

Identificação de Marcadores Moleculares de Microssatélites Associados à Resistência de Genótipos de Soja a *Meloidogyne javanica*

JOÃO FLÁVIO V. SILVA^{1,3}; LUÍS CARLOS B. C. FERRAZ^{2,3}; CARLOS A. A. ARIAS¹
& RICARDO V. ABDELNOOR¹

¹Embrapa-Soja, 86001-970, Londrina, PR, Brasil, E-mail: veloso@cnpso.embrapa.br; ²Universidade de São Paulo, ESALQ, Setor de Nematologia, 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil; ³Bolsistas do CNPq.

Recebido para publicação em 24/11/2000. Aceito em 31/05/2001.

Resumo – Silva, J.F.V.; L.C.C.B.Ferraz; R.V.Abdelnoor & C.A.A.Arias. 2001. Identificação de marcadores moleculares de microssatélites associados à resistência de genótipos de soja a *Meloidogyne javanica*

Marcadores moleculares de microssatélites foram estudados, visando a sua utilização na seleção de plantas de soja com resistência a *M. javanica*. Foram estudados 20 locos na amplificação do DNA oriundo das 120 plantas F₂ obtidas dos cruzamentos entre 'BRS 133' (suscetível) e dois parentais resistentes, 'Coodetec 201' e PI 595099. A escolha desses locos foi feita flanqueando marcadores de RFLP, associados a QTL's, descritos na literatura. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, sob condições de luz e temperatura controlados. As plantas foram conduzidas em tubetes plásticos (4,5 cm de diâmetro e 19 cm de comprimento) contendo substrato esterelizado e inoculadas com 3.000 ovos de *M. javanica*. A avaliação da resistência foi feita 30 dias após a inoculação, através do número de galhas por planta. Para o cruzamento entre 'BRS 133' e 'Coodetec 201', análises de variância mostraram associações significativas entre a média do número de galhas das famílias F₃ e os locos Satt 266 e Sat 133. Apenas o marcador SOYHSP 176 mostrou associação mais próxima ($P = 0,13$) do aceitável para o cruzamento entre 'BRS 133' e PI 595099. Esses resultados corroboram dados de literatura que apontam a existência de QTL's condicionantes de resistência a *M. javanica* próximos aos marcadores de RFLP A725, no grupo de ligação D1b + W, e A806D e A186D/A757V, no grupo de ligação F. Entretanto, os locos aqui detectados (Satt 266, Sat 133 e HSP 176) explicam pouco da variação fenotípica de galhas observada. Assim, outros locos de microssatélites ainda devem ser buscados nessas mesmas regiões genômicas para que possam ser utilizados na seleção assistida de genótipos de soja com resistência a *M. javanica*.

Palavras-chave: resistência, marcadores moleculares, soja, *Meloidogyne javanica*.

Summary - Silva, J.F.V., Ferraz, L.C.C.B., Arias, C.A. & Abdelnoor, R.V. 2001. Microsatellite molecular markers associated to resistance to *Meloidogyne javanica* in soybean genotypes.

Twenty loci of simple sequence repeat (SSR) were used to amplify the DNA of 120 F₂ plants of the crosses 'BRS 133' (susceptible) x 'Coodetec 201' (resistant) and 'BRS 133' x PI 595099 (resistant). The loci are located close to some QTL's on the linkage group D1b + W and F as described in the literature. Each of the F₂ (120) and F₃ (120 families) generations and the parents (60 of each) were screened in a greenhouse for resistance to gall formation. The plants were grown in plastic tubes (4.5 cm in diameter x 19 cm length) filled with methyl bromide-fumigated soil amended with sand. The seedlings were individually inoculated with 3,000 eggs and evaluated by counting the root galls 30 days later.

Analysis of variance indicated significant marker/nematode galls association for Satt 266 and Sat 133 ('BRS 133' x 'Coodetec 201') and HSP 176 ('BRS 133' x PI 595099). This data corroborates the existence of QTL's conferring resistance to *M. javanica* located close to RFLP markers A725 on linkage-group D1b + W, and A806D and A186D/A757V on linkage-group F. However, the loci detected here did not explain much of the total phenotypic variation of the number of galls. Thus, further studies dealing with the evaluation of SSR loci on the same genomic location will be necessary until these markers can be fully applied to assisted selection of soybean genotypes with resistance to *M. javanica*.

Key words: resistance, molecular markers, soybean, *Meloidogyne javanica*

Introdução

Em todos os países sojicultores das regiões tropical ou subtropical, os problemas fitossanitários com nematóides do gênero *Meloidogyne* têm aumentado consideravelmente (Silva, 1998). Esses nematóides já ocorriam no Brasil antes do início do cultivo da soja e têm causado danos crescentes em diversas regiões, como o norte do Rio Grande do Sul, sudoeste e norte do Paraná, sul de São Paulo e Mato Grosso do Sul e em diversos pontos nos Cerrados do Centro-Oeste. A baixa eficiência da rotação de culturas na redução populacional desses parasitos, que em geral podem se reproduzir em grande número de espécies vegetais, e a evidente deficiência de variedades resistentes, especialmente a *Meloidogyne javanica*, adaptadas às diferentes regiões de cultivo no País são as principais razões dessa situação (Silva, 1998).

A seleção de plantas para a resistência a nematóides, assistida por marcadores moleculares pode otimizar os programas de melhoramento (Tamulonis *et al.* 1997a). Microssatélites, também conhecidos como SSR ('Simple-Sequence-Repeat'), entre outras denominações, consistem numa subclasse de DNA repetitivo formada por pequenas seqüências (2 a 5 nucleotídeos) repetidas *em tandem*, tais como (AT)_n, (ATT)_n, etc. A variação no número de repetições (n) dessas seqüências gera uma grande quantidade de polimorfismo, tornando-as bastante atraentes para estudos genéticos (Rongwen *et al.*, 1995). Microssatélites vem sendo utilizados na caracterização de germoplasma de diversas espécies de plantas, principalmente naquelas com baixo nível de polimorfismo. Akagi *et al.*, (1997) fizeram uma análise de cultivares japonesas de arroz, empregando microssatélites e encontraram uma grande diversidade de genes mesmo entre as cultivares altamente relacionadas. Microssatélites disponíveis em soja detectam em média 7 alelos diferentes, sendo que até 23 alelos distintos já foram encontrados para um mesmo loco (Rongwen *et al.*, 1995).

Vários locos controladores de características quantitativas ('QTL') de resistência têm sido detectados formando agregados numa mesma região genômica do grupo de ligação F da soja (Tabela 1). Tamulonis *et al.* (1997a, 1997b) observaram, na região do marcador de RFLP B212, genes de resistência a *M. javanica* e *M. arenaria*, originários das fontes de resistência PI230977 e PI200538, respectivamente. Assim, marcadores moleculares de microssatélite, localizados próximos de regiões genômicas onde foram identificados 'QTL's, foram avaliados como ferramentas para a seleção de plantas de soja com resistência a *M. javanica*. A

obtenção de tais marcas possibilitará a introgressão rápida de genes específicos em programas de melhoramento, acelerando a obtenção de variedades resistentes superiores.

Material & Métodos

Os genótipos de soja PI 595099 e 'Coodetec 201', resistentes a *M. javanica*, foram cruzados com 'BRS 133', parental suscetível. O sucesso dos cruzamentos foi verificado através de marcadores RAPD e fenotípicos.

Foram estudadas 120 famílias F_{2,3}, com 14 repetições, 120 indivíduos F₂ e 60 indivíduos de cada parental para cada cruzamento. Estas gerações foram avaliadas para resistência a *Meloidogyne javanica* em experimentos independentes, em delineamento inteiramente casualizado, e foram conduzidos em casa de vegetação, sob condições de luz (12 horas com luz) e temperatura (25 a 30 °C) controlados.

A população de *M. javanica* utilizada foi originária do Centro Nacional de Pesquisa de Soja da Embrapa (Embrapa Soja) e foi multiplicada em plantas de soja cv. Doko durante todo o período das inoculações, de modo a se dispor sempre de ovos com boa viabilidade. A extração dos ovos das raízes foi feita segundo o protocolo proposto por Hussey & Barker (1973).

Sementes de soja das referidas gerações foram semeadas em tubetes plásticos (com 4,5 cm de diâmetro e 19 cm de comprimento) contendo substrato formado por uma mistura solo : areia (3:1) esterilizada com brometo de metila. Aos 3-4 dias após a emergência, os ovos de *M. javanica* foram depositados no solo, a cerca de 2 cm de profundidade, em dois orifícios feitos próximos ao colo das plântulas, na densidade (= Pi) de 3000 ovos por plântula (Luzzi *et al.*, 1987).

A avaliação da resistência foi feita 30 dias após a inoculação, contando-se o número total de galhas em cada sistema radicular (Kinloch, 1990, 1998; Young, 1998).

A extração do DNA de 120 plantas individuais F₂ e dos parentais, para cada cruzamento, seguiu o protocolo proposto por Keim *et al.* (1988) e a sua pureza foi estimada pela razão entre as leituras espectrofotométricas a 260 nm e 280 nm.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador Perkin Elmer 9600 e foram constituídas de 3,0 µL de DNA molde (10 ng/µL); 6,7 µL de água MilliQ; 2,5 µL de tampão de reação 10x (2,5 mM de Tris-HCl e 62,5 mM de KCl); 1,0 µL de MgCl₂ (50 mM); 1,0 µL de desoxinucleosídeo trifosfato (2,5 mM); 0,2 µL de Taq-

polimerase (5 U/ μ L) e 0,7 μ M dos *primers* F e R (Research Genetics Inc.- Map Pairs™), chegando a um volume final, para cada amostra, de 17 μ L. Esses passos foram repetidos para cada combinação genótipo x marcador microssatélite.

Os programas de termociclagem foram compostos de desnaturação inicial a 94 °C por 7 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 50 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos. Um ciclo de 72 °C por 7 minutos foi feito ao final. O produto da amplificação foi resolvido em gel de 0,7% de agarose (GibcoBRL) e 1,15% de aditivo clarificador de agarose (Synergel), preparado com TBE 1x (0,009 M Tris-borato e 2,0 mM EDTA) e corado com brometo de etídio (6,6 μ g/mL).

Os 22 *primers* utilizados foram escolhidos a partir de banco de dados de DNA de soja (Cregan *et al.*, 1999) e estão localizados nos grupos de ligação D1b + W e F da soja. Estes locos foram escolhidos por flanquear locos de RFLP A806D, A186D, A757V, B212T e R045I, A7252, nos quais QTLs de resistência a *M. javanica* foram detectados por Tamulonis *et al.* (1997b) (Figura 1).

Análises de variância foram realizadas para todas as combinações entre os marcadores polimórficos e o número de galhas, obtido com a média da família F₃, como efeitos principais. Todas as análises estatísticas foram feitas com auxílio do programa SAS.

Resultados & Discussão

A relação entre as leituras espectrofotométricas a 260 nm e 280 nm variou de 1,4 a 2,0 (com média de 1,6) para 'BRS 133' x 'Coodetec 201', e de 1,3 a 2,0 (média de 1,45) para 'BRS 133' x PI 595099. O loco Satt 362 não amplificou os fragmentos de DNA.

Entre os 20 locos analisados, Satt 586, Satt 269, Satt 423, Satt 595, Satt 072, Sat 133, Satt 266 e Satt 216 foram polimórficos para os parentais 'BRS 133' e 'Coodetec 201'. Entretanto, não foram utilizados para amplificação do DNA oriundo das plantas F₂ os locos Satt 586, Satt 269, Satt 595 e Satt 072, em razão da dificuldade em se visualizar as bandas polimórficas. Dessa forma, para esse cruzamento foram analisados os locos Sat 133, Satt 423 e Satt 266.

Para o cruzamento entre 'BRS 133' e PI 595099, os locos Satt 423, SOYHSP 176, Satt 266 e Satt 216 apresentaram polimorfismos entre os parentais, e todos foram utilizados para amplificar o DNA oriundo das plantas F₂. A ligação entre o polimorfismo no loco e a resistência foi aceita

quando houve diferença estatística ($P < 0,01$), para as quais calculou-se o coeficiente de determinação (R^2).

Para o cruzamento entre 'BRS 133' e 'Coodetec 201', análises de variância mostraram associações significativas entre a média do número de galhas das famílias F₃ e os locos Satt 266 e Sat 133. A porcentagem de variação fenotípica explicada por estes locos foram, respectivamente, 7,5% e 6,1%. Para o cruzamento entre 'BRS 133' e PI 595099, não foi observada associação significativa entre a resistência, avaliada a partir do número de galhas, e os locos. Apenas o marcador SOYHSP 176 mostrou associação mais próxima ($P = 0,13$) do aceitável, com R^2 de 1,98%. Este loco está situado a 2,5 cM dos locos de RFLP A186D e A757V e é do tipo dominante.

O loco Satt 266 apresentou bandas polimórficas para os dois cruzamentos estudados. Entretanto, somente para o cruzamento 'BRS 133' x 'Coodetec 201' a sua associação à redução do número de galhas foi significativa. Este marcador é co-dominante e está situado no grupo de ligação D1b + W, distante 62 cM do loco de RFLP A725, desenvolvido por Tamulonis *et al.* (1997b) (Figura 1). Efeitos de dominância no sentido da resistência foram detectados, uma vez que os indivíduos heterozigotos apresentaram a menor média de galhas (Tabela 1). Efeitos de dominância significativos no sentido da resistência também foram detectados no cruzamento entre 'BRS 133' e 'Coodetec 201' através dos testes de médias em genética quantitativa (Silva *et al.*,³). Para esse mesmo cruzamento, também houve associação significativa com a redução do número de galhas para o loco Sat 133, localizado no grupo de ligação F e muito próximo (2,5 cM) dos locos de RFLP A186D e A757V (Tamulonis *et al.*, 1997b). Sat 133 também é do tipo dominante, não sendo possível identificar os heterozigotos para a marca (Tabela 1).

Os alelos oriundos de PI 595099 e 'Coodetec 201' contribuíram, em todos os casos, para a redução do número de galhas.

Conclusões

Esses resultados corroboram aqueles observados por Tamulonis *et al.*, 1997b, onde QTL's associados a resistência foram detectados próximos aos marcadores de RFLP A725, no grupo de ligação D1b + W, e A806D e A186D/A757V, no grupo de ligação F. Entretanto os locos aqui detectados explicam pouco da variação de galhas observada.

Tabela 1. Locos marcadores significativamente associados à redução do número de galhas de plantas F₃ oriundas dos cruzamentos BRS 133 x Coodetec 201 e BRS 133 x PI 595099

Cruzamento	Locos de Microssatélite	R ²	C.V.	SS ¹	SR ²	RR ³	P
BRS 133 x Coodetec 201	Satt 266	7,5%	29%	138,7	115,9	142,2	0,01 **
	Satt 423	1,4%	29%	-	-	-	0,50
	Sat 133	6,1%	29%	131,5	- ⁴	112,15	0,009**
BRS 133 x PI 595099	Satt 266	1,5%	37%	-	-	-	0,41
	Satt 423	1,4%	27%	-	-	-	0,69
	HSP 176	1,98%	37%	155,9	- ⁴	137,7	0,13*
	Satt 216	0,3%	38%	-	-	-	0,85

¹. Número médio de galhas das linhagens homocigotas para os alelos do progenitor suscetível.

². Número médio de galhas das linhagens heterocigotas.

³. Número médio de galhas das linhagens homocigotas para os alelos do progenitor resistente.

⁴. Loco dominante, não sendo possível identificar o heterocigoto.

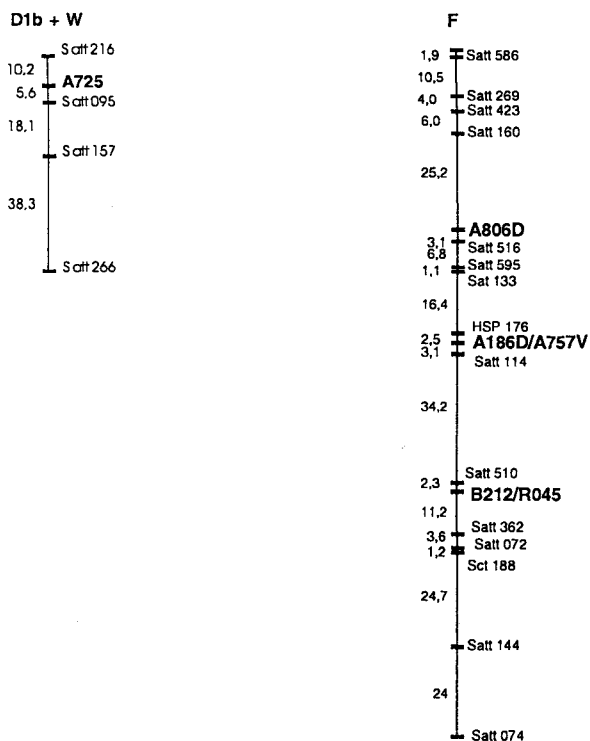


Figura 1. Lado direito: marcadores de microssatélites utilizados, localizados em parte dos grupos de ligação D1b+W e F da soja e, em negrito, marcadores de RFLP (Tamulonis *et al.*, 1997b) associados a resistência a *Meloidogyne javanica*. No lado esquerdo estão indicados as distâncias (cM) entre eles.

Assim, outros locos de microssatélites devem ainda ser estudados nessas mesmas regiões genômicas para que possam ser utilizados na seleção assistida de genótipos de soja com resistência a *M. javanica*. Os genes de resistência situam-se próximos aos locos Sat 133 e Satt 266 para o cruzamento entre 'BRS 133' e 'Coodetec 201', e próximos ao loco HSP 176 para o cruzamento entre 'BRS 133' e PI 595099.

Literatura Citada

- AKAGI, H.; Y. YOKOZEKI; A. INAGAKI; T. FUJIMURA. 1997. Highly polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeats, and a classification of closely related cultivars with these microsatellite loci. *Theor. Appl. Genet.* (94): 61-67.
- CREGAN, P.B.; T. JARVIK; A.L. BUSH; R.C. SHOEMAKER; K.G. LARK; A.L. KAHLER; N. KAYA; T.T. VANTOAI; D.G. LOHNES; J. CHUNG & J.E. SPECHT. 1999. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Science* (39):1464-1490.
- HUSSEY, R.S. & K.R. BARKER, 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp.

- including a new technique. *Plant Dis. Rep.* (57):1025-1028.
- KEIM, P.; T.C. OLSON & R.C. SHOEMAKER. 1988. A rapid protocol for isolating soybean DNA. *Soybean Genetics Newsletter.* (15):150-152.
- KINLOCH, R.A. 1990. Screening for resistance to root-knot nematodes. In: STARR, J.L. 1990. *Methods for evaluating plant species for resistance to plant-parasitic nematodes.* Maryland: Society of Nematologists, p.16-23.
- KINLOCH, R.A. 1998. Soybean. In: K.R. BARKER; G.A. PEDERSON & G.L. WINDHAM. 1998. *Plant and nematode interactions.* Madison: American Society of Agronomy, p.317-334.
- KINLOCH, R.A. 1990. Screening for resistance to root-knot nematodes. In: STARR, J.L. 1990. *Methods for evaluating plant species for resistance to plant-parasitic nematodes.* Maryland: Society of Nematologists, p.16-23.
- KINLOCH, R.A. Soybean. In: BARKER, K.R.; G.A. PEDERSON & G.L. WINDHAM. 1998. *Plant and nematode interactions.* Madison: American Society of Agronomy, 1. p.317-334.
- LUZZI, B.M.; H.R. BOERMA; R.S. HUSSEY. 1987. Resistance to three species of root-knot nematode in soybean. *Crop Science* (27): 259-262.
- RONGWEN, J.; M.S. AKKAYA; A.A. BHAGWAT; U. LAVI; P.B. CREGAN. 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor. Appl. Genet.* (90): 43-48.
- SILVA, J.F.V. 1998. Problemas fitossanitários da soja no Brasil, com ênfase em nematóides. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 21, Maringá. Anais. Maringá: UEM, 1998. p.16-20.
- TAMULONIS, J.P.; B.M. LUZZI; R.S. HUSSEY; W.A. PARROT & H.R. BOERMA. 1997a. DNA markers analysis of loci conferring resistance to peanut root-knot nematode in soybean. *Theor. and appl. Genet.*(95): 664-670.
- TAMULONIS, J.P.; B.M. LUZZI; R.S. HUSSEY; W.A. PARROT & H.R. BOERMA. 1997b. DNA markers associated with resistance to javanese root-knot nematode in soybean. *Crop Science* (37): 783-788.
- YOUNG, L.D. 1998. Breeding for nematode resistance and tolerance. In: BARKER, K.R.; G.A. PEDERSON, & G.L. WINDHAM. *Plant and nematode interactions.* Madison: American Society of Agronomy, p.197-208.