



FERTBIO 2012

A responsabilidade socioambiental da pesquisa agrícola
17 a 21 de Setembro - Centro de Convenções - Maceió/Alagoas

Validação da Metodologia de Caracterização Molecular de Cultivares de Soja por Meio de Marcadores Microssatélites

Talita Busulini Mmartins⁽¹⁾; Adalgisa Ribeiro Torres⁽²⁾; Noéle Giacomini Lemos⁽³⁾; Maria Aparecida dos Santos⁽⁴⁾; Anna Karolina Grunvald⁽⁵⁾; Mariangela Hungria⁽⁶⁾

¹ Graduada em Ciências Biológicas pela Faculdade de Apucarana, FAP, Apucarana, PR. Bolsista DTI-1 da Embrapa Soja, Rod. Carlos João Strass, Warta, Londrina, PR. Laboratório de Biotecnologia do Solo. E-mail: tali_bmartins@hotmail.com

² Dra. em Genética e Melhoramento de Plantas, USP. Pesquisadora bolsista da Embrapa Soja, Londrina, PR. Laboratório de Biotecnologia do Solo. E-mail: adalgisa@cnpso.embrapa.br

³ Dra. em Genética e Melhoramento de Plantas, UEM. Pesquisadora bolsista da Embrapa Soja, Londrina, PR. Laboratório de Biotecnologia do Solo. E-mail: giacomini3@hotmail.com

⁴ Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, USP. Pesquisadora da Pioneer Sementes, Formosa, DF. E-mail: mariaaparecida.ciapsan@gmail.com

⁵ Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, UEL. Pesquisadora bolsista da Embrapa Soja. E-mail: karolgrunvald@hotmail.com

⁶ Pós-Doutora Pesquisadora da Embrapa Soja, Londrina, PR. Laboratório de Biotecnologia do Solo. E-mail: hungria@cnpso.embrapa.br

RESUMO – A soja [*Glycine max* (L) Merrill] representa a leguminosa mais importante cultivada no mundo, sendo o Brasil o segundo maior produtor, superado apenas pelos Estados Unidos. Apesar da importância sócio-econômica, a soja apresenta uma base genética restrita, com baixo nível de polimorfismo genético, dificultando a identificação de cultivares por meio de descritores morfológicos. Diversos marcadores moleculares vêm sendo empregados em estudos de diversidade genética da soja, e resultados promissores estão sendo obtidos com os marcadores microssatélites. Este trabalho teve como objetivo avaliar o uso de marcadores microssatélites para a detecção de polimorfismo genotípico em soja. Noventa e seis cultivares comerciais foram avaliadas com quatro marcadores microssatélites localizados em quatro grupos distintos de ligação do genoma da soja. O DNA foi extraído a partir de folhas jovens, maceradas em nitrogênio líquido, procedendo-se então às reações de amplificação com os *primers* selecionados. Os fragmentos foram separados por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida a 10%. Todos os marcadores apresentaram polimorfismo entre as cultivares analisadas, e o número de alelos variou de dois a sete, mostrando que a metodologia é eficaz para a detecção de polimorfismo genético em cultivares de soja comercializadas no Brasil.

Palavras-chave: *Glycine max*; soja; SSR; variabilidade genética

INTRODUÇÃO - A soja [*Glycine max* (L.) Merrill], é uma planta originária da China, considerada a mais importante leguminosa cultivada no mundo (Gomes et al., 1990). Na década de 1970, ocorreu uma grande expansão da cultura no Brasil devido ao interesse da indústria de óleo e à demanda do mercado internacional.

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2011), o Brasil é, atualmente, o segundo maior produtor de soja, sendo que na safra de 2010/2011 foram produzidos, aproximadamente, 75 milhões de toneladas de grãos de soja, superados somente pelos Estados Unidos, que obtiveram uma produção superior a 90 milhões de toneladas.

Esses níveis de produção só foram possíveis graças aos avanços tecnológicos da cadeia produtiva dessa oleaginosa. Dentre os avanços, destaca-se o melhoramento genético de plantas, que possibilitou o plantio em áreas que não eram apropriadas para o cultivo de algumas variedades. A biotecnologia também tem desempenhado um papel primordial na cadeia produtiva de soja, com técnicas mais avançadas, como o uso de marcadores moleculares, que auxiliam os programas de melhoramento genético para o desenvolvimento de variedades com elevada produtividade, adaptadas a diversos ambientes e resistentes a doenças.

Com a expansão da cultura da soja no Brasil, hoje é grande o portfólio de cultivares disponíveis para a comercialização. A base genética da soja no Brasil, porém, é restrita (Hiromoto e Vello, 1986). Com isso, o surgimento de novas cultivares dificulta cada vez mais a distinção entre estas e as cultivares já existentes, com base nos descritores morfológicos, pois geralmente possuem muitas características em comum (Oliveira, 2009). Desta forma, a caracterização genética de cultivares por meio da utilização de marcadores moleculares contribui para a criação de um banco de dados útil nos processos de caracterização e lançamento de novas cultivares comerciais.

Dentre os marcadores moleculares disponíveis, os microssatélites, ou SSR (*Simple Sequence Repeat*) têm apresentado resultados promissores para a caracterização

e avaliação da variabilidade genética, pois são codominantes, multialélicos, reprodutíveis e amplificados via reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) (Mullis e Faloona, 1987). A utilização desses marcadores possibilita identificar o padrão de genótipos com potencial comercial, facilitando estudos futuros.

O objetivo deste estudo foi avaliar a metodologia de caracterização da diversidade genética entre cultivares comerciais de soja por meio do uso de marcadores microssatélites, verificando a eficácia desses marcadores para a detecção de polimorfismo genético.

MATERIAL E MÉTODOS - O estudo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia dos Solos da Embrapa Soja, em Londrina-PR. Foram analisadas 96 cultivares de soja, comercializadas atualmente no Brasil e desenvolvidas por instituições públicas e privadas (Tabela 1).

Dois sementes de cada cultivar de soja foram semeadas em vasos plásticos contendo 1 kg de solo. O primeiro trifólio foi coletado, congelado em nitrogênio líquido, e armazenado a -80°C para extração de DNA. O DNA foi extraído de acordo com método descrito por (Keim et al. 1988). Aproximadamente 2 g de folhas foram triturados com almofariz e pistilo, em presença de N₂ líquido. Cada macerado foi transferido para um microtubo de 1,5 mL, adicionado de 700 µL de tampão de extração [Tris-HCl 50 mM, (pH 8,0), contendo EDTA 50 mM, NaCl 0,7 M, e 2-mercaptoetanol 1% (v/v)]. A seguir, foi adicionado CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*) 1% (w/v) e os tubos foram incubados a 65°C por uma hora. As proteínas foram então extraídas pela adição de um volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), seguida de centrifugação a 3.500 x g por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, e os ácidos nucleicos foram precipitados pela adição de 2/3 volumes de isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos a 8°C durante a noite. A seguir, uma nova centrifugação a 3.500 x g foi realizada, o pélete do tubo foi lavado com etanol 70% (v/v) gelado, secado a vácuo e ressuspenso em TE [Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, (pH 8,0)]. O RNA foi removido pela adição de RNase (40 µg/mL e incubação a 37°C por 30 min). O DNA foi precipitado pela adição de dois volumes de etanol 95% (v/v) gelado e a centrifugação a 3.500 x g por 10 min. O pélete final foi lavado com etanol 70%, seco a vácuo e ressuspenso em 200 µL de TE. A qualidade e a concentração do DNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL). Foram feitas diluições para atingir a concentração final de 10 ng/µL de DNA, em placa de 96 poços.

Para as amplificações por PCR foram utilizados quatro marcadores microssatélites (Tabela 2), desenvolvidos por (Cregan et al., 1999) e estimados como possuindo alto valor de índice de polimorfismo (*Polymorphic Index Content* - PIC). Eles se localizam em quatro dos 20 grupos de ligação existentes em soja.

As reações de amplificação por PCR foram realizadas em um volume final de 10 µL contendo: tampão de PCR 1X [Tris-HCl 2,5 mM (pH 8,3) e KCl 62,5 mM]; 2,5 mM de MgCl₂; 125 µM de cada dNTP; 0,2 µM de cada oligonucleotídeo (*primer*) (*forward* e *reverse*), uma

unidade de Taq DNA polimerase e 20 ng de DNA genômico. As reações foram conduzidas em um termociclador Veriti 96 wells (Applied Biosystems), utilizando um ciclo iniciado com 7 min a 95°C, seguido de 29 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C e 1 min a 72°C, e elongação final de 7 min a 72°C. Os fragmentos foram separados por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (29:1, acrilamida:bis-acrilamida) a 10%. As amostras foram submetidas a um campo elétrico de 320 V por 3 h, coradas em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL), fotografadas sob luz UV com câmera Kodak CD 120 em um transluminador, com software Kodak Digital Scienc 1D (Eastman Kodak Company). Para comparar os tamanhos dos fragmentos, foi usado o marcador de peso molecular 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Fragmentos de diferentes tamanhos foram considerados como diferentes alelos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO - Os marcadores microssatélites utilizados apresentaram polimorfismo, com um total de 24 alelos por locus, sendo que o número de alelos variou de dois a sete, e o índice de polimorfismo (*Polymorphism index content* – PIC) variou de 0,66 a 0,69. O tamanho dos alelos identificados variou entre 200 e 521 pares de bases (pb) (Tabela 2). Foi possível observar polimorfismo entre as cultivares de soja avaliadas. Essas informações são úteis para se identificar os marcadores mais informativos, ou seja, que podem ser utilizados em testes de parentesco entre cultivares. Consequentemente, os marcadores Satt251, Satt432, Satt451 e Satt478 podem ser considerados potenciais marcadores para caracterização e diferenciação de cultivares de soja, uma vez que possuem alto índice de polimorfismo (PIC).

O PIC fornece uma estimativa do poder discriminatório de um locus, por considerar não somente o número de alelos expressos, mas também a frequência relativa desses alelos. Valores de PIC variam de 0 (monomórficos) a 1 (altamente discriminativos, com muitos alelos com frequências iguais). Por exemplo, um marcador para um locus que pode revelar cinco alelos, que podem ser encontrados em baixa frequência (por exemplo, frequência 0,9), possuirá menor capacidade discriminatória que um locus que possui cinco alelos, mas esses alelos são encontrados em maior frequência (Smith et al., 1997).

O processo de inserção de cultivares oriundas dos Estados Unidos no Brasil acarretou na geração de materiais de uma base genética estreita, fato que tem preocupado os melhoristas há algumas décadas. A diversidade genética em soja tem sido estudada com base em características morfológicas, coeficiente de parentesco, isozimas e marcadores moleculares do tipo RFLP, RAPD, AFLP e microssatélites (Gizlice et al., 1993; Maughan et al., 1996; Gerber et al., 1999; Wobbus et al., 2000).

Priolli et al. (2010) identificaram 168 cultivares brasileiras de soja avaliadas com 18 marcadores microssatélites, tendo uma média de 5,06 alelos por locus. Vieira et al. (2009b), por sua vez, ao estudarem a diversidade genética entre 53 cultivares de soja, com 53 marcadores microssatélites, detectaram 124 alelos, com

média de 2,34 alelos por locus. Os valores de PIC variaram entre 0,16 e 0,66.

O número de marcadores necessários para detectar com precisão as informações genéticas não está claro (Priolli et al., 2010). Zhivotovsky e Feldman, (1995) afirmam que são necessários centenas de marcadores para se avaliar informação genética entre muitos indivíduos. No entanto, Powell et al. (1996) apontam que poucos marcadores são suficientes para revelar polimorfismo em soja.

No presente estudo, os quatro marcadores microssatélites utilizados revelaram polimorfismo entre as 96 cultivares de soja avaliadas. Constatou-se, portanto, a eficácia dessa metodologia para a avaliação da diversidade genética da soja, mesmo em materiais com base genética estreita, bem como para a detecção de parentesco entre cultivares de soja.

CONCLUSÕES - As técnicas de marcadores moleculares ampliaram de forma drástica o número de marcadores genéticos disponíveis, representando uma poderosa ferramenta para ser utilizada no melhoramento de plantas.

A diversidade genotípica de um conjunto de cultivares de soja que estão no mercado atualmente e que estão sendo utilizados em um projeto de mapeamento associativo da Embrapa soja foi avaliada. Entre as características de interesse dessas cultivares estão o teor de proteína e de óleo e a fixação biológica de nitrogênio.

Os marcadores Satt 251 e Satt 478 apresentaram um alto grau de polimorfismo, indicando alto potencial marcador para caracterização e diferenciação de cultivares de soja.

AGRADECIMENTOS - Ao CNPq, por bolsas de DTI-1 (T.B. Martins), SET 3A (A.R. Torres, M.A. Santos), doutorado (N. G. Lemos) e pesquisa (M. Hungria). Pesquisa financiada parcialmente com recursos do CNPq-Repensa (577933/2008-6 e 562008/2010-1).

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, J.L. **A pesquisa agropecuária no Brasil**. Série Ciência e Tecnologia no Brasil, Escola de Administração de Empresas de São Paulo/FVG, p.63, 1993.

BORÉM, A. Escape gênico: os riscos do escape gênico da soja no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.10, p.101-107, 1999.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: grãos**. Oitavo levantamento, Maio. 2011. Brasília: CONAB, 2011.

CREGAN, P.B.; JARVIK, T.; BUSH, A.L.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; KAHLER, A.L.; KAYA, N.; VAN TOAL,

T.T.; LOHNES, D.G.; CHUNG, J.; SPECHT, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, v.39, p.1464 - 1491, 1999.

HIROMOTO, D.M.; VELLO, N.A. The genetic base of Brazilian soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivars. **Brazilian Journal of Genetics**, v.2, p.295-306, 1986.

GERBER, S.; FABRE, F.; PLANCHON, C. Genetics of seed quality in soybean analysed by capillary gel electrophoresis. **Plant Science**, v.152, p.181-189, 1999.

GOMES, P. **A soja**. 5. ed. Nobel, São Paulo, 1990, 152p.

GIZLICE, Z.; CARTER, T.E.; BURTON, J.W. Genetic diversity in North american soybean: I. Multivariate analysis of founding stock and relation to coefficient of parentage. **Crop Science**, v.33, p.314-620, 1993.

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

MAUGHAN, P.J.; MARROF, M.A. S.; BUSS, G.R.; HUESTIS, G.M. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p.392-401, 1996.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v.55, p.335-350, 1987.

OLIVEIRA, M.B. **Caracterização molecular de cultivares de soja utilizando marcadores microssatélites genotipados em sequenciador automático**. 2009. 88f. Dissertação (Mestrado) – Umuarama, Universidade do Paraná, 2009.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; MCDEVITT, R.; VENDRAMIN, G.G.; RAFASLKI, J.A. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: applications to population genetics of pines. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.92, p.7759-7763, 1995.

PRIOLLI, R.H.G.; PINHEIRO, J.B.; ZUCCHI, M.I.; BAJAY, M.; VELLO, N. A. Genetic Diversity among Brazilian Soybean Cultivars Base on SSR Loci and Pedigree Data. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, p.519-531, 2010.

VIEIRA, E.S.N.; SCHUSTER, I.; DA SILVA, R.B.; OLIVEIRA, M.A.R. Variabilidade genética em cultivares de soja determinada com marcadores microssatélites em gel de agarose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.1460-1466, 2009.

ZHIVOTOVSKY, L.A.; FELDMAN, M.W. Microsatellite variability and genetic distances. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.92, p.11549-11552, 1995.

Tabela 1. Genótipos de soja utilizados.

M 6707 RR	UFV 2003	TMG 115 RR
FEPAGRO 37 RR	Tracajá	CD 217
BRS 246 RR	Vencedora	BRS Piraíba
BRS 245 RR	Campo Mourão	BRS - MG Garantia
M 7639 RR	CD 229 RR	Hartwig
M 7211 RR	FT Cometa	TS05-1557
CD 240 RR	Valiosa	TC05-1415
TMG 125 RR	M 8230	TC07-8681
M-SOY 6101	M 8222	CC07-2974
M 7908 RR	BRS 231	YC05-001
M-SOY 8001	CD 201	TC07-4137
Pintado	CD 237 RR	TC05-1352
Arara Azul	8766 RR	CC07-1435
BRS 185	FUNDACEP 59 RR	CC07-1471
BRS 233	P98Y40	CC07-5616
IAC - 17	P98Y51	CC07-4226
FT 101	CD 202	CC07-3763
FT 107	NK 7074	TC07-9443
FT Cristalina	BRS Jaciara RR	CC07-5255
MSOY 108	Espoerança	LC07-2833
MSOY 8914	M 8867 RR	PC07-10286
MSOY 8870	IAC Foscarim 3	TC07-3858
MSOY 8777	P98Y11	CC07-3924
MSOY 8757	M 9056	TC07-10857
MSOY 9001	BRS Chapadões	TC07-10853
MSOY 9350	M 9144 RR	CC07-0211
P98N81	P98Y70	LC07-1270
Renascença	CD 219 RR	TC07-11957
Sambaíba	Tabarana	CC07-2975
Sophia RR	BR 80 - 14 - 887	CC07-7683
UFV 2010	DM 309	CC07-7147
UFV 2009	BRS - MG 7505 RR	CC07-4634

Tabela 2. Marcadores microssatélites utilizados para caracterizar 96 cultivares soja, além de alelos identificados, frequência de alelos e índice de conteúdo polimórfico (PIC) por marcador.

Nome	Sequência 5' - 3'	Grupo de Ligação	Total de alelos	Variação de tamanhos de alelos (pb)	Frequência dos alelos						PIC
Satt431	ATTATTATTATTATTATT	J	5	490-521	0,17	0,16	0,19	0,47	0,01	-	0,69
Satt251	ATTATTATTATTATT	B1	6	250-320	0,05	0,01	0,08	0,03	0,47	0,10	0,69
Satt478	ATTATTATTATTATTAT	O	6	290-320	0,04	0,25	0,43	0,01	0,25	0,03	0,69
Satt571	ATTATTATTATTAT	I	7	200-330	0,05	0,01	0,02	0,45	0,38	0,08	0,66
Total	-	-	24	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	-	-	6,0	-	-	-	-	-	-	-	0,68