

Uso de marcadores moleculares no melhoramento de plantas para resistência a nematoides

Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza

Embrapa Arroz e Feijão, Rod. GO-462, km 12, Zona Rural, Santo Antônio de Goiás,
GO, 75.375-000. E-mail: thiago.souza@embrapa.br.

A expansão da agricultura em novas fronteiras agrícolas no Brasil, incluindo o cultivo irrigado sob pivô central, muitas vezes com práticas de rotação de culturas inadequadas, tem proporcionado o aumento na incidência e na distribuição espacial de nematoides. Considerando diferentes culturas de grãos, as mais distribuídas e cultivadas no país, os principais nematoides que as acometem são o Nematóide de Galha (*Meloydogine incognita* e *Meloydogine javanica*), o Nematóide das Lesões Radiculares (*Pratylenchus brachyurus*) e, ainda, o Nematóide de Cisto (*Heterodera glycines*). De acordo com a Sociedade Brasileira de Nematologia (<https://nematologia.com.br/>), as perdas nas mais variadas áreas de cultivo e espécies agrícolas podem variar entre 5 e 35%. Em casos mais severos, as perdas podem ser ainda maiores, próximas a 100%. Os sintomas na parte aérea das plantas, na maioria das vezes, são facilmente confundidos com outras causas, entre elas a deficiência de nutrientes, o ataque de pragas e doenças, deficiência hídrica e compactação de solo. Além do uso de cultivares resistentes, uma ferramenta importante por ser de baixo custo e fácil adoção pelos agricultores, outras medidas de controle complementares e estratégicas são: (1) rotação de culturas adequadas; (2) utilização de tratamento de sementes com nematicidas; (3) descompactação do solo; (4) melhoria do equilíbrio do pH no perfil do solo; (5) manutenção de bons níveis de potássio; e (6) aumento nos teores de matéria orgânica no solo (coberturas verdes) (Dias et al., 2005).

Para o desenvolvimento de cultivares, o melhoramento de plantas depende da existência de variabilidade no germoplasma sobre a qual o melhorista exercerá seleção, de forma a identificar as plantas que apresentem as características mais favoráveis, isto é, aquelas que irão levar a um maior ganho genético com a seleção. Os marcadores moleculares podem ser uma excelente ferramenta ao longo de todo o processo de

melhoramento, incluindo o estudo da variabilidade do germoplasma e a seleção dos genótipos superiores.

De maneira objetiva, os marcadores moleculares podem ser definidos como marcas genéticas – enzimas ou sequências de DNA – que estão fisicamente associadas a locos envolvidos no controle genético de características que possibilitam a distinção entre indivíduos contrastantes. Eles podem ser identificados por meio do uso de enzimas de restrição, hibridização ou comparação entre sequências homólogas de DNA, via PCR (*Polymerase Chain Reaction*, ou reação de polimerização em cadeia da enzima DNA polimerase), por sequenciamento direto e comparação (alinhamento) de fragmentos das moléculas de DNA, ou ainda por métodos que combinem algumas destas técnicas (Barros & Souza, 2012).

As vantagens do uso de marcadores moleculares pelos programas de melhoramento vegetal em detrimento ao uso apenas de seleção com base em marcadores fenotípicos ou morfológicos residem no fato de que os marcadores moleculares são ilimitados em número, geralmente de fácil detecção, geram um alto nível de polimorfismo entre os genótipos estudados, são neutros em relação aos efeitos ambientais, com pouco ou nenhum efeito de epistasia ou pleiotropia e, em geral, se comportarem como caracteres de herança simples e previsível (Williams, 1990; Resende et al., 2014).

Nas últimas décadas, vários trabalhos foram desenvolvidos com diversas espécies vegetais de interesse agrônomo utilizando marcadores moleculares em estudos de diversidade genética, evolução, análise de pedigree, mapeamento genético, recuperação do genoma recorrente em programas de retrocruzamentos e na seleção assistida de características de interesse agrônomo. Inicialmente, o predomínio foi o uso de marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), codominantes, e RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), dominantes. Posteriormente, marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) foram desenvolvidos a partir de marcadores RAPD ligados a genes de resistência a doenças. Marcadores SSR (*Simple Sequence Repeats*) também foram sendo gradativamente desenvolvidos e disponibilizados. Atualmente, a classe que recebe maior atenção da comunidade científica é a dos marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Os SNPs são diferenças entre fragmentos homólogos de DNA em um único nucleotídeo, ou diferenças devidas a pequenas inserções ou deleções (*indels*) de nucleotídeos. A sua alta densidade no genoma somada ao desenvolvimento de plataformas de genotipagem

automatizadas e com grande capacidade de processamento, a custos cada vez mais reduzidos, abriram novas possibilidades para a aplicação e uso desses marcadores moleculares na rotina dos programas de melhoramento de plantas (Barros & Souza, 2012).

O mapeamento constitui uma das aplicações de maior impacto da tecnologia dos marcadores moleculares na análise genética e no melhoramento, uma vez que possibilita a identificação de regiões genômicas envolvidas no controle genético de característica alvo, a quantificação dos efeitos dessas regiões e a seleção assistida ou mesmo clonagem de genes candidatos. De maneira geral, é possível afirmar que existem quatro métodos distintos de seleção assistida por marcadores (SAM) de genótipos superiores em programas de melhoramento vegetal: (1) SAM utilizando marcas em equilíbrio de ligação com locos que controlam características qualitativas (locos de efeito principal) ou quantitativas (QTLs) na população sob seleção, mas possivelmente em desequilíbrio dentro de progênies ou gerações diferentes; (2) SAM utilizando marcadores em desequilíbrio de ligação ao nível da população; (3) seleção assistida por genes (SAG), que se baseia em mutações funcionais ou alelos com efeitos conhecidos, ou seja, os marcadores são os próprios genes; e (4) seleção genômica (SG) (Resende et al., 2014).

Considerando os programas de melhoramento de plantas para resistência a doenças, como a resistência a nematoides, que empregam a SAM como ferramenta auxiliar, deve-se considerar como atividades prioritárias e de rotina: (1) a caracterização contínua da variabilidade genética dos patógenos e do hospedeiro; (2) a introdução e caracterização de novas fontes de resistência; e (3) a identificação de novos marcadores moleculares ligados a alelos de resistência. Esta estratégia deve ser conduzida de maneira integrada na instituição ou empresa, ou mesmo em parceria com outras instituições ou empresas, preferencialmente sempre incluindo o setor produtivo (Williamson & Kumar 2006; Barros & Souza, 2012).

No que se refere à rotina de análises da SAM, inicialmente é realizada a extração de DNA das amostras ou plantas em teste, geralmente a partir do tecido foliar ou de sementes, a qual pode ser realizada por três métodos: (i) lise alcalina, protocolo simples e rápido, muito usado como rotina, mas que resulta em um DNA de menor pureza, sendo assim mais adequado para análises em larga escala e que não demandam armazenamento das amostras de DNA; (ii) CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), protocolo que permite a obtenção de DNA com maior pureza, recomendado para genotipagens baseadas em sequenciamento, hibridização e/ou digestão enzimática; e

(iii) kits comerciais, os quais também resultam em um DNA de melhor qualidade. A partir do DNA, a genotipagem com os marcadores moleculares é então realizada. A consolidação de uma plataforma robusta para análises de rotina em larga escala resulta no aumento de eficiência na seleção de genótipos superiores, em menor espaço de tempo, demandando menos mão de obra e reduzindo os custos por dado de genotipagem obtido. Isso leva ao desenvolvimento mais eficiente, racional, rápido e com menor investimento de cultivares com características agronômicas desejadas, com a resistência a nematoides.

Referências

- Barros EG, Souza TLPO (2012) Biotecnologia aplicada à cultura do feijoeiro. In: Cançado GMA, Londe LN (Eds.) Biotecnologia aplicada à agropecuária. Belo Horizonte: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, 648 p.
- Dias WP, Silva JFV, Garcia A, Carneiro GES (2005) Nematóides de importância para a soja no Brasil. In: Boletim de Pesquisa de Soja 2006. Rondonópolis: Fundação MT, p. 139-151.
- Resende MD V, Silva FF, Azevedo CF (2014) Estatística matemática, biométrica e computacional: modelos mistos, multivariados, categóricos e generalizados (REML/BLUP), inferência bayesiana, regressão aleatória, seleção genômica, QTL-GWAS, estatística espacial e temporal, competição, sobrevivência. Visconde do Rio Branco: Suprema, 882 p.
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Williamson VM, Kumar A (2006) Nematode resistance in plants: the battle underground. *Trends in Genetics* 22: 396-403.