

# **Validação de marcadores microsatélites para resistência do trigo à giberela**

**Me. Adriana Scherloski  
(Doutoranda em Genética e Melhoramento – UEM)**

**2015**

# Melhoramento Genético

- Programas de melhoramento

- Genótipos superiores → Fenótipo

- Baixa herdabilidade

- Caracteres quantitativos



**Influência ambiental**

- Técnicas de marcadores de DNA → Genótipo

- Ampla amostragem do genoma



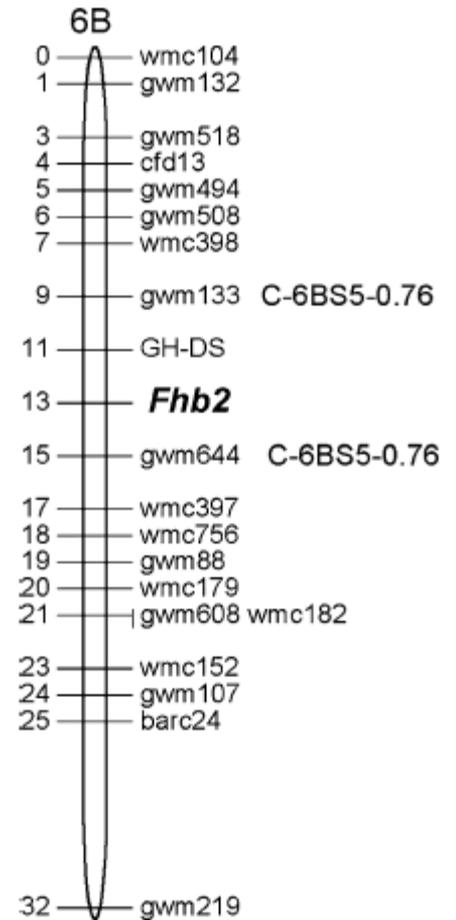
**Sem influência ambiental**

# Marcadores Moleculares

Marcadores moleculares são segmentos de DNA que estão, fisicamente, ligados a locos que determinam características de interesse e permitem a identificação de variações nos segmentos de DNA.



Seleção Assistida por  
Marcadores Moleculares  
(SAM)



Fonte: Cuthbert, et al., 2007.

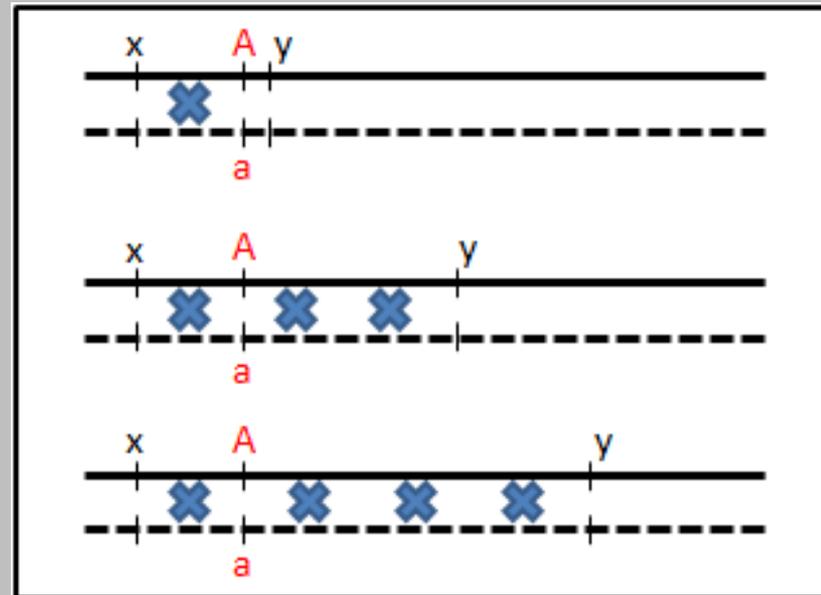
# SAM

- Obtenção dos M.M.;
- Associação entre M.M. e fenótipo;

Validação

Utilização das informações na seleção

Sucesso da SAM depende do grau de associação entre o marcador e a característica de interesse.



# Etapas para validação de marcadores moleculares

- Obtenção do material genético;
- Fenotipagem;
- Genotipagem;
- Associação entre fenótipo e marcadores moleculares;

# Validação de marcadores microssatélites para resistência do trigo à giberela

- Giberela – *Fusarium graminearum*;



- Variedades resistentes

- Sumai 3, Ning7840, Wangshuibai e Frontana

- \*Tipo I: infecção inicial

- \*Tipo II: disseminação do fungo na espiga

- \*Tipo III: redução ao acúmulo de DON

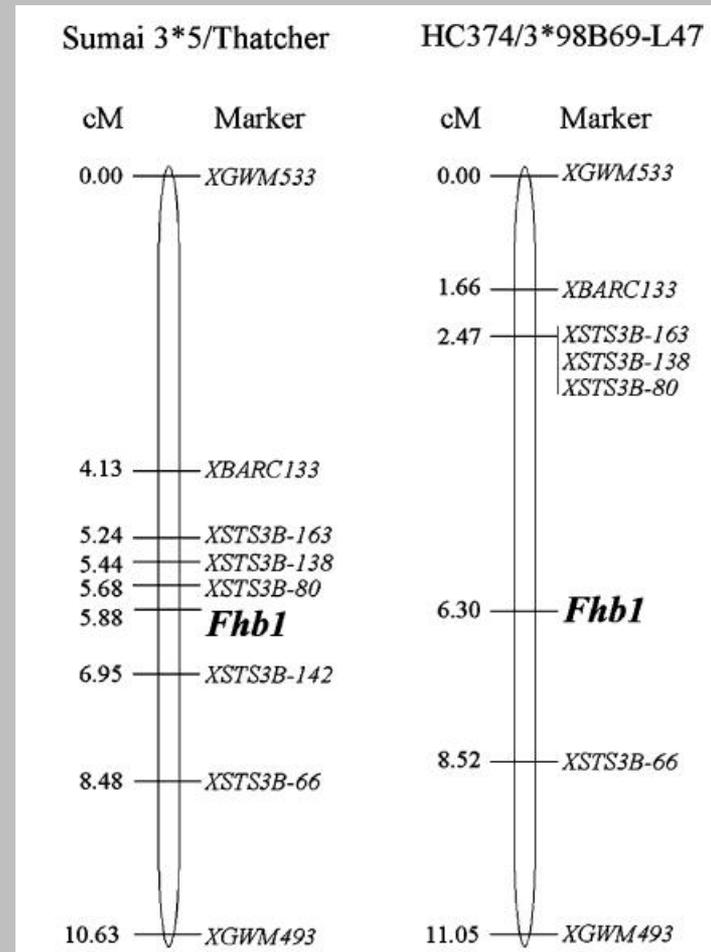
- \*Tipo IV: resistência do grão à infecção

- \*Tipo V: tolerância

- Herança poligênica

- QTLs – Quantitative Trait Loci

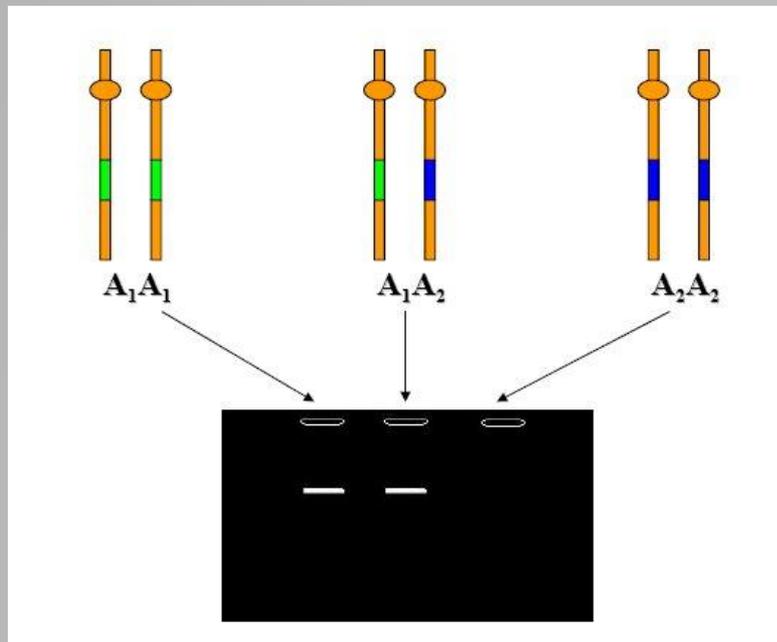
- QTLs X Marcadores moleculares



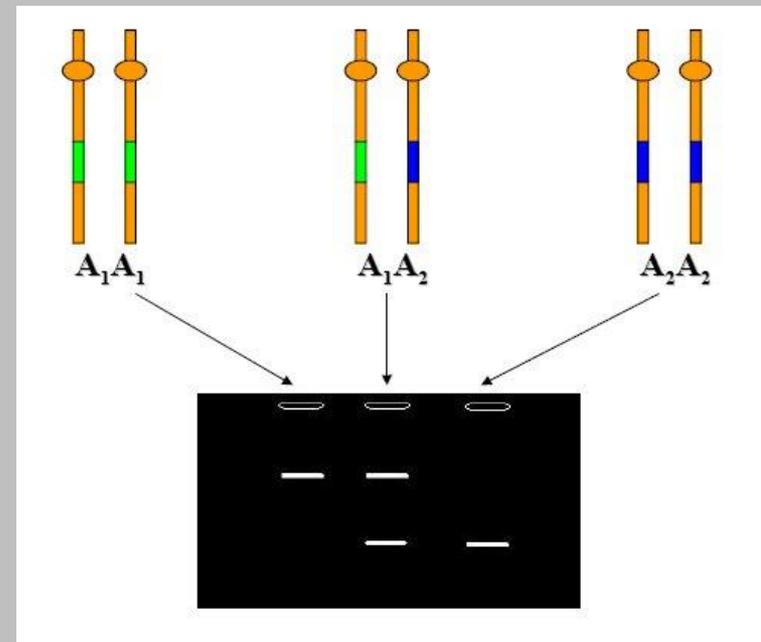
- Marcadores microssatélites (SSR) – Simple Sequence Repeat – Litt e Luty (1989)

- Pequenas seqüências (1 a 4 nucleotídeos) repetidas em tandem;
- Alto grau de polimorfismo;
- Ampla distribuição nos genomas.

### Marcadores Dominantes



### Marcadores Co-dominantes



# Obtenção de material genético

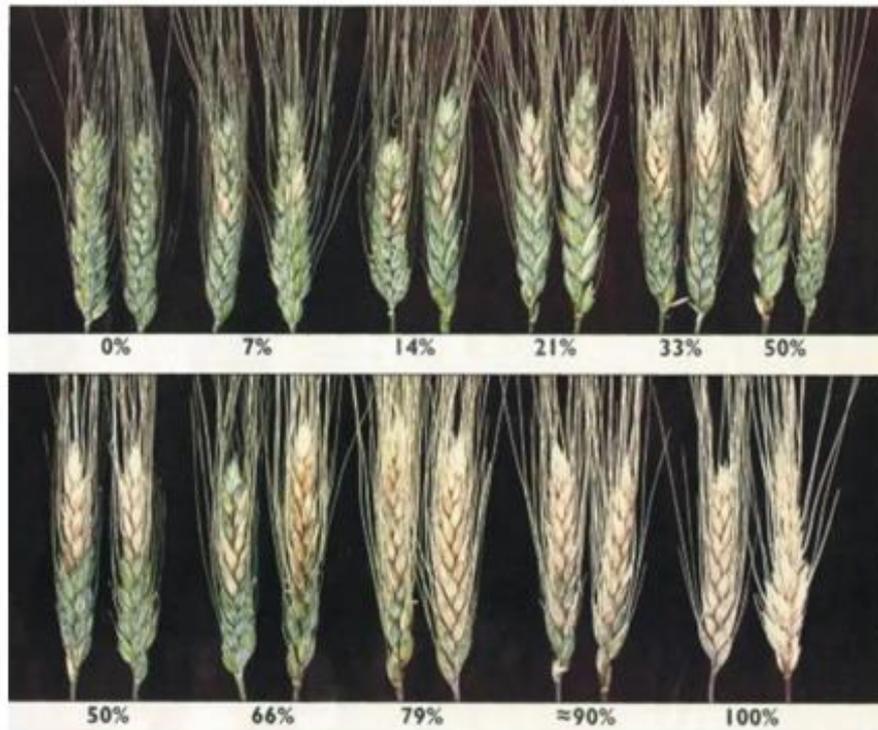
- Casa de vegetação:



## - Campo experimental:



# Fenotipagem

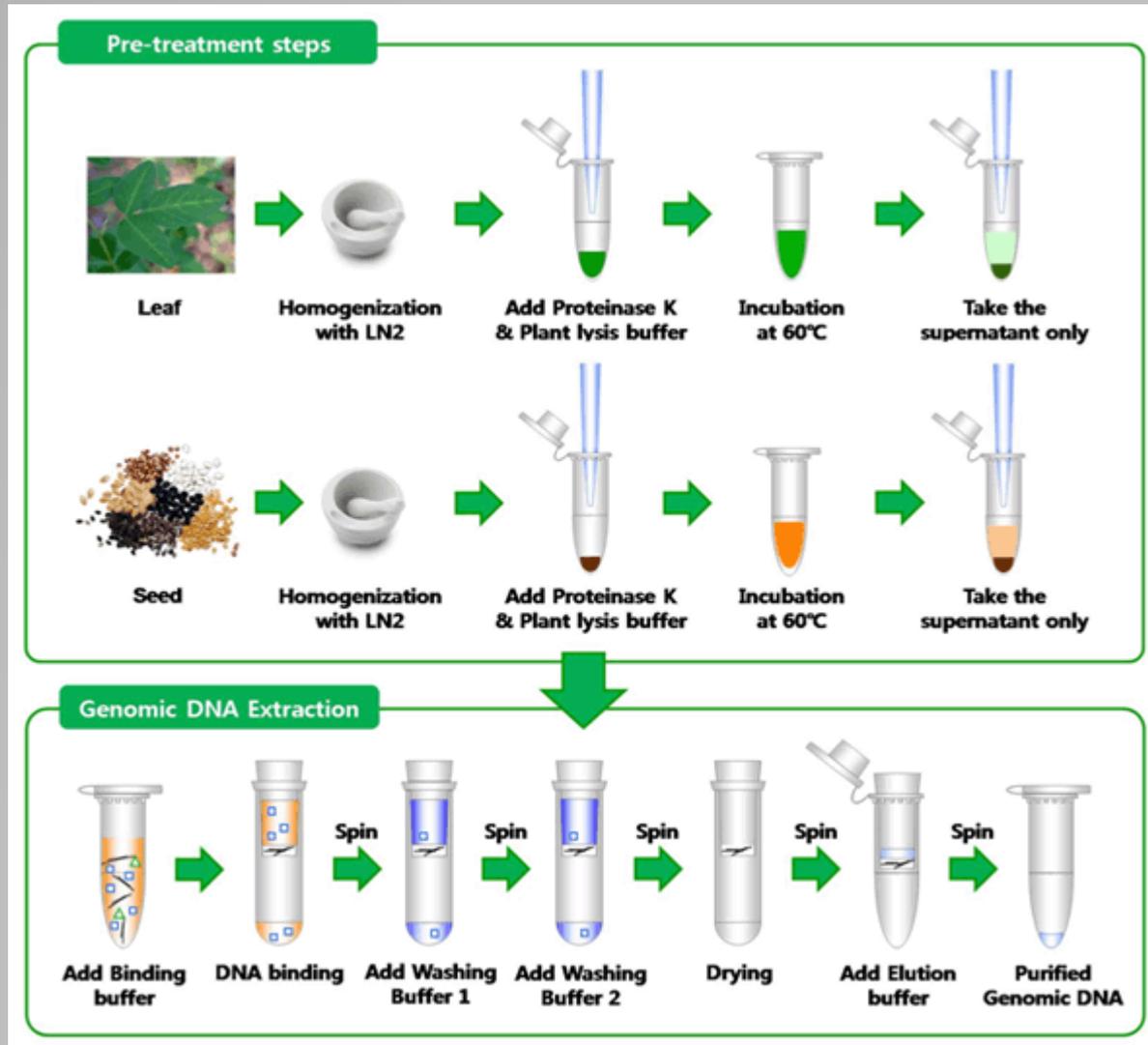


**Figura 4.** Escala de severidade de giberela proposta por Stack e McMullen (1995).

% severidade (média 20 espigas) - estágio grãos massa mole				
Sulco	Cultivar	REP 1 % sev	REP 2 % sev	Média
1	OC 965	7.1	4.1	5.58
2	OC 963	3.1	1.8	2.44
3	CDI 2004	16.6	12.6	14.63
4	CD 2014	2.7	1.3	2.01
5	CD 200113	1.5	1.6	1.55
6	CD 200132	1.3	1.1	1.20
7	CD 200224	1.8	0.6	1.20
8	CDI 200205	2.5	2.8	2.66
9	CD 200232	3.0	4.6	3.78
10	CDI 0408	2.6	3.1	2.84
11	CD 0532	5.0	6.4	5.70
12	CD 0568	2.3	1.4	1.82
13	CD 0684	0.9	1.7	1.30
14	CD 0625	2.2	1.8	1.99
15	CD 0665	3.2	6.6	4.92
16	CD 0559	1.1	2.2	1.64
17	CD 0515	6.8	7.0	6.90
18	CD 0830	3.8	2.6	3.24
19	CD 0833	0.9	4.8	2.82
20	BRS GUAMIRIM	1.5	2.0	1.72
21	QUARTZO	0.9	0.5	0.68

# Genotipagem

- Extração de DNA;





# -Amplificação dos locos microssatélites;

## -PCR:

DNA

Primer (F e R)

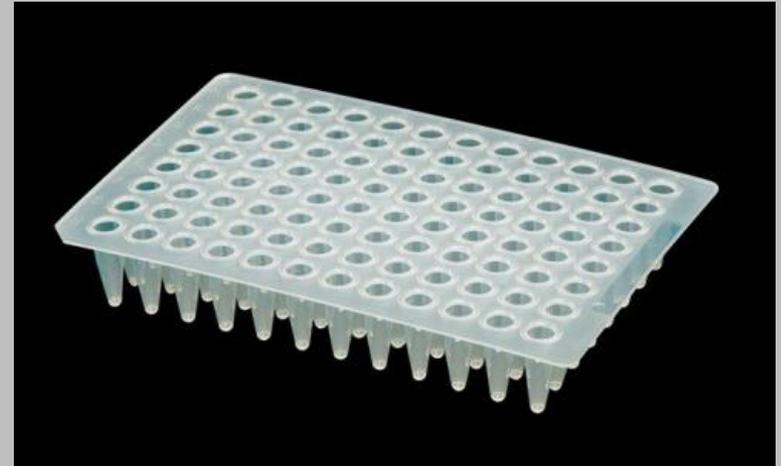
MgCl<sub>2</sub>

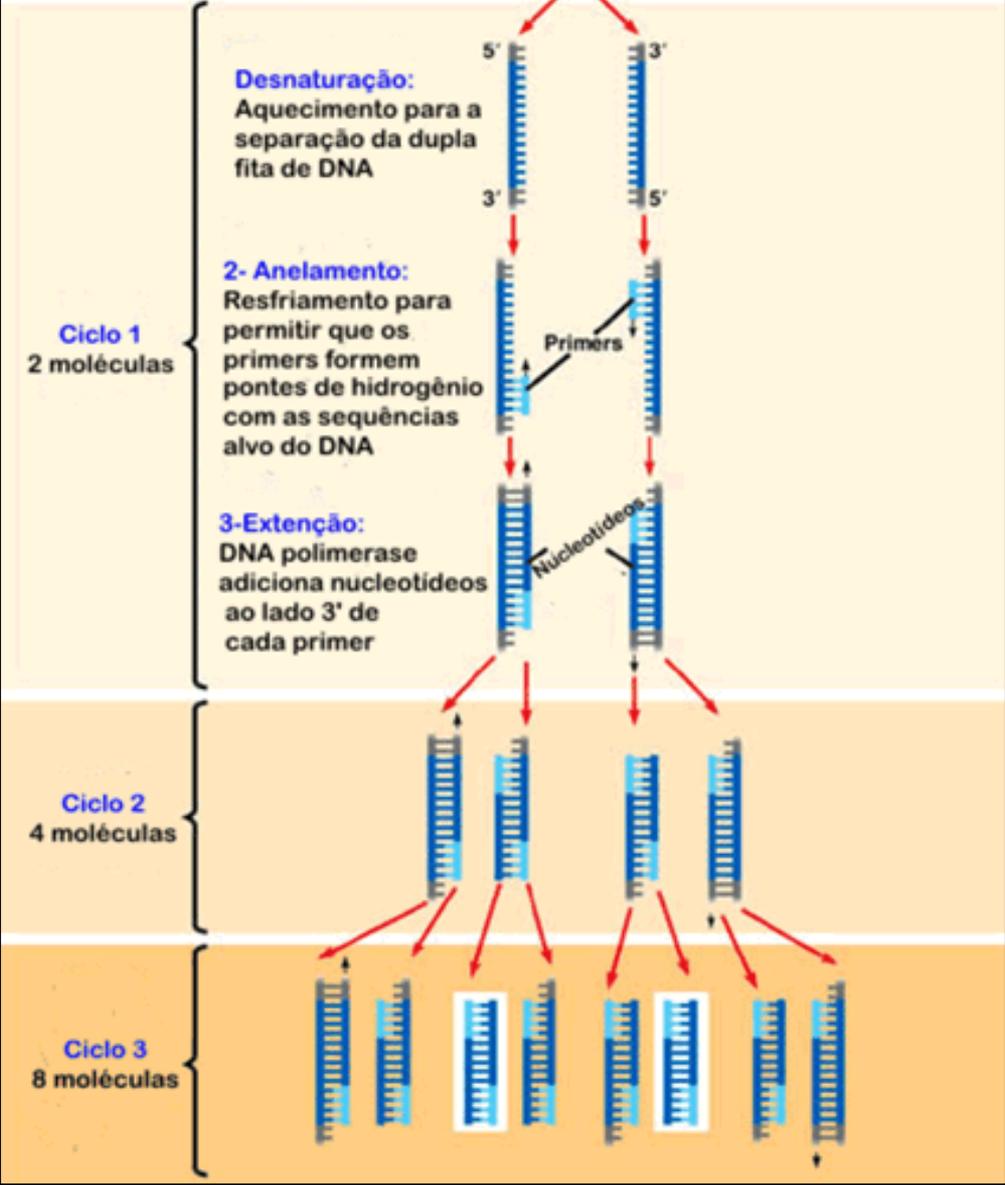
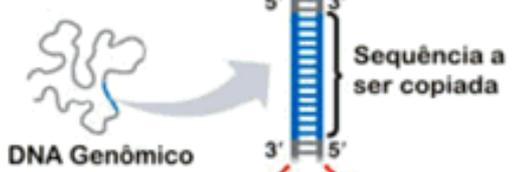
dNTP (A, C, T e G)

Taq DNA polimerase

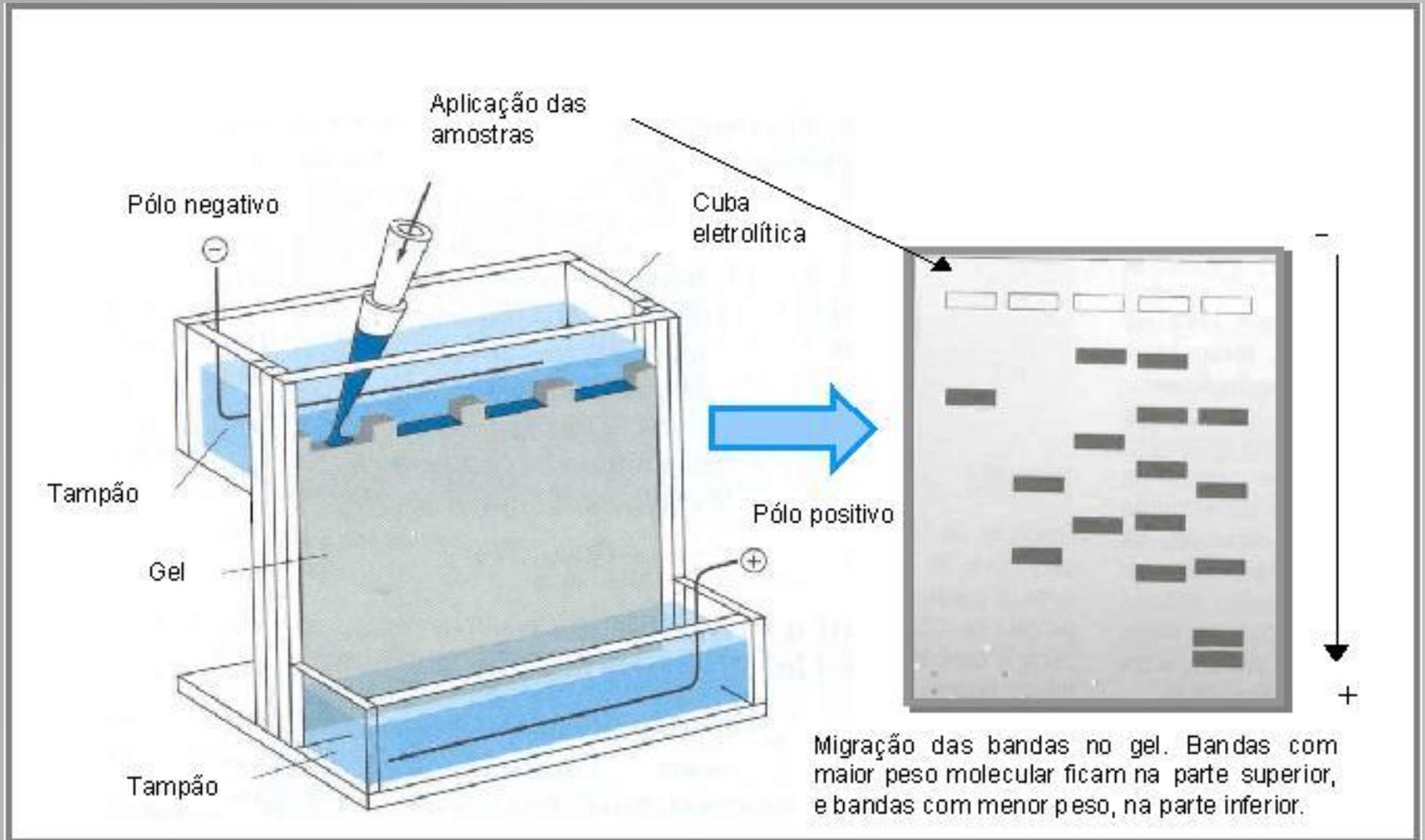
Tampão

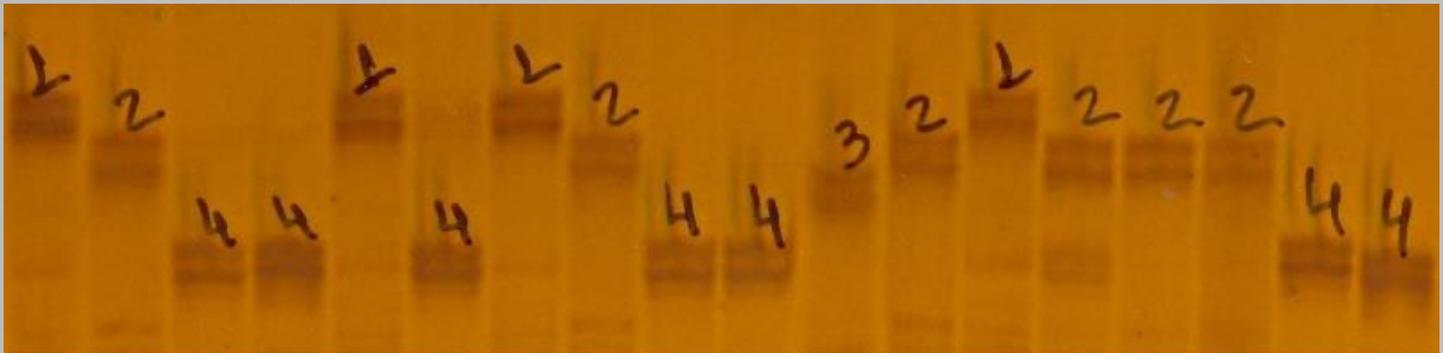
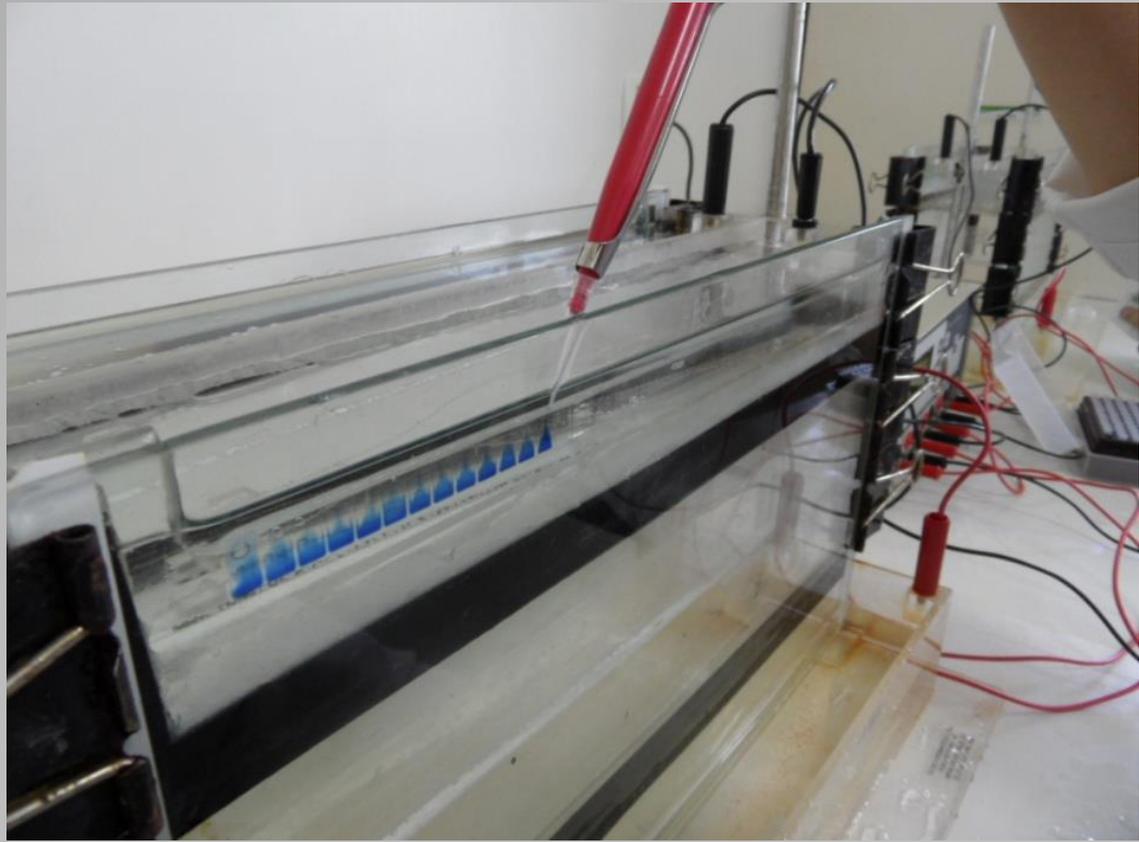
Água





- Separação de fragmentos amplificados:
  - Gel de poliacrilamida:





Calibri 11
Quebrar Texto Automaticamente
Geral
Formatação Condicional
Formatar como Tabela
Estilos de Célula
Inserir
Excluir
Formatar
AutoSoma
Preencher
Limpar
Classificar e Filtrar
Localizar e Selecionar

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
1		Média - 2010	Média - 2011 (%)	Classificação	Xbarc 101	Xgwm 533	Xgwm 639	Xbarc 133	Xgwm 493	Xbarc 147	Wmc 397	Xbarc 75	Xgwm 389	Xbarc 24	Xbarc 180	Wmc 398
2	FRONTANA	*	4	R	33	11	33	33	11	22	33	22	44	11	22	33
3	NING 7840	5	5.3	R	22	11	11	22	11	33	33	22	11	22	11	11
4	CD 0940	4.25	3.3	R	33	44	33	11	11	33	33	22	44	44	33	22
5	CD 0964	4.5	7.75	I	33	22	11	11	22	33	33	22	22	33	44	33
6	CD 0966	4.75	4.9	R	33	44	33	11	22	33	33	33	11	33	11	22
7	CD 0967	5	0.85	R	44	22	33	33	11	22	33	33	22	22	11	22
8	CD 0973	4.25	3.4	R	44	22	11	11	11	33	33	33	11	44	11	33
9	CD 1072	4.5	9.05	I	33	44	33	9	22	33	33	33	11	22	11	22
10	CD 1084	4.25	4.2	R	44	22	33	33	11	22	22	9	44	44	11	22
11	CD 118	5.5	9.25	I	33	22	33	33	11	22	22	22	44	33	22	33
12	ONIX	*	3.05	R	33	22	22	22	11	33	22	33	44	33	11	33
13	QUARTZO	*	2.25	R	44	22	33	22	11	33	22	33	44	33	11	33
14	FUNDACEP 52	*	4.05	R	33	9	22	22	11	33	11	33	11	22	22	11
15	FUNCAEP RAÍZES	*	2.45	R	33	22	33	11	11	33	22	9	22	33	11	33
16	BRS 177	3.4	1.65	R	33	44	11	11	11	33	22	22	44	33	11	33
17	BRS 179	5.75	1.1	R	33	44	33	11	11	33	22	22	44	44	22	11
18	BRS PARDELA	*	4.8	R	33	22	22	33	11	22	22	22	11	11	11	11
19	BRS GUAMIRIM	*	1.95	R	33	22	11	33	22	33	33	22	44	11	11	11
20	CD 1124	---	2.8	R	33	9	44	11	22	33	33	33	11	33	22	33
21	CD 1125	---	4.2	R	33	44	33	33	22	22	33	22	22	33	11	33
22	CD 1126	---	5.45	R	33	44	33	33	11	22	22	22	44	11	11	11
23	CD 1127	---	4.95	R	33	44	33	33	11	22	22	22	44	11	11	11
24	CD 1128	---	8.1	S	33	44	33	11	11	33	22	9	33	22	11	33
25	CD 1129	---	8.25	S	33	44	11	11	11	33	33	22	22	22	22	22

Plan1 Plan2 Plan3 Plan4 Plan5
Média: 26.4166667 Contagem: 12 Soma: 317
100%

# Associação entre fenótipo e marcadores moleculares

Programa Genes\*

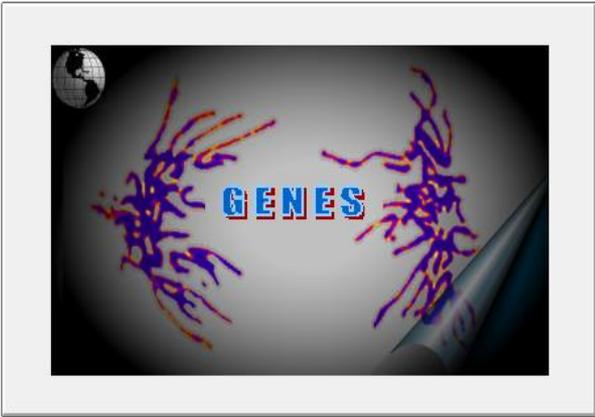
Finalizar Geral Utilitários Idioma

Estadística Experimental Biometria Análise Multivariada Diversidade Genética Simulação Matrizes Integração

Análise de Variância  
Estatísticas Descritivas  
Imputação de Dados  
Regressões  
Correlações  
Comparações entre Médias  
Métodos de Correção de Estande  
Tabela de Contigência  
Testes de Qui-quadrado  
Teste de Normalidade  
Análise Global de Experimentos  
Análise Não Paramétrica

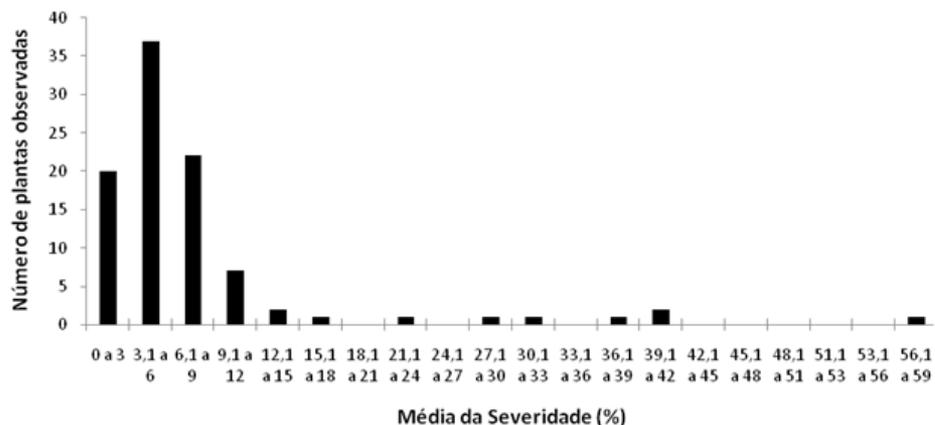
Calculadora Estatística Animação Matriz Gráfico GenesCalc

Programa Genes\* - Citação :  
Experimental- VS 2014.6.1  
Cruz, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. Acta Scientiarum. v.35, n.3, p.271-276, 2013



Trilha: 04/05/2015 21:08 CAPS NUM

21:08 04/05/2015



**Figura 5.** Distribuição de freqüência das médias de severidade (%) observados fenotipicamente nas linhagens e cultivares avaliadas.

**Tabela 4.** Eficiência de Seleção para resistência do trigo à giberela, com o uso de marcadores moleculares.

Marcadores	Acertos R (%) <sup>1</sup>	Acertos S (%) <sup>2</sup>	ES (%) <sup>3</sup>
Wmc397	72	61	70
Xbarc180	72	35	67
Xbarc133	66	33	50
Xbarc147	65	34	50
Wmc397 + Xbarc180 + Xbarc133 + Xbarc147	69	36	56

<sup>1</sup>Percentual de plantas que foram selecionadas como R pelos marcadores e que forma R na análise fenotípica.

<sup>2</sup>Percentual de plantas que foram selecionadas como S pelos marcadores e que forma S na análise fenotípica.

<sup>3</sup>Percentual de plantas que foram selecionadas corretamente pelos marcadores moleculares, incluindo R e S.

**Tabela 3.** Análise de associação entre marcadores moleculares e resistência do trigo à giberela, utilizando ANOVA, teste de Tukey, teste de Qui-Quadrado e análise de Regressão Linear Simples.

Marcador	Cromossomo	Posição (cM) <sup>(1)</sup>	N° de alelos	Médias da severidade de Giberela (%)				Análise de Variância		Análise de Contingência		Regressão Linear	
				Alelo 1 <sup>(2)</sup>	Alelo 2	Alelo 3	Alelo 4	F	P(%)	$\chi^2$	P (%)	R <sup>2</sup> (%)	P(%)
Xgwm 389	3B	5,0	4	5,29a <sup>(3)</sup>	7,89a	7,63a	8,34a	0,293	100,000	3,652	30,146	0,651	100,000
Xgwm 533	3B	11,1	4	7,72a	4,67a	11,09a	5,16a	2,691	0,052	8,422	3,804	0,193	100,000
Xbarc 133	3B	15,6	3	4,69a	9,41a	9,20a	-	2,948	0,057	1,426	48,996	4,542	4,025
Xbarc 147	3B	16,1	3	7,77a	8,23a	7,49a	-	0,065	100,000	9,468	0,878	0,114	100,000
Xgwm 493	3B	21,6	2	6,56a	9,52a	-	-	2,505	0,116	4,574	3,245	2,623	11,685
Xbarc 75	3B	-	3	5,04a	8,48a	7,06a	-	0,516	100,000	1,470	47,491	0,010	100,000
Xbarc 180	5A	11,1	4	5,03b	8,00ab	14,67a	4,43b	4,188	0,008	22,618	0,004	6,725	1,304
Xgwm 639	5A	53,8	4	7,59a	4,13a	7,85a	9,44a	0,715	100,000	6,484	9,028	0,756	100,000
Wmc 397	6B	37,3	3	14,25a	6,36b	5,35b	-	7,974	0,000	17,584	0,015	11,950	0,078
Xbarc 24	6B	54,7	4	13,28a	8,49ab	4,25b	8,79ab	2,947	0,036	31,056	0,000	3,187	8,178
Xbarc 101	6B	-	3	15,56a	6,59b	7,95ab	-	4,116	0,019	0,952	62,105	1,885	18,216
Wmc 398	6B	-	3	3,94a	5,08b	10,03b	-	3,967	0,022	22,024	0,001	7,279	0,818

<sup>(1)</sup>Liu et al., 2009.

<sup>(2)</sup>Os alelos foram numerados do fragmento maior (alelo 1) para o menor. As cultivares e linhagens avaliadas apresentam genótipo homocigoto para os alelos indicados.

<sup>(3)</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras na linha não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## Considerações Finais

- Aumento na eficiência de seleção;
- Monitoramento dos genes de interesse;
- Busca contínua por novos marcadores ligados aos locos de interesse;
- Mapeamento de QTLs.



**Obrigada!**

([scherloski.a@gmail.com](mailto:scherloski.a@gmail.com))