min, seguindo-se 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 50 °C por 1 min e 72 °C por 2 min, e uma extensão de 72 °C por 7 min. As amostras amplificadas foram submetidas a eletroforese em gel de poli-acrilamida (10%) a 150V por 90 min. A coloração dos géis foi feita com brometo de etídio e as bandas visualizadas em transiluminador com luz ultra-violeta.

Resultados e Discussão

À semelhança de estudos anteriores conduzidos na Embrapa Soja, os primers de microsátélites utilizados permitiram verificar a presença de bandas específicas para cada um dos pais (Figura 1). Os microsátélites Satt 460, Satt 316 e Satt 456 permitiram separar a cv. suscetível CD 206 da cv. resistente Pintado.

Essa característica foi confirmada ao se comparar plantas oriundas dos cruzamentos entre a cv. Pintado e a cv. CD 206. Os resultados demonstram que todos os cruzamentos foram efetivos, todas as plantas são heterozigotas e todas contêm um alelo de cada progenitor (Figura. 2).

A próxima etapa será identificar marcadores associados ao gene de resistência ao vírus da necrose da haste da soja, úteis na seleção assistida. No futuro, o desenvolvimento de mapas genéticos mais saturados e o desenvolvimento de mais marcadores deverão contribuir com o programa de melhoramento da Embrapa Soja na obtenção de cultivares com uma constituição genética mais ampla para resistência a doenças.

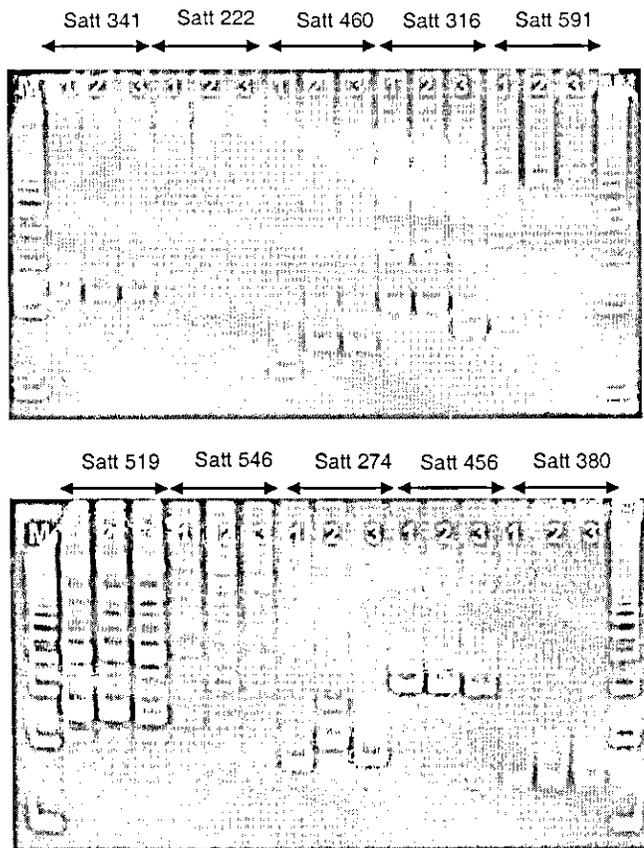


Figura 1. Perfis eletroforéticos de ampliações de DNA de cultivares de soja utilizando primers microsátélites. Identificação das amostras: M= marcador molecular 100 pb; 1= cv. CD 206; 2= cv. BRS 133; 3= cv. Pintado.

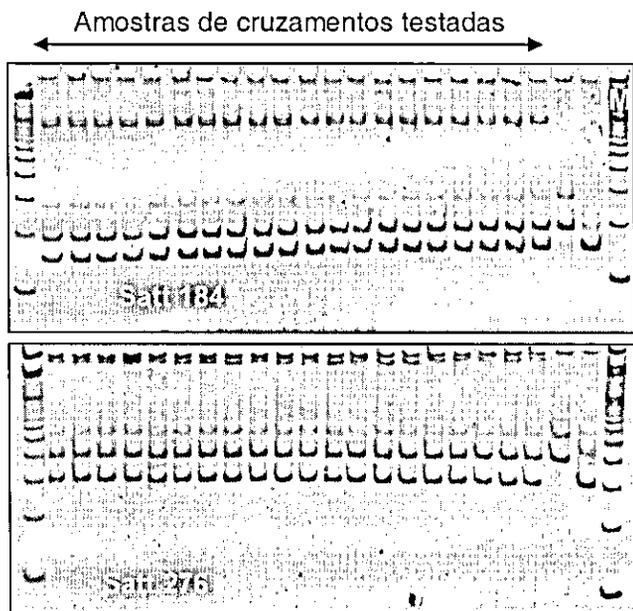


Figura 2. Perfis eletroforéticos de ampliações de DNA de plantas de soja oriundas do cruzamento da cv. Pintado e cv. CD 206. M= marcador molecular 100 pb; 1= cv. Pintado; 2= cv. CD 206.

Considerações Finais

Microsatélites são regiões do genoma de animais e plantas que se caracterizam por possuir uma série de repetições de seqüências curtas de nucleotídeos (1 a 6 pb) que se repetem seguidamente na molécula de DNA ("tandem"). Essas regiões, não codantes, cuja sua origem e função, não estão bem claras. Os microsatélites apresentam, contudo, uma particularidade interessante. Entre dois indivíduos o número de vezes que aparece a seqüência básica é muito variável e pode diferir entre indivíduos. Portanto, ao se analisar essas regiões, é possível identificar diferenças entre eles. Essa característica dos microsatélites foi utilizada para diferenciar duas cultivares de soja que fizeram parte de um estudo de herança de resistência ao vírus da necrose da haste, uma doença que tem provocado significativas perdas em lavouras de soja. Do cruzamento

entre uma cultivar resistente (Pintado) com outra suscetível (CD 206), foi observada, na geração F_2 , uma proporção de três plantas resistentes para uma planta suscetível, na maioria das linhagens derivadas de diferentes plantas F_1 . Entretanto, algumas dessas linhagens não apresentavam esse padrão de segregação. Ao se procurar determinar a causa dessa variação, especulou-se se na geração F_2 poderiam existir plantas oriundas de autofecundação. Microsatélites que apresentavam ampliações específicas para cada um dos pais foram identificados e utilizados, não se constatando a existência de plantas originárias de semente proveniente de autofecundação. A razão para a alteração observada continua sendo investigada. Este trabalho permitiu também identificar diferentes microsatélites, específicos para as duas cultivares citadas e que serão utilizados na obtenção de marcadores moleculares para detecção de gene de resistência ao VNHS.

Referências

- AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; CREAGAN, P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, v.132, p.1131-1139, 1992.
- CREGAN, P., JARVIK, T., BUSH, A.L., SHOEMAKER, R.C., LARK, K.G., HHALER, A.L., VANTOI, T.T., LOHNES, D.G., CHUNG, J., SPECTH, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean. **Crop Science** v39, p. 1464-1490. 1999.
- KEIM, W., OLSON, P.T.C.; SHOEMAKER, R.C. A rapid protocol for isolating soybean DNA. **Soybean Genetics Newsletter**, v.15, p.150-152, 1988.
- WEBER, J.L., AND P.E. MAY. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymera chain reaction. **Am. J. Hum. Genet.** 44:388-396.
- LITT, M., AND J. A. LUTY. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genet.** 44:397-401.

TAUTZ, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucl. Acids Res.**v 17 p.6463-6471.

JEFFREYS, A. J., V. Wilson, S.L. Thein. "Hypervariable minisatellite regions in human DNA," **Nature**, 314(6006):67-73, 1985.