

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.¹; CATELLI, L.L.²; MARIN, S.R.R.²; SOARES, R.M.²; ARIAS, C.A.A.²;
MARCELINO-GUIMARÃES, F.C.²; ABDELNOOR, R.V.².

¹ Bolsista Mestrado CAPES, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR; e-mail:
ximelles@hotmail.com

² 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 F₂ 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 F₂, 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 (χ^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 (χ^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 χ^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 F₂.

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

*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_{2,3} 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 F₂, 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

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.