DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE CULTIVARES DE SOJA ATRAVÉS DO MARCADOR MOLECULAR AFLP

Felipe Emannuel Dolenkei Muraro (PIBIC/CNPq), Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello (Orientador), e-mail: rrmatiel@uepg.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa / Departamento Fitotecnia e Fitossanidade.

Ciências Agrárias (5.00.00.00-4); Agronomia (5.01.00.00-9)

Palavras-chave: *Glycine max* Merril, polimorfismo de DNA, diversidade genética.

Resumo

Os programas de melhoramento genético possibilitaram o crescimento contínuo da soja nas últimas décadas, como uma das culturas mais produzidas no Brasil, através do desenvolvimento de genótipos mais adaptados as regiões de cultivo bem como ao elevado potencial produtivo. Porém, a genealogia da soja brasileira provém de uma base genética estreita e de baixa variabilidade. O presente trabalho teve como objetivos identificar o polimorfismo molecular a partir do marcador AFLP, estimar a divergência genética entre 18 cultivares de soja e estabelecer os grupos heteróticos a partir da similaridade genética das cultivares. A partir do DNA genômico dos genótipos, realizou-se à amplificação seletiva para o marcador molecular AFLP. Os 946 fragmentos amplificados, variaram de 61 a 2735 pb, sendo 435 fragmentos polimórficos, gerando uma média de 46%. As 11 combinações de primers *EcoRI* + *MseI* utilizadas, resultaram em 39,5 fragmentos polimórficos/combinação de primers. O dendrograma gerado possibilitou separar as 18 cultivares em quatro grupos heteróticos e dois genótipos isolados. Desta forma, confirmou-se que as 18 cultivares de soja apresentaram baixa divergência genética entre si.

Introdução

A soja é uma das culturas que mais cresceu nos últimos três anos e a variabilidade genética é a base dos programas de melhoramento no desenvolvimento de novos genótipos recomendados para o cultivo. Atualmente a cultura corresponde à 49% da área semeada de grãos no Brasil. O aumento da produtividade está associado aos avanços tecnológicos, ao manejo e a eficiência dos produtores (MAPA, 2016). A contribuição dos diversos programas de melhoramento resultou em cultivares altamente produtivas e adaptadas às mais diferentes condições de cultivo, no entanto, algumas estimativas demonstram que o germoplasma brasileiro provém de uma base genética estreita e foi originado de poucas cultivares ancestrais americanas (PRIOLLI et al., 2004).

Por meio de marcadores moleculares que estimam diversidade/similaridade, a técnica que se destaca é o marcador molecular AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), combinando a clivagem do DNA total com enzimas de restrição (corte raro + corte frequente) e a amplificação dos fragmentos pela reação de polimerização em cadeira – PCR (VOS et al., 1995). Trata-se de uma poderosa ferramenta, permitindo obter muitos fragmentos além de ser excelente para o mapeamento de genes que controlam características de importância agronômica (CASTIGLIONI et al., 1999; VAN DER VOORT et al., 1999; XU et al., 1999). A literatura indica que o marcador AFLP é o mais eficiente, com um índice de 10 vezes superior aos demais marcadores moleculares existentes (PEJIC et al., 1998).

ISSN 1676-0093

Neste sentido, a utilização do marcador AFLP para estimar a dissimilaridade genética entre cultivares de soja possibilitará organizar os genótipos em grupos heteróticos, possibilitando no futuro esquemas de cruzamentos artificiais entre os genótipos mais dissimilares permitindo desta forma um incremento na variabilidade genética das populações segregantes de soja.

Material e Métodos

As 18 cultivares de soja de diferentes empresas (Monsoy, Bayer, Nidera Sementes, Agroeste, Syngenta, Don Mario, Brasmax e DuPont) foram cultivadas em casa de vegetação até o desenvolvimento total do primeiro trifólio, onde as folhas jovens foram coletadas para a extração do DNA genômico total. A extração do DNA genômico seguiu o protocolo de Hoisington et al. (1994), sendo ressuspendido em 30 µL de água ultrapura e tratados com 1 µL de RNAse por 2 h a 37ºC. As amostras de DNA foram quantificadas em aparelho espectrofotômetro Nanovue GE Healfcare®. Para visualizar a integridade do DNA total foram alicotados 2,0 µL do DNA extraído acrescido de 2,0 µL do tampão de carregamento e 2,0 µL do corante GelRed na proporção de 1:1, seguida da eletroforese em gel de agarose 1%. Na sequência, as amostras foram diluídas para a concentração de 50 ng μL^{-1}.

Foram utilizadas 11 combinações de *primers* AFLP's *EcoRI* (E) + *MseI* (M), conforme indicado na Tabela 1. A metodologia para a amplificação seguiu o protocolo de Vos et al. (1995) com as adaptações de Lopes (2003).

Tabela 1 – Relação das combinações de *primers* AFLP's *EcoRI* (E) + *MseI* (M). Ponta Grossa, 2019.

Combinações	*Primers*	Combinações	*Primers*
1	*E-ACA/M-CCA*	**7**	*E-AAC/M-CAC*
2	*E-ACA/M-CGC*	**8**	*E-AAC/M-CGC*
3	*E-ACA/M-CAT*	**9**	*E-AGC/M-CCA*
4	*E-ACA/M-CAC*	**10**	*E-ACA/M-CTC*
5	*E-AAC/M-CCA*	**11**	*E-AAC/M-CAT*
6	*E-AAC/M-CTC*		

Após a amplificação seletiva, as 18 amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% acrilamida/bisacrilamida (19:1), uréia 7.5 M, tampão 1X TBE, 120 µL de TEMED e 800 µL de persulfato de amônio 10%. Antes da corrida, as amostras receberam 8,0 µL de tampão formamida 2X (formamida 98%, EDTA 10 mM, pH 8,0, azul de bromofenol 0,002% (p/v) e xileno cianol 0,002% p/v) seguido de desnaturação a 95°C por 5 minutos. Para a corrida eletroforética foi utilizado o sistema "Sequi-Gen GT" (Biorad) em tampão TBE 1X numa potência constante de 80 W por 3 horas e 30 minutos. Os géis de AFLP foram revelados através do método de coloração com nitrato de prata (CRESTE et al., 2001). Os géis revelados foram mantidos a temperatura ambiente para secamento. A genotipagem dos géis foi efetuada através avaliação da presença (1) ou ausência (0) dos fragmentos amplificados através do marcador AFLP. Os dados obtidos pela genotipagem do marcador AFLP foram submetidos à análise da similaridade genética pelo Coeficiente de Jaccard. A partir da matriz de similaridade genética realizou-se a análise de agrupamento pelo método UPGMA no software GENES versão 1990.2019.8.

ISSN 1676-0093

Resultados e Discussão

As 11 combinações de primers *EcoRI* + *MseI* amplificaram 946 fragmentos com tamanho variando de 61 a 2735 pb. Dos fragmentos amplificados, 511 foram monomórficos e 435 polimórficos, gerando um polimorfismo molecular para o marcador AFLP de 46% (Tabela 2). Bonato (2006) trabalhando com 317 cultivares brasileiras de soja (*Glycine max*) demonstrou polimorfismo médio de 19,8%, com 394 fragmentos amplificados, dos quais 78 foram polimórficos.

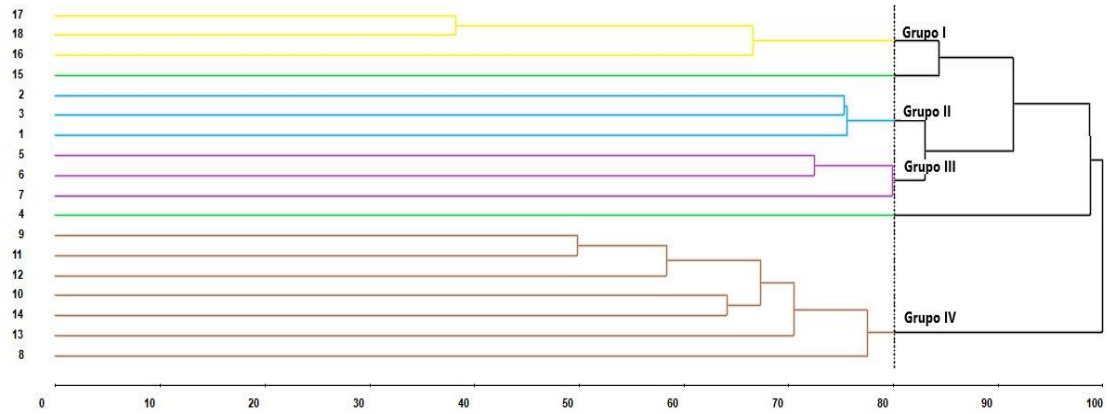
Tabela 2 – Relação das combinações de *primers* AFLPs *EcoRI* (E) + *MseI* (M), número total de fragmentos amplificados, número de fragmentos monomórficos, número de fragmentos polimórficos, porcentagem de polimorfismo e número de fragmentos polimórficos por *primer*. Ponta Grossa, 2019

Nº	*Primers*	Fragmentos	Monomórficos	Polimórficos	Polimorfismo (%)
1	*E-ACA/M-CCA*	75	41	34	45,3
2	*E-ACA/M-CGC*	89	26	63	70,8
3	*E-ACA/M-CAT*	97	65	32	33,0
4	*E-ACA/M-CAC*	90	50	40	44,4
5	*E-AAC/M-CCA*	99	54	45	45,4
6	*E-AAC/M-CTC*	96	49	47	49,0
7	*E-AAC/M-CAC*	74	52	22	29,7
8	*E-AAC/M-CGC*	83	27	56	67,5
9	*E-AGC/M-CCA*	68	38	30	44,1
10	*E-ACA/M-CTC*	80	43	37	46,2
11	*E-AAC/M-CAT*	95	66	29	30,5
Total		946	511	435	46,0
Fragmentos Polimórficos/*Primer*				39,5	

A partir das estimativas de similaridade genética obtidas pelo Coeficiente de Jaccard, gerou-se uma matriz onde puderam ser identificadas a similaridade entre os genótipos; com variação de 0,28 a 0,84, onde 0 indica nenhuma similaridade e 1 isimilaridade completa. A menor similaridade foi entre as cultivares S17 x S18 e o maior para as cultivares S7 x S10 e S7 x S14. Bonato (2006), em seu trabalho com o marcador molecular AFLP, observou a semelhança genética entre 53 cultivares de soja lançadas no Brasil, onde obteve índices de similaridade de 0,17 a 0,97, sendo mais de 56,8% dos coeficientes acima de 0,60 e 9,7% igual ou abaixo de 0,50 de similaridade

Através da matriz de similaridade realizou-se a análise de agrupamento pelo método UPGMA (Figura 1). No dendrograma, a linha de corte foi em 80% de similaridade de acordo com a topologia observada. No ponto de corte foi possível identificar quatro grupos heteróticos, além de duas cultivares que permaneceram isoladas. Rigon (2012) trabalhando com 18 cultivares de soja, pela matriz de Mahalanobis, agrupou-as em cinco grupos heteróticos, sendo metade dos genótipos agrupados em um único grupo e três cultivares isoladas. A formação de grupos isolados consiste numa fonte de dissimilaridade genética adequada para futuros blocos de hibridação pelos programas de melhoramento genético. É comum observar grupos formados com cultivares de soja diferentes agronomicamente pois a base genética no país originou a maioria dos genótipos hoje existentes (ALCÂNTRA, 2005; ABREU et *al.*, 1999).

Figura 1 - Dendrograma produzido a partir de distâncias genéticas entre as 18 cultivares comerciais de soja através do marcador AFLP. Ponta Grossa, 2019.



Conclusões

O baixo índice de polimorfismo (46%) entre as 18 cultivares de soja, indica uma grande similaridade genética entre as cultivares analisadas. Pela análise de agrupamento foi possível agrupar as 18 cultivares de soja em quatro grupos dissimilares e duas cultivares isoladas sem relação entre si.

Agradecimentos

Agradeço à UEPG e ao CNPq pelo espaço e financiamento.

Referências

ABREU A. DE FB; RAMALHO MAP.; FERREIRA DF. Selection potential for seed yield from intra and inter-racial populations in common bean. **Euphytica**, v. 108, p.121-127, 1999.

ALCÂNTRA NETO, F. **Caracterização genético-molecular de um banco ativo de germoplasma de soja.** 2005**.** 87p. Tese de Doutorado em Agronomia - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, 2005.

BONATO, A. L. V. Genetic similarity among soybean (Glycine max (L) Merrill) cultivars released in Brazil using AFLP markers. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 692-704.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorfisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver stainig. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p.299-306, 2001.

LOPES, M.T.G. **Mapeamento de genes de resistência a mancha de Phaeosphaeria em milho**. Piracicaba, 2003. 117p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

PEJIC, I.; AJMONE-MARSAN, P.; MORGANTE, M.; et al. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs: **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, n. 8, p. 1248–1255, 1998.

PRIOLLI, R.H.G. et al. Diversidade genética da soja entre períodos e entre programas de melhoramento no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.10, p.967-975, 2004.

RIGON, J. P. G. et al. Dissimilaridade genética e análise de trilha de cultivares de soja avaliada por meio de descritores quantitativos. **Revista Ceres**, v. 59, n. 2, p.233-240, 2012.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v.23, n.21, p.4407-4414, 1995.