



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS REALEZA/PR.
CURSO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – LICENCIATURA**

RODRIGO RISELLO

**IDENTIFICAÇÃO DE SNPs (SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS) PARA
PODRIDÃO RADICULAR DE FITÓFTORA (*Phytophthora sojae*) EM UMA
COMBINAÇÃO BIPARENTAL DE SOJA (*Glicine Max*)**

REALEZA

2016

RODRIGO RISELLO

**IDENTIFICAÇÃO DE SNPs (SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS) PARA
PODRIDÃO RADICULAR DE FITÓFTORA (*Phytophthora sojae*) EM UMA
COMBINAÇÃO BIPARENTAL DE SOJA (*Glicine Max*)**

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Profª Dra. Izabel Aparecida Soares.
Co- orientador: Ms Gilvani Mattei

REALEZA

2016

Identificação de SNPs (SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS) para Podridão Radicular de Fitóftora (*Phytophthora sojae*) em uma Combinação Biparental de Soja (*Glicine max*)

Rodrigo Risello*, MS. Gilvani Mattei, Dra. Izabel Aparecida Soares*****

¹ Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal da Fronteira Sul - Rua Edmundo Gaievski, 1.000 Cx. Postal 253 Acesso: Rodovia PR 182, km 466 CEP 85.770-000 - Realeza – PR

² Departamento de pesquisa de soja, Nidera sementes – Linha Agua Branca, Gleba 35 AM, Zona Rural Cx. Postal 199 Acesso: Rodovia PR 182, km 466 CEP 85.770-000 - Realeza – PR

³ Nidera Sementes, Estação Pesquisa Milho, Rodovia RM-060 Miraporanga, Km 27 - zona rural, Quarentena de material propagativo de girassol, milho, soja, sorgo e trigo. Uberlândia/MG, Credenciamento: Portaria N° 350, de 29 de dezembro de 2006.

RESUMO

A podridão radicular de fitóftora em soja, causada por *Phytophthora sojae* está disseminada nos principais países produtores de soja do mundo, e pode causar a morte de plantas em extensas áreas. Através de métodos de melhoramento genético tem-se o desenvolvimento de cultivares com genes de resistência a essa doença, sendo necessário a utilização de ferramentas para a identificação da variação genética entre indivíduos de uma população. Este trabalho visou à identificação de SNPs para avaliação de podridão radicular de fitóftora (PRF), na linhagem de soja provinda do cruzamento entre cv. NS 6909IPRO e INT 001, sendo resistente a PRF e suscetível respectivamente, utilizando-se de técnicas como marcadores moleculares e ensaios em casas de vegetação com a exposição da planta ao patógeno. Para obtenção dos dados foram analisadas 291 plantas segregantes geração F2, através da coleta de DNA, para identificação dos SNPs através da técnica em tempo real (PCR). Os resultados foram comparados com o ensaio a campo, efetuado em casa de vegetação, na empresa Nidera Sementes Realeza PR, onde foram efetuadas as inoculações do patógeno através da técnica do “palito de dente” colonizado com o fungo, para isso foi utilizado um bulk de raças de *Phytophthora sojae* que mais infectam os cultivos de soja na região sul do Brasil, utilizado pela empresa Nidera Sementes em testes no programa de melhoramento. Os resultados indicaram que o marcador GM03_456359 [G/A] é eficiente na resistência para a podridão radicular de fitóftora nas linhagens provenientes do cultivar NS 6909 para a podridão radicular de fitóftora.

Palavras-chave: Resistência genética. Marcadores moleculares. *Phytophthora sojae*. *Glicine max*.

ABSTRACT

The phytophthora root rot of soybean, caused by *Phytophthora sojae* is widespread in the main producing countries world's soy, and can cause plant death in extensive areas. Through breeding methods has been the development of cultivars with resistance genes to this disease, requiring

the use of tools for the identification of genetic variation between individuals in a population. This study aimed to identify SNPs for evaluation of phytophthora root rot (PRF) in soybean line from the cross between cv. NS 6909 IPRO and INT 001, is resistant to PRF and susceptible respectively, using techniques such as molecular analysis and testing in greenhouses with plant exposure to the pathogen. To obtain the data were analyzed 291 plants segregating F2 generation through DNA collection for identification of SNPs by real-time (PCR). These results were compared with the test field, carried out in a greenhouse, the company Nidera Seeds Realeza PR, which were made inoculations of the pathogen through the technique of "toothpick" colonized with the fungus, for this we used a bulk *Phytophthora sojae* races more infect soybean crops in southern Brazil, used by the company Nidera seeds in tests in the breeding program. The results indicated that the marker GM03_456359 [G / A] is effective in resistance to phytophthora root rot in the lines from the cultivar NS 6909 to phytophthora root rot.

Keywords: Genetic resistance. Molecular markers. *Phytophthora sojae*. *Glycine max*.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas tecnologias e aperfeiçoamento dos meios de produção no setor agrícola, fez com que novas áreas de cultivos viessem a ser exploradas, possibilitando assim o aumento da produção na cultura da soja (BORÉM, 1999). A soja de origem chinesa, passou a ser explorada de maneira significativa sendo difundida em vários outros países (SILVA et al,2011). Os primeiros registros de soja no Brasil se deram a partir do ano de 1882 passando a ser utilizada para produção de grãos, somente após o ano de 1914 no estado do Rio Grande do Sul. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimentos (CONAB, 2015) estima-se que o Brasil apresente uma produção de 95 milhões de toneladas de grãos em 31,5 milhões de hectares de área plantada na safra de 2014/2015, sendo que a região centro-oeste do país possui a maior produção.

Ainda que o Brasil, nos últimos anos tenha aumentado sua produtividade, a cultura apresenta um potencial ainda maior e, entre os fatores que impedem que seu potencial máximo seja atingido estão as doenças. Aproximadamente 50 doenças já foram identificadas na cultura da soja no Brasil, e este número continua aumentando, em razão da expansão das fronteiras agrícolas e da prática da monocultura, tornando-se uma preocupação constante para pesquisadores da área e agricultores, devido aos grandes prejuízos causados (ALVES, 2007).

Uma das principais doenças que causa danos a cultura da soja é conhecida como *Phytophthora sojae* (KAUFFMANN E GERDEMANN, 1958), causador da Podridão Radicular de Fitóftora, ou também chamada de Podridão de Raiz e de Haste (PRH), constitui uma das principais doenças que limitam a produtividade deste grão, principalmente em anos de chuvas intensas e temperaturas amenas (COSTAMILAN et al, 2007). A PRF tem causado perdas de

até 100% da produção em cultivares altamente suscetíveis, sendo que os danos variam de acordo com a capacidade do cultivar de resistir a infecção do patógeno e das condições climáticas que favorecem o desenvolvimento da doença (OLIVEIRA, 2009).

Os registros da doença no Brasil ocorreram pela primeira vez em 1955, contudo, perdas consideráveis foram registradas somente nas safras de 2005/2006, primeiramente em lavouras situadas nos estados do Rio Grande do Sul e do Paraná (SOARES, 2011).

Uma das alternativas de controle de PRF é o melhoramento genético, na qual se desenvolve cultivares resistentes a infecção do patógeno, através de técnicas de cruzamento.

Essa resistência é proveniente de genes do hospedeiro denominados *Rps*, que por sua vez impedem o estabelecimento do patógeno, conferindo resistência completa a planta. Dos genes de resistência descritos para PRF em soja, um deles corresponde ao *Rps1k*, que contribui de maneira significativa na manutenção dos mecanismos de resistência (RINCÃO et al, 2012).

Com o avanço das tecnologias na área da genética passou - se a compreender de forma mais clara a interação entre planta-patógeno, elencando fatores ligados a expressão de sanidade das plantas. Para o desenvolvimento de cultivares “elite” através de cruzamentos, utiliza-se de fontes exóticas de soja, contendo alelos de resistência a Podridão Radicular de Fitóftora, que por sua vez terão que ser identificados dentro da população segregante para condução da mesma (ALZATE-MARIN et al, 2005). Na seleção de progênies para resistência a PRF, pode se fazer o uso de marcadores moleculares, para identificação de polimorfismos dentre das progênies segregantes, que segundo Milach (1999), são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos, herdados geneticamente, possibilitam a identificação e monitoramento de genes de interesse facilitando a seleção inicialmente pelo genótipo, sem a necessidade de exposição da planta ao patógeno.

Através do avanço das técnicas laboratoriais, possibilitou o desenvolvimento de marcadores mais precisos, e que geram resultados rápidos. Um dos principais para utilização no melhoramento de plantas são os chamados SNPs do inglês, que significa (Polimorfismos de Nucleotídeo Único), sendo analisado sua presença através da técnica de biologia molecular PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Os SNPs são caracterizados pela deleção ou inserção de um a três nucleotídeos no DNA do indivíduo, além de serem abundante, possuem baixa taxa de alteração genética, possibilitando determinar a variabilidade para a característica de interesse (GUIMARÃES, 2004 apud USECHE et al. 2001).

Esse trabalho partiu de marcadores SNPs, validados para avaliação da podridão radicular de fitóftora a partir de uma combinação biparental de soja dos EUA (Estados Unidos

da América) provinda de um parental E00003, que continha o gene de resistência *Rps1K*. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi comparar fenótipo e genótipo de progênies providas do cruzamento entre cv. (Cultivar) NS 6909IPRO e cv. INT-1, visando identificar *SNPs* caracterizantes da resistência genética completa dentro desta população.

1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa foi executada juntamente a empresa Nidera sementes Ltda. Filial na cidade de Realeza-PR. Esta empresa executa melhoramento genético de soja para o desenvolvimento de cultivares comerciais para a região Sul do Brasil.

Os materiais utilizados na pesquisa e a estrutura para realização dos experimentos foram cedidos pela empresa, assim como, as análises laboratoriais. O inóculo do fungo é proveniente da estação quarentenária vegetal da empresa Nidera situada na cidade de Uberlândia -MG.

1.2 MATERIAL BIOLÓGICO

O patógeno utilizado para inoculação da população segregante é um bulk ¹ das principais raças de *Phytophthora sojae*, que mais infectam os cultivos de soja na região sul do Brasil. Esse inóculo é utilizado pela empresa, para testes a Podridão Radicular de Fitóftora em genótipos do programa de melhoramento genético na cultura da soja. A população segregante provem do cruzamento de duas cultivares de soja cv. NS 6909IPRO e cv. INT-1, portanto um cruzamento biparental. Foram utilizadas plantas aleatórias da geração F2 para extração de DNA vegetal para posterior avaliação de polimorfismos *SNPs* para PRF. Para a avaliação fenotípica de reação ao patógeno efetuada em casa de vegetação, foram utilizadas progênies F3 provenientes das plantas nas quais se fez avaliação dos marcadores.

1.3 MATERIAL VEGETAL

Para a realização do experimento foi utilizado uma população segregante proveniente do cruzamento entre as cultivares de soja cv. NS 6909IPRO e cv. INT-1, resistente e suscetível a PRF respectivamente. Fez-se a seleção conforme características agronômicas de interesse de plantas geração F2, sendo utilizada para extração de DNA vegetal, através da coleta de folhas

¹ Mistura de Raças de *Phytophthora sojae*

e esfregação em um papel especial para acondicionar amostras do DNA, para posteriormente serem enviadas ao laboratório da empresa Nidera Sementes, situada na cidade de Uberlândia MG. No laboratório foi efetuado a verificação dos SNPs através da técnica PCR-RFLP (Reação de Polimerase em Cadeia - Polimorfismo do Comprimento de Fragmento de Restrição). Para o desenvolvimento do experimento avaliando o fenótipo, expresso a partir da inoculação do patógeno, foi utilizada a geração F3, provenientes das plantas utilizadas para a extração do DNA. Para controle do experimento fez-se o plantio causalizado dos respectivos progenitores e das cultivares já conhecidas pelo efeito de inoculação ao patógeno, sendo a cv. NS 5000IPRO e cv. CD 202 como suscetível e a cv. Willians 8.2 como fonte de resistência. Os genótipos parentais e a população segregante assim como as testemunhas são provenientes do programa de melhoramento genético da estação de pesquisa da empresa Nidera Sementes, filial na cidade de Realeza.

1.4-INSTALAÇÃO E DELINEAMENTO DE EXPERIMENTO

O experimento a campo foi realizado em casa de vegetação, onde se tem controle da temperatura e umidade do ambiente, sendo indispensável para o sucesso nas inoculações.

Foram utilizados para plantio vasos de três litros contendo solo e areia na proporção de 2:1 respectivamente, onde uma amostra de cada progênie foi semeada, totalizando em torno de 25 sementes, que após a germinação foi efetuado o raleio deixando apenas 15 indivíduos por vaso. O plantio foi realizado em dois ensaios com a mesma população, e ainda intercalando cultivares para serem utilizadas como padrões (testemunhas) de resistência e suscetibilidade para confirmação dos dados.

Os ensaios totalizaram 656 vasos, destes, 72 eram testemunhas intercaladas para comprovar a avaliação fenotípicas a partir das lesões ocasionadas pelo patógeno. As plantas foram inoculadas com o patógeno utilizando a “técnica do palito de dente” onde se cultiva o micélio do patógeno *Phytophthora sojae* por 10 dias em meio de cultura V8 - ágar.

As plantas inoculadas no hipocótilo através de pontas de palitos de dente contendo o micélio, 1cm abaixo das folhas cotiledonares. A inoculação ocorreu 14 dias pós semeadura, mantendo-se a temperatura constante entre 20 a 22° C e umidade saturada por pelo menos 48 horas pós inoculação.

1.5 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA

A intensidade da infecção causada pelo patógeno *P. sojae* foi detectada mediante avaliação visual da extensão da lesão no lenho, descoloração vascular, sintomas de murcha ou morte da planta. A avaliação dos sintomas foi realizada sete dias após a inoculação, dividiu-se em três níveis para as características quantitativas seguidas conforme o padrão estabelecido pela União Internacional para a Proteção das Obtenções Vegetais (UPOV), baseando-se no seguinte critério: suscetível, moderadamente resistente e altamente resistente, portanto serão consideradas resistentes, representadas por R as progênies que apresentarem até 30% de plântulas mortas, moderadamente resistentes representadas por MR as progênies com até 70% de plântulas mortas, e suscetíveis representados por S, acima de 70% de plântulas mortas. Utilizando-se da seguinte fórmula para avaliação:

$$PM \% = (PM + PI/2) 100/TP$$

PM % = porcentagem de plântulas mortas;

PM = número de plântulas mortas/vaso;

PI = número de plântulas infectadas; cada plântula infectada é considerada equivalente à meia plântula morta;

TP = total de plântulas avaliadas (15);

1.6 AVALIAÇÃO GENOTÍPICA

A avaliação genotípica fez-se através da técnica PCR-RFLP (Reação de Polimerase em Cadeia - Polimorfismo do Comprimento de Fragmento de Restrição). A reação da PCR é um método que permite a amplificação *in vitro* de segmentos de DNA, usando-se dois primers,² sintetizados artificialmente (NEALE et al 1991). Posteriormente são identificados pela técnica de eletroforese através do tamanho dos fragmentos amplificados, separados em bandas. Essa técnica será empregada para detectar variabilidade genética entre as progênies para a resistência a Podridão Radicular de Fitóftora (PICCHI, 2002). Os marcadores utilizados serão GM03_456359 [G/A] e GM03_461067_[T/C] validados para avaliação da podridão radicular de fitóftora a partir de uma combinação biparental de soja dos EUA (Estados Unidos da América) provinda de um parental E00003, que continha o gene de resistência *Rps1K* (ZHANG,2014).

² Sequência complementar do DNA (iniciador).

1.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS (CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA)

Os dados foram analisados por delineamento inteiramente causalizados com repetições. Foram observadas as características quantitativas no que se refere à resistência ou suscetibilidade da soja a exposição ao patógeno *Phytophthora sojae*, avaliando a segregação de plantas dentro da população quanto ao genótipo e fenótipo. Para verificar se a segregação do gene aconteceria juntos foi calculado o X^2 através da equação proposta por Karl Pearson, segundo Ferreira et al (2005):

$$X^2 = \sum \frac{(\text{Observado} - \text{Esperado})^2}{\text{Esperado}}$$

2. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram inoculadas com o método do palito de dente colonizado com o patógeno as progênies F3 (descendentes das plantas na qual foram efetuadas análise molecular) com duas repetições casualizadas se utilizando de 15 plantas de cada progênie. A verificação dos resultados se deu através de cultivares testemunhas conhecidas pela ação do patógeno em outros testes de inoculação. As testemunhas cv. CD 202, cv. NS 5000 e o progenitor cv. INT-1 se mostraram suscetíveis ocorrendo acima de 80% de plantas Mortas, já o progenitor cv. NS 6909IPRO e a cv. Willians 8.2 (contém o gene de resistência Rps1K) não mostraram sintomas quanto a ação do patógeno. Portanto pode-se considerar que o método utilizado de inoculação se mostrou eficiente para avaliação da variabilidade genética das progênies quanto a Podridão Radicular de Fitóftora. O gene Rps 1k é responsável pela manutenção dos mecanismos de resistência nos acessos brasileiros de soja, respondendo de forma efetiva ao ataque de *Phytophthora sojae* (GARDNER et al., 2001; COSTAMILAN, 2007). Segundo Rincão et al, 2012 esse gene possui grande relevância comercial para a cultura da soja, pois contribui de maneira significativa na manutenção da resistência genética a PRF.

Os dados fenotípicos obtidos a partir da exposição da progênie a inoculação do patógeno no hipocótilo da planta, mostrou os resultados apresentados na Figura 1 e Tabela 1. O primeiro teste apresentou 130 progênies classificados como resistente, 89 como moderadamente resistente e 72 com reação de suscetibilidade. Já o segundo teste demonstrou 127 progênies resistentes, 90 moderadamente resistentes e 74 suscetíveis. Uma pequena diferença nas avaliações pode ocorrer devido à ocorrência de fatores como os chamados “escapes” de inoculação (plantas com genótipo suscetível que são avaliadas como plantas resistentes), que

podem ser decorrentes da má fixação dos palitos no hipocótilo da planta, da falta de umidade necessária e temperatura favorável para o desenvolvimento do patógeno, que muitas vezes podem sofrer alterações dentro da casa de vegetação. Neste trabalho a taxa de escape foi considerada irrelevante, ficando abaixo de 7%, o que é normalmente observado em outros experimentos com esse patógeno.



Figura 1. Foto ilustrativa das lesões típicas de Resistência (A – plantas saudias), Moderadamente Resistente (B – plantas infectadas), e suscetibilidade (C – plantas mortas).

Tabela 1: Dados fenotípicos das progênes F3, obtidos pela inoculação do patógeno.

Inoculação do patógeno nas progênes geração F3		
Fenótipo observado	Primeiro teste	Segundo teste
Resistentes	130	127
Moderadamente resistentes	89	90
Suscetíveis	72	74
Total	291	291

As análises genéticas da podridão radicular de fitóftora foram avaliadas nos progenitores (cv. NS 6909IPRO e cv. INT-01) assim como os 291 indivíduos geração F2 derivados do cruzamento entre esses cultivares. Foram realizados testes para a confirmação dos dados moleculares com diferentes marcadores (Tabela 2 e 3)

Tabela 2: Comparação da frequência do alelo nas progênies F2 no primeiro teste, de acordo com seus respectivos marcadores moleculares.

Comparativo de Marcadores Moleculares				
Marcadores Moleculares	Homozigoto Alelo 1	Heterozigoto	Homozigoto Alelo 2	Nulo
GM03_456359 [G/A]	117	96	72	5
GM03_461067_[T/C]	290	1	-	-

Tabela 3: Comparação da frequência do alelo nas progênies F2 no segundo teste, de acordo com seus respectivos marcadores moleculares.

Comparativo de Marcadores Moleculares				
Marcadores Moleculares	Homozigoto Alelo 1	Heterozigoto	Homozigoto Alelo 2	Nulo
GM03_456359[G/A]	108	86	70	25
GM03_461067_[T/C]	290	1	-	-

Os resultados foram classificados como homozigoto (G:G) se mostrando resistentes a *Phytophthora sojae* com o teste de inoculação, heterozigoto (G:A) moderadamente resistente e (A:A) apresentando suscetibilidade a inoculação do patógeno.

Como o evidenciado na Tabela 2, para o marcador GM03_456359 [G/A] a frequência do alelo nas progênies identificado no primeiro teste foi de: 117 indivíduos com o alelo 1 homozigoto (G:G), 96 indivíduos heterozigotos (G:A), 72 indivíduos com o alelo 2 homozigoto (A:A) e 5 resultados nulos. Já para o segundo teste (Tabela 3) foram encontrados, 108 indivíduos com o alelo 1 homozigoto (G:G), 86 indivíduos heterozigotos (G:A), 70 indivíduos com o alelo 2 homozigoto (A:A) e 25 resultados nulos. Em ambos os testes o progenitor cv. NS 6909 apresentou o alelo 1 homozigoto (G:G) e a cv. INT-01 o alelo 2 homozigoto (A:A). Notou-se uma divergência entre os testes devido a maior quantidade de resultado nulo (perdidos) no segundo teste, devidos a falhas na extração do DNA vegetal. Para o marcador GM03_461067_[T/C] (Tabela 2 e 3) foram obtidos para ambos os testes 290 indivíduos com o alelo 1 homozigoto (C:C) e apenas 1 indivíduo heterozigoto (T:C). Para esse marcador ambos os progenitores se apresentaram com alelo 1 homozigoto (C:C).

A partir desse estudo podemos considerar o marcador GM03_461067_[T/C] não está ligado aos locos de resistência ao gene *Rps 1k*. Portanto não foi apropriado para avaliação a podridão radicular de fitóftora para essa linhagem, pois não identificou os alelos dentro do gene para a resistência a doença.

O χ^2 foi significativo, como o indicado na Tabela 4, o que indica que a segregação independente não está acontecendo, podendo o marcador GM03_456359 [G/A] estar ligado ao loco de resistência *Rps 1k*. Das 290 progênies F2 testadas para o marcador GM03_456359 [G/A], na média de ambos os testes foram caracterizadas 203 contendo o gene de resistência e 71 suscetíveis. Nas plantas das progênies F3 com o teste de inoculação do patógeno, obteve-se em média dos dois testes efetuados em casa de vegetação com a inoculação do patógeno 218 progênies demonstrando presença do gene de resistência e 73 sem a presença de resistência. A proporção observada foi testada para verificar a conformidade com a proporção mendeliana esperada de 3:1. Comprovando assim a segregação esperada para um único gene (*Rps 1k*) com dominância completa a partir desses resultados pode-se considerar que o marcador GM03_456359 [G/A], é valido para seleção assistida para esta progênie, pois identificou de forma significativa os genótipos e fenótipos homocigotos e heterocigóticos no gene de resistência a doença.

Tabela 4: Análise de χ^2 para segregação nas progênies das gerações F2 e F3 para o marcador GM03_456359 [G/A].

Análises	Proporção observada *			Proporção esperada*			X^2
	R	MD	S	R	MD	S	
Geração F2	91	112	71	89	131	48	29.15
Geração F3	90	128	73	102	140	47	37.89

*(R) genótipo e homocigoto equivalente ao da linhagem parental resistente, (MD) genótipo heterocigoto e (S) genótipo homocigoto equivalente ao da linhagem parental suscetível.

Como o visualizado na Tabela 4, χ^2 foi significativo, o que indica que a segregação independente não está acontecendo, podendo o marcador GM03_456359 [G/A] estar ligado ao loco de resistência *Rps 1k*. Das 290 progênies F2 testadas para o marcador GM03_456359 [G/A], na média de ambos os testes foram caracterizadas 203 contendo o gene de resistência e 71 suscetíveis. Nas plantas das progênies F3 com o teste de inoculação do patógeno, obtivemos em média dos testes 218 progênies demonstrando presença do gene de resistência e 73 sem a

presença de resistência. A proporção observada foi testada para verificar a conformidade com a proporção mendeliana esperada de 3:1. Comprovando assim a segregação esperada para um único gene (*Rps 1k*) com dominância completa.

A manutenção da resistência genética a PRF é de extrema importância, pois acarreta grandes perdas na produtividade em cultivares suscetíveis, ocasionadas pela diminuição do estande de plantio nas lavouras devido a morte das plantas. Sua ocorrência se dá principalmente na região Sul do Brasil onde seu desenvolvimento é mais propício devido as temperaturas amenas associadas a chuvas constantes, permitindo o encharcamento do solo dando início a doença (COSTAMILAN et al, 2007).

Um dos principais objetivos dos programas de melhoramento, é a manutenção desses mecanismos de resistência genética, disseminada através de técnicas de cruzamento, que possibilita a transferência de genes de resistência entre os genótipos, procurando oferecer ao agricultor cultivares produtivas, com sanidade e adaptadas a região de plantio (OLIVEIRA, 2009). Um dos mecanismos utilizados para a seleção de progênies resistentes são os marcadores moleculares sendo um método privilegiado por ser menos trabalhoso e que gera resultados rápidos, indispensável nos programas de melhoramento, utilizado como ferramenta de auxílio para os testes de inoculação direta do patógeno (ALZATE-MARIN et al, 2005). Esta pesquisa foi realizada com marcadores (SNPs) validados para uma linhagem nos Estados Unidos da América, denominados segundo o autor ZHANG, 2014 como: MSUSNP03-2 BARC_1.01_Gm03_4563499_G_A) e MSUSNP03-3 (BARC_1.01_Gm03_4610670_C_T).

As descobertas moleculares levaram a descrição até o momento, de nove loci diferentes para a resistência completa à Podridão Radicular de Fitóftora com uma série alélica no gene *Rps1* e *Rps3*: *Rps1* (BERNARD et al., 1957) (*Rps1a, 1b, 1c, 1d, 1k*), *Rps2* (KILEN et al., 1974), *Rps3* (MUELLER et al., 1978) (*Rps3a, 3b e 3c*), *Rps4* (ATHOW et al., 1980), *Rps5* (BUZZELL e ANDERSON et al., 1981), *Rps6* (ATHOW e LAVIOLETTE et al., 1982), *Rps7* (ANDERSON e BUZZELL et al, 1992; DORRANCE et al., 2004), *Rps8* (BURNHAM et al., 2003; SANDHU et al., 2005; GORDON et al., 2006) e *RpsYu25* (SUN et al., 2011). Dos genes descritos os principais responsáveis pela manutenção da resistência genética em genótipos brasileiros são os genes *Rps8* e *Rps1*, principalmente o alelo 1K no qual foi dado ênfase neste trabalho (GARDNER et al., 2001; COSTAMILAN, 2007).

De acordo com Oliveira et al, (2007) uma das divergências no uso de marcadores é o custo elevado, mas que em contrapartida vem sendo trabalhado para simplificação e avanço das técnicas e conseqüentemente na redução dos custos de sua utilização.

Entretanto a manutenção da resistência genética de uma determinada cultivar pode ser influenciada decorrência de seu uso pelos agricultores, determinando sua manutenção no mercado comercial. Segundo uma pesquisa desenvolvida com genótipos comerciais lançados nos EUA, com a presença de gene de resistência a PRF, observou-se que os mesmos mantiveram a sanidade por um tempo de aproximadamente 20 anos. Essa quebra de resistência pode ser devido a co-evolução do patógeno de forma natural, favorecendo o surgimento de novas raças. (ALZATE- MARIN et al, 2005).

Por fim, nesta pesquisa foi possível evidenciar que o marcador GM03_456359 [G/A] é eficiente na avaliação de resistência para a podridão radicular de fitóftora nas linhagens provenientes do cultivar NS 6909. No entanto a avaliação através do marcador GM03_461067_[T/] não foi satisfatória, pois não identificou os alelos dentro do gene para a resistência a doença.

Agradecimentos

Aos meus pais e avós, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Agradeço a minha namorada e companheira que dedicou seu tempo na correção do trabalho e pelo incentivo durante a realização do mesmo.

A Empresa Nidera Sementes pelo apoio financeiro, e disponibilização da estrutura física para a realização deste trabalho.

A minha orientadora prof.^a Dra. Izabel Aparecida Soares, pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções e incentivos.

Ao Melhorista MS.Gilvani Mattei pela co - orientação no desenvolvimento da pesquisa e por contribuir muito para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos membros da banca examinadora prof.^a MS Gisele Arruda e prof.^a Dra. Vanessa Silva Retuci, pelas correções e sugestões para o aperfeiçoamento do meu trabalho.

Aos colegas de classe, em especial a aqueles que estiveram comigo diante das dificuldades encontradas, no decorrer do curso.

REFERÊNCIAS

ALZATE-MARIN, A. L., CERVIGNI, G. D., MOREIRA, M. A., & BARROS, E. G. (2005). Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, 30(4), 333-342. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/fb/v30n4/a01v30n4.pdf> . Acesso em: 19> maio. 2015.

ALVES, S.A.M. Quantificação de parâmetros da pré-penetração e monocíclicos relacionados ao patossistema *Phakopsora pachyrhizi*-soja. 2007. 64p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000094&pid=S0100-204X200800110001100001&lng=en. Acesso em: 21 março. 2016.

ANDERSON, T.R.; BUZZELL, R.I. Inheritance and linkage of the *Rps7* gene for resistance to *Phytophthora* rot of soybean. **Plant Disease**, n. 76, p. 958–959, 1992.

ATHOW, K.L.; LAVIOLETTE, F.A.; MUELLER, E.H.; WILCOX, J.R. A new major gene for resistance to *Phytophthora megasperma* var. *sojae* in soybean. **Phytopathology**, n. 70, p. 977–980, 1980.

ATHOW, K.L.; LAVIOLETTE, F.A. *Rps6*, a major gene for resistance to *Phytophthora megasperma* sp. *glycinea* in soybean. **Phytopathology**, n. 72, p. 1564–1567, 1982.

BORÉM, A. Escape Gênico. **Revista de Biotecnologia**, Brasília, DF, n. 10, p. 101-107, 1999. Disponível em: http://biotecnologia.com.br/revista/bio10/encarte_10.pdf. Acesso em: 31 maio. 2015

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Proteção de Cultivares no Brasil Brasília: Mapa/ACS, 2011. 202 p

BERNARD, R.L.; SMITH, P.E.; KAUFMANN, M.J.; SCHMITTHENNER, A.F. Inheritance of resistance to *Phytophthora* root and stem rot in soybean. **Journal of Agronomy**, n. 49, p. 391, 1957.

BUZZELL, R.I.; ANDERSON, T.R. Another major gene for resistance to

Phytophthora megasperma var. *sojae* in soybeans. **Soybean Genetic News**, n. 8, p. 30–33, 1981.

BURNHAM, K.D.; DORRANCE, A.E.; FRANCIS, D.M.; FIORITTO, R.J.; ST. MARTINS, S.K. *Rps8*, a new *locus* in soybean for resistance to *Phytophthora sojae*. **Crop Science**, n. 43, p. 101-105, 2003.

CONABE. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2014/2015**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_05_13_08_46_55_boletim_graos_mai_2015.pdf. Acesso em: 31 maio. 2015.

COSTAMILAN, L., CLEBSCH, C., SEIXAS, C., SOARES, R., & GODOY, C. **Caracterização da diversidade da população patogênica de *Phytophthora sojae* do Brasil**. In: Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 33, 2013, Londrina. Resumos expandidos... Brasília, DF: Embrapa, 2013. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/88700/1/Caracterizacao-da-diversidade-da-populacao-patogenica-de-Phytophthora-soj-ae-do-Brasil.pdf>. Acesso em: 21 maio. 2015.

COSTAMILAN, L.M; BERTAGNOLLI, P. F; MORAES, R. M. A; **Podridão radicular de fitófтора em soja**. Embrapa Trigo, 2007. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do79.pdf. Acesso em: 22 maio. 2015.

DORRANCE, S. E.; JIA, H.; ABNEY, T. S. Evaluation of soybean differentials for their interaction with *Phytophthora sojae*. **Plant Health Progress**. doi:10.1094/PHP.2004.0309-01-RS. 2004. Disponível em: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2004/psoj-ae/>. Consultado em: 10 ABRIL 2016.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEM, 1998. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000112&pid=S0100-204X200800110001100010&lng=en

GUIMARÃES, C. T. **Aplicação De Marcadores Moleculares No Melhoramento Genético**. In: XXV CONGRESSO NACIONAL MILHO E SORGO, 2004, Cuiabá. Aplicação De Marcadores Moleculares No Melhoramento Genético Cuiabá- MG. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/51525/1/Aplicacao-marcadores.pdf>. Acesso em: 17 junho. 2015.

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.

GORDON, S.G.; ST. MARTIN, S.K.; DORRANCE, A.E. *Rps8* maps to a resistance gene rich region on soybean molecular linkage group F. **Crop Science**, n. 46, p. 168-173, 2006.

LUZ, E. D. M. N.; MATSUOKA, K. *Phytophthora*: fungo, protista ou chromista? In: LUZ, E. D.M.N.; SANTOS, A. F. dos; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J. L. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural. p. 1-14, 2001.

KILEN, T.C.; HARTWIG, E.E.; KEELING, B.L. Inheritance of a second major gene for resistance to *Phytophthora* root rot in soybeans. **Crop Science**, n. 14, p. 260–262, 1974.

MUELLER, E.H.; ATHOW, K.L.; LAVIOLETTE, F.A. Inheritance of resistance to four physiologic races of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. **Phytopathology**, n. 68, p. 1318–1322, 1978.

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 1999. Disponível em: <http://www.cpsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/marcadormolecular.pdf>. Acesso em: 12 maio. 2015.

NEALE, D.B.; WILLIAMS, C.G. Restriction fragment length polymorphism mapping in conifers and applications to forest genetics and tree improvement. **Canadian Journal of Forest Research**, v.21, p. 545-554, 1991.

OLIVEIRA, I.J. Melhoramento genético para resistência às doenças fúngicas do sistema radicular da soja. In: **seminários em genética e melhoramento de plantas**. Piracicaba: ESALQ-USP, 2009. Disponível em: <http://www.genetica.esalq.usp.br/pub/seminar/IJOliveira-200902-Resumo.pdf>. Acesso em: 22 maio. 2015.

PICCHI, S. C. **Caracterização e análise da diversidade genética na região controladora de imigração de DNA (ICR) de isolados de *Xylella fastidiosa* utilizando RFLP**. 2002. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

RINCÃO, M.P; CATELLI, L.L; MARIN, S.R.R; SOARES, R.M; ARIAS, C.A.A; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C; ABDELNOOR, R.V. **Validação de marcadores moleculares microssatélites ligados ao gene *Rps1-k* de resistência à podridão radicular de fitófтора em soja**. In: Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 6., 2012, Cuiabá. Soja: integração nacional e desenvolvimento sustentável: anais. Brasília, DF: Embrapa, 2012, 2012. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/928191/1/11s275.pdf>. Acesso em: 24 maio. 2015.

SANDHU, D.; SCHALLOCK, K.G.; RIVERA-VELEZ, N.; LUNDEEN, P.; CIANZIO, S.; BHATTACHARYYA, M.K. Soybean Phytophthora Resistance Gene Rps8 Maps Closely to the Rps3 Region. **Journal of Heredity**. v. 96, n. 5, p. 536–541, 2005.

SILVA, Ariana Cericatto da; DE LIMA, EP Carvalho; BATISTA, Henrique Rogê. A importância da soja para o agronegócio brasileiro: uma análise sob o enfoque da produção, emprego e exportação. **ENCONTRO DE ECONOMIA CATARINENSE**, 2011.

SOARES, R. M. **Manejo de doenças radiculares da soja causada por pythium, phytophthora e rhizoctonia**. In Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESO DE LA SOJA DEL MERCOSUR, 5.; FORO DE LA SOJA ASIA, 1., 2011, Rosário. Un grano: un universo.[Rosário: Asociación de la Cadena de la Soja Argentina], 2011. 2 p. 1 CD-ROM. MERCOSOJA 2011..

SUN, S.; WU, X. L.; ZHAO, J. M.; WANG, Y. C.; TANG, Q. H.; YU, D. Y.; GAI, J. Y.; XING, H. Characterization and mapping of *RpsYu25*, a novel resistance gene to *Phytophthora sojae*. **Plant Breeding**. n. 130, p. 139-143. 2011.

VIEIRA, V. C. **Variabilidade genética em acessos de trapoeraba (*Commelina benghalensis* L.) e suas respostas ao glifosato**. 2003. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

YORINORI, J. T. **Cancro da haste da soja: epidemiologia e controle**. Londrina: Embrapa - Soja, 1996.75 p.

ZHANG, Z. Phytophthora Root Rot Resistance in Soybean E00003, **Crop Science**, v.54, p. 492- 499, 2014.