

Caracterização de genes análogos de resistência a doenças em soja

PIOVEZANI, A.R.¹; PEREIRA, R.M.²; MARIN, S.R.R.²; ABDELNOOR, R.V.²

¹Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP/CLM, rusiska@cnpso.embrapa.br; ²Embrapa Soja

A soja é o principal produto das exportações do agronegócio brasileiro, o que torna indispensável a otimização do seu cultivo. Devido às perdas ocasionadas por fatores bióticos tais como a ferrugem-asiática, fazem-se necessários estudos e pesquisas que possam buscar soluções e alternativas para o combate dessa doença. Análogos de genes de resistência (RGAs) podem contribuir para a busca e entendimento de polimorfismos genéticos responsáveis pelo desenvolvimento de variedades resistentes a doenças, visto que são marcadores genéticos baseados em motivos conservados e que, frequentemente, podem mapear próximos a genes de resistência (genes-R) conhecidos (Amaral et al., 2006). Genes-R podem ser identificados por meio da busca em bancos de dados que contenham sequências gênicas expressas, conhecidas como *Expressed Sequence Tags* (ESTs).

Dessa forma, caracterizamos genes em soja com domínios de resistência a doenças, por meio da identificação de polimorfismos de base única (SNPs) e/ou pequenas inserções e deleções (InDels).

A busca por genes análogos de resistência a doenças foi realizada com base em domínios protéicos conservados como TIR (*Toll/interleukin-1 receptor*), NBS (*Nucleotide Binding Site*), LRR (*Leucine Repeat*), CC

(*Coiled Coil*) e LZ (*Leucine Zipper*). Foi utilizado como referência o banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e o uso da ferramenta BLAST para alinhamento e verificação de analogia com o genoma da soja. *Primers* específicos para cada gene foram desenhados com o uso do software Vector NTI e, em seguida, procedeu-se a amplificação do DNA da cultivar MG/BR 46 (Conquista). A confirmação das bandas de interesse foi obtida por visualização em gel de agarose 1 % solubilizado em tampão TBE 1X, corado com brometo de etídio a 10 %.

Os fragmentos foram purificados utilizando-se o kit de eluição Pure Link (INVITROGEN) e clonados no plasmídeo comercial *pGEM T-Easy Vector System* (PROMEGA), com ambos processos acompanhados de instruções do fabricante. O processo de transformação via eletroporação utilizou células DH5 - α (*Escherichia coli*), e a digestão com os reagentes segundo protocolo da QIAGEN. Os clones foram sequenciados com o Kit *Big Dye PCR sequencing kit* (APPLIED BIOSYSTEMS), no equipamento ABI 3100 (APPLIED BIOSYSTEMS), nas duas direções, utilizando os *primers* universais presentes no vetor. Compararam-se as sequências com o banco de dados de ESTs, para confirmação do lócus amplificado.

Selecionaram-se 18 sequências pertencentes a genes caracterizados como análogos de resistência em soja e, também, a partir das espécies *Arachis hypogea*, *Beta vulgaris*, *Cicer arietinum*, *Glycine soja*, *Phaseolus coccineus* e *Phaseolus vulgaris* (Tabela 1). As sequências dessas espécies foram comparadas com o genoma da soja para identificação de regiões com similaridade. Dessas 18 regiões amplificadas no genoma da soja, 12 foram confirmadas como tendo amplificado o lócus esperado. Esses genes estão envolvidos em diferentes vias metabólicas, responsáveis pela resposta fisiológica à resistência e/ou à tolerância a doenças de diferentes organismos.

Esses genes selecionados serão, agora, avaliados em cinco genótipos contrastantes quanto à reação a doenças na soja, mais especificamente ferrugem-asiática e nematóides. As sequências de cada gene, para os seis genótipos, serão comparadas visando à identificação de SNPs e/ou InDels. Os polimorfismos identificados nos análogos de genes de

resistência serão importantes para o mapeamento e identificação de novos genes de resistência a doenças, o que poderá facilitar a clonagem dos mesmos, além de serem úteis, também, para seleção assistida por marcadores e em estudos de associação genética.

Tabela 1. Genes selecionados como análogo de resistência a doenças.

Número de Acesso - NCBI	Organismo	Amplicon (pb)	Descrição
EE124077.1	<i>Arachis hypogaea</i>	118	Similar à proteína responsável por resistência a doenças
EE126415.1	<i>Arachis hypogaea</i>	102	Similar à proteína responsável por resistência a doenças
BU089551.1	<i>Beta vulgaris</i>	115	Gene análogo de resistência
BG046873	<i>Glicine soja</i>	503	Gene análogo de resistência
BU083075	<i>Glycine max</i>	377	Similar à proteína responsável por resistência a doenças
BE347792.1	<i>Glycine max</i>	437	Similar à proteína responsável por resistência a doenças
BG727073	<i>Glycine max</i>	405	Similar à proteína de resistência a doenças
BI316724.1	<i>Glycine max</i>	472	Similar à proteína homóloga de resistência a doenças
BI972283.1	<i>Glycine max</i>	494	Similar à proteína homóloga de resistência a doenças
BM891694.1	<i>Glycine max</i>	149	Similar à proteína semelhante à RPP5 de resistência a doenças
BU577478	<i>Glycine max</i>	483	Similar à proteína de resistência a doenças
CV997232	<i>Glycine max</i>	595	Identificado em biblioteca subtrativa de soja para resistência a doenças
CV997236.1	<i>Glycine max</i>	411	Identificado em biblioteca subtrativa de soja para resistência a doenças
BE209826	<i>Glycine max</i>	535	Similar à proteína responsável por resistência a doenças
CV793593.1	<i>Cicer arietinum</i>	140	Similar à proteína de resistência a doenças
CA909567	<i>Phaseolus coccineus</i>	574	Similar à proteína responsável por resistência a doenças
CA909573.1	<i>Phaseolus coccineus</i>	129	Similar à proteína relacionada à resistência a doenças
FE898918.1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	279	Similar à proteína relacionada à resistência a doenças/ Domínio LRR

Referências

AMARAL, P. P. R.; ALVES, P. C. M.; MARTINS, N. F.; SILVA, F. R.; CAPDEVILLE, G.; JUNIOR, M. T. S. Identification and characterization of a resistance gene analog (RGA) from the Caricaceae Dumort family. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 3, 2006.