

# BUSCA DE POLIMORFISMO DE GENES DE INTERESSE AGRONÔMICO E MARCADORES AFLP E TRAP PARA UTILIZAÇÃO EM MAPEAMENTO PARA RESISTÊNCIA À FERRUGEM EM SOJA

Bajay, MM<sup>1</sup>; Pinheiro, JB<sup>3</sup>; Zucchi, MI<sup>2</sup>

Nº 0700022

## Resumo

A soja (*Glycine max*) é a cultura de maior importância econômica para o Brasil. Atualmente o maior desafio para o melhoramento genético da soja é a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), que surgiu na safra 2000/2001, e desde então tem causado prejuízos significativos na produção brasileira. Uma população segregante (F<sub>2</sub>), obtida a partir do cruzamento entre CD208 e Bing Nan, foi caracterizada utilizando 16 combinações de marcadores AFLP e 4 combinações de marcadores TRAP. Marcadores moleculares do tipo AFLP (Amplified restriction fragment length polymorphism) e TRAP (Targeted Region Amplification Polymorphism) são marcadores multilocos e com grande cobertura do genoma. O marcador TRAP utiliza um *primer* fixo desenhado a partir de seqüências ESTs, neste caso associadas com genes de resistência (RGA), e outro *primer* arbitrário. Este trabalho identificou e caracterizou seqüências AFLP e TRAP relacionadas com a expressão de genes envolvidos na resistência à ferrugem asiática, gerando assim informações para a seleção assistida nos programas de melhoramento genético da soja. Dentre as 16 combinações de AFLP, foram encontrados 101 locos monomórficos e 140 locos polimórficos. A partir das quatro combinações TRAP foram gerados 79 locos, sendo que duas combinações de TRAP se apresentaram eficientes na caracterização e diferenciação da população segregante. O polimorfismo encontrado será utilizado para se verificar a associação do fenótipo quanto a reação a esta importante doença da soja, com os locos dos marcadores moleculares obtidos.

1. Bolsista CNPq: Graduação biologia, IB/UNICAMP, Campinas-SP, miklosbajay@yahoo.com.br

2. Orientador: Pesquisador, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Recursos Genéticos Vegetais, Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas-SP

3. Colaborador: Pesquisador, Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ/USP, Piracicaba-SP.

## **Abstract**

The soybean (*Glycine max*) is the culture of biggest economic importance for Brazil. Currently the biggest challenge for the genetic inbreeding of the soybean is the Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi*), that appeared in harvest of 2000/2001, and since then has caused significant damages in the Brazilian production. The segregants population (F<sub>2</sub>), obtained from the crossing between CD208 and Bing Nan, was characterized by the use of 16 combinations of markers AFLP and 4 combinations of markers TRAP. Molecular markers of type AFLP (Amplified restriction fragment length polymorphism) and TRAP (Targeted Region Amplification Polymorphism) are marking multiloci and with a great cover of the genome. Marker TRAP uses to primer fixed drawn from ESTs sequences, in this in case associated with resistance genes (RGA), and other primer arbitrary. This work identified and characterized sequences AFLP and TRAP related with the expression of involved genes in the resistance to the Asian rust, thus providing information for the election attended in the programs of genetic inbreeding of the soybean. Amongst the 16 combinations of AFLP, it had been found 101 monomorphic loci and 140 polymorphic loci. From four combinations TRAP, 79 loci had been generated, so that two combinations of TRAP had been efficient in the characterization and differentiation of the segregants population. The founded polymorphisms will be used to verify the association of the phenotype reaction to this important disease of the soybean, with the loci of the obtained molecular markers.

## **Introdução**

A soja é uma das principais commodities mundiais. Por ser um grão de várias utilidades, tem uma demanda mundial de consumo superior a 180 milhões de toneladas. O Brasil é o segundo maior produtor e exportador de soja.

Atualmente o maior desafio para o melhoramento genético da soja no Brasil é a Ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), que surgiu no Brasil na safra 2000/2001, e a partir daí tem causado prejuízos significativos (custo ferrugem, incluindo perdas e custo com utilização de fungicidas e aplicações), estimados em U\$ 5 bilhões, desde 2002.

Considerando as dificuldades em se combater a ferrugem através de métodos tradicionais, o desenvolvimento de programas de melhoramento, atrelados à utilização de marcadores moleculares é a alternativa mais viável.

Amplified restriction fragment length polymorphism (AFLP) é um marcador molecular multilocos, esta técnica foi desenvolvida por Vos et al. (1995) e têm sido usados para identificar marcadores associados a locos de resistência a doenças. (Becker et al., 1995; Cervera et al., 1996). Sua natureza dominante não é relevante porque a soja é uma espécie autógama, com nível baixíssimo de heterozigose.

Foi utilizado um novo marcador molecular: TRAP (*Targed Region Amplification Polymorphism*), com alto poder de aplicação, que utiliza primers fixos projetados para seqüências EST, associado com genes de resistência (RGA) (Miklas et al, 2006).

A importância deste projeto se mostra na necessidade da identificação e caracterização de seqüências AFLP e TRAP relacionadas com a expressão de genes envolvidos na resistência à ferrugem, para possibilitar uma seleção assistida por marcadores moleculares no melhoramento genético da soja. Além disso, as informações obtidas possibilitarão se dispor dessas seqüências para alocação das mesmas, posteriormente em mapa transcricional.

## **Material e Métodos**

O protocolo para AFLP descrito por Vos et al. (1995) foi utilizado para gerar fragmentos polimórficos. A partir da digestão conjunta de DNA genômico total a 50 ng/μL pelas enzimas de restrição *EcoRI* e *MseI* são gerados fragmentos cujas extremidades são imediatamente ligadas a seqüências adaptadoras específicas, através da enzima T4 DNA ligase. Pré-amplificações são realizadas em termociclador com *primers* que contêm as seqüências complementares aos adaptadores. Em seguida, realiza-se uma segunda etapa de amplificação em termociclador, denominada amplificação seletiva, onde os primers são derivados de *EcoRI* e de *MseI* e também possuem a seqüência do adaptador, mas com diferenças nas três últimas bases da extremidade 3'. Os produtos de PCR são separados em condições desnaturantes em gel de poliacríalmida 5%, 7M de uréia e tampão TBE (1X) por cerca de 3 horas a 50 W. O protocolo para TRAP citado por Hu & Vick, 2003, foi utilizado a fim de obter fragmentos polimórficos. Os primers foram construídos de acordo com o seguinte procedimento: (1) identificação da seqüência de interesse no data base da Soja relacionada com resistência a doenças (RGAs) (2) desenho de primers com as seqüências ESTs conhecidas para utilizar na posição *Foward* (3) desenho de primer arbitrário para utilizar na posição *Reverse* com seqüência ricas em CG ou AT segundo Li & Quiros, 2001. A reação de PCR será feita conforme Hu & Vick, 2003, que conterà: 60-100 ng de DNA molde, 3 pM de cada primer arbitrário e o fixo (gene expresso); 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 μM de dNTP; 1U de Taq polimerase. O protocolo da PCR foi de 95°C por 10 min seguidos de 35 ciclos de: 95°C por 45 s, 35°C por 45 s e 72°C por 1min, seguidos por uma extensão final de 72°C por 60 min. Esta extensão final foi utilizada para a corrigir alguns fragmentos pela adição de nucleotídeos pela Taq polymerase.

A eletroforese foi feita em gel de poliacrilamida 6,5% corado com nitrato de prata. Foi extraído o DNA do P1, P2, F1, BULKS, BULKR e população segregante, sendo estes cedidos pelo Departamento de Genética da ESALQ/USP em colaboração com a Fundação

Mato Grosso. O protocolo de extração de DNA utilizado foi o descrito por Doyle & Doyle (1990).

A partir da genotipagem foi verificado o polimorfismo entre os parentais e os BULKs. Os marcadores que apresentaram polimorfismo foram utilizados em toda população segregante.

## Resultados

Foram testadas 20 combinações de AFLP, dentre elas 16 amplificaram, foram encontrados 101 locos monomórficos e 140 locos polimórficos como mostra a tabela 1 e figura 1A.

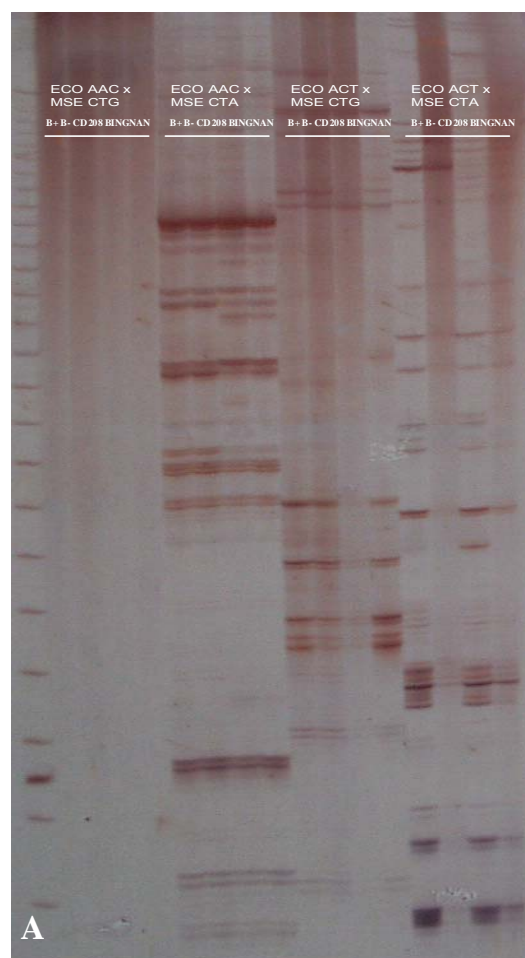
A partir das 7 combinações de TRAP que amplificaram, escolhemos 4 delas para testar na população segregante. Duas combinações (Soy176 x TGA e SoyPR x TGA) tiveram todos os locos monomórficos, entretanto duas combinações de TRAP (SGYGY x TGA e SERIN x TGA) figura 1B, se apresentaram eficientes na caracterização e diferenciação da população segregante. Como indicado na tabela 2.

**TABELA 1.** Número de locos encontrados com as combinações de AFLP utilizadas no estudo.

Combinações AFLP	Locos polimórficos	Locos monomórficos	Total
ECO AAC x MSE CTA	4	13	17
ECO ACT x MSE CTG	1	14	15
ECO ACT x MSE CTA	2	16	18
ECO ACA x MSE CAT	3	4	7
ECO ACC x MSE CTT	7	3	10
ECO ACC x MSE CAT	12	2	14
ECO ACT x MSE CAA	9	4	13
ECO ACT x MSE CAG	14	1	15
ECO AAC x MSE CAA	12	11	23
ECO AAC x MSE CAG	0	9	9
ECO AAC x MSE CAT	4	9	13
ECO AAC x MSE CTT	5	5	10
ECO ACT x MSE CAC	25	6	31
ECO ACT x MSE CTC	13	1	14
ECO ACA x MSE CAC	8	3	11
ECO ACA x MSE CTG	12	9	21
Média	8,1875	6,875	15,06

**TABELA 2.** Número de locos encontrados com as combinações de TRAP utilizadas no estudo.

Combinações TRAP	Locos polimórficos	Locos monomórficos	Total
SOY 176 x TGA	0	22	22
SOY PR x TGA	0	23	23
SGYGY x TGA	1	21	22
SERINA x TGA	1	11	12
Média	0,5	19,25	19,75



**FIGURA1.** A) Perfil de um gel de poliacrilamida contendo 8 combinações de AFLP utilizadas no estudo. B) Perfil de um gel de poliacrilamida contendo 2 combinações polimórficas de TRAP utilizadas no estudo.

## Discussão

A média de fragmentos AFLP que foi encontrado por par de combinação primer/enzima (15) foi menor do que a média encontrada por outros autores como Satyavathi et. al, 2006, que analisando 72 cultivares indianas de soja, encontraram em média 105 locos polimórficos por combinação primer/enzima.

Nossos resultados estão mais condizentes com os de Bonato et al, 2006, que analisando o germoplasma brasileiro de soja encontrou 13 locos polimórficos por combinação de AFLP.

Quanto ao perfil apresentado pelo marcador TRAP corrobora com os resultados de autores como Miklas et al e Hu et al 2003. Onde as combinações de primer fixo e arbitrário apresentaram um padrão similar ao encontrado neste estudo, gerando poucos locos polimórficos. Dos três primers arbitrários AAC, GCA e TGA utilizados no estudo, apenas TGA amplificou fragmentos com o perfil o esperado para marcadores TRAP.

O polimorfismo encontrado será utilizado para verificar a associação do fenótipo quanto a reação a esta importante doença da soja, utilizando os locos dos marcadores moleculares obtidos.

### Referências Bibliográficas

- BECKER, J.; VOS P.; M. KUIPER, SALAMINI F. ; HEUN, M. Combined mapping of AFLP and RLPS markers in barley. *Mol Gen Genet* 249: 65–73, 1995.
- BONATO A. L. V. ; CALVO E. S. ; GERALDI I. O. ; ARIAS C. A. A. Genetic similarity among soybean (*Glycine max* (L) Merrill) cultivars released in Brazil using AFLP markers. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 4, 692-704, 2006.
- CERVERA, M.T., GUSMAO, J.; STEENACKERS, M.; PELEMAN, J.; STORME, V.; BROECK, A. V.; VAN, M. MONTAGU, A.;BOERJAN, W. Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melanospora larici-populina* in *Populus*. *Theor Appl Genet* 93: 733–737. 1996
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA fresh tissue, *Focus*, v. 12, p. 13-15, 1990.
- HU J, VICK B.A. Target region amplification polymorphism, a novel marker technique for plant genotyping. *Plant Mol. Biol. Reporter* 21:289-294, 2003.
- MIKLAS P. N.; JINGUO, H.U.; GRÜNWALD, N. J.; LARSEN K. M; Potential Application of TRAP (Targeted Region Amplified Polymorphism) Markers for Mapping and Tagging Disease Resistance Traits in Common Bean. *Genomics, molecular genetics & biotechnology*, 2006.
- SATYAVATHI, C.T.; BHAT, K.V.; BHARADWAJ, C.; TIWARI, S.P.; CHAUDHURY, V.K. AFLP analysis of genetic diversity in Indian soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] Varieties. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 1069–1079. 2006.
- VOS, P.; R. HOGERS; M. BLEEKER; M. REIJANS; T. VAN DE LEE; M. HORNES; A. FRIJTERS; J. POT; J. PELEMAN; M. KUIPER & M. ZABEAU. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res* 21: 4414–4470. 1995.