MAPA GENÉTICO DO FEIJOEIRO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.) BASEADO EM MARCADORES MICROSSATÉLITES E RAPD

FERREIRA, Luciana Gomes³; **TELES**, Fábio Luís²; **DAVI**, Giselle Santos³; **NOBREGA**, Caroline Corrêa⁴; **FERREIRA**, Luciene Cristina³; **BUSO**, Gláucia Salle Cortopassi⁵; **BRONDANI**, Rosana Perreira Vianello⁶; **BRONDANI**, Cláudio⁶; **MELO**, Leonardo Cunha⁶; **DEL PELOSO**, Maria José⁶; **BASSINELLO**, Priscila Zaczuk⁶; **SIBOV**, Sérgio Tadeu⁷; **CARNEIRO**, Monalisa Sampaio⁸.

Palavras-chave: mapa molecular, marcadores genéticos, mapa de ligação.

1. INTRODUÇÃO

O melhoramento de plantas é uma das tecnologias desenvolvidas para emprego na agricultura que apresentou maior sucesso no século XX. A produtividade de plantas de interesse agrônomo tem aumentado continuamente, graças à adequação das condições ambientais ao melhoramento genético das plantas. O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma espécie leguminosa bastante utilizada na alimentação humana, fazendo parte da dieta de mais de 500 milhões de pessoas na América Latina e África. O feijão apresenta grande importância econômica e social, sendo umas das principais fontes de proteína de origem vegetal. Mapas genéticos para feijoeiro comum tornaram-se acessíveis a partir da década de 90, baseados na combinação de diferentes classes de marcadores moleculares, que surgiram como uma grande contribuição do desenvolvimento das técnicas moleculares que permitem a análise do genoma. Dentre os marcadores moleculares utilizados nos estudos de mapeamento genético, os marcadores microssatélites destacam-se devido à ampla dispersão no genoma, multialelismo, alto nível de informação de polimorfismo, codominância e por apresentarem alta reprodutibilidade. Além disso, os marcadores microssatélites podem ser analisados via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando-se poucas quantidades de DNA, característica também encontrada nos marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). A construção de mapas genéticos requer a escolha de genitores que apresentam o máximo de polimorfismo, e que sejam produzidas gerações em que os locos estejam em desequilíbrio de ligação. O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de um mapa de ligação em feijoeiro comum, baseado em marcadores microssatélites e RAPD, a partir de uma população F₂ resultante do cruzamento entre as linhagens CNFC 7812 e CNFC 8056. Estas linhagens pertencem ao tipo de grão Carioca, e são contrastantes para o teor de proteína do grão. A construção deste mapa contribuirá para o melhoramento genético do feijoeiro comum, pois permitirá incorporação as informações resultantes da análise genômica na identificação de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) para qualidade de grão.

2. METODOLOGIA

Para obtenção da população segregante (F₂) foi realizado um cruzamento entre as linhagens do feijoeiro tipo Carioca, CNFC 7812 e CNFC 8056, sendo estas contrastantes para o teor de proteína com 24% e 19%, respectivamente. O DNA

genômico foi extraído utilizando o método CTAB proposto por Hoisington et al. (1994), com modificações.

Uma avaliação inicial do nível de polimorfismo visando selecionar marcadores informativos foi realizada utilizando os genitores (CNFC 7812 e 8056) e quatro indivíduos da progênie F₂. No total, foram testados 757 marcadores moleculares, sendo 498 microssatélites e 259 RAPD. Para a seleção dos marcadores microssatélites, foram testados 215 pares de primers da série PV (*Phaseolus vulgaris*), 58 da série BM (*Bean microsatellite*), 81 da série PVM (*Microsatellite vulgaris Phaseolus*), 102 da série PV/IAC e 42 de outras bibliotecas (AJ416, AG, X e Z). As reações de amplificação para os marcadores microssatélites foram realizadas com 15 ng de DNA, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3) e 50 mM de KCl (pH 8,0), 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTPs, 0,28 mM dos *primers* R + F e 1U de Taq polimerase. As amostras foram submetidas à desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto; temperatura de anelamento do *primer* (48 a 56° C, dependendo de cada para de *primer*) por 1 minuto e a extensão final a 72°C por 1 minuto. Os produtos resultantes da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e a visualização das bandas realizada em solução de nitrato de prata conforme descrito por Creste et al (2003).

Um total de 259 *primers* RAPD (*kits* A, AA, AB, AC, AE, AF, AJ, B, C, D, E, F, H, I, J, L, N, O, P, R, Z e W da Operon Technologies, Alameda, CA). As reações de amplificação para os marcadores RAPD foram realizadas conforme as condições descritas por Prado (2005). Cada reação de amplificação foi realizada para um volume total de 15 µl, contendo 15 ng de DNA, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl (pH 8,0), 2,8 mM de MgCl₂, 100 mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,4 µM do *primer* e 1 U de Taq polimerase. Estas foram submetidas a 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 35°C e 1 minuto a 72°C. Os ciclos foram seguidos de uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Os fragmentos de DNA foram separados, por eletroforese, em géis de agarose 1,2% em tampão TBE 1X (Tris-Borato 10mM, e EDTA 2mM), corados com brometo de etídeo (0,5µg/ml).

Após a obtenção dos dados moleculares foi utilizado o teste de aderência de χ^2 (qui-quadrado), para verificar a hipótese nula (H₀) de segregação mendeliana. Para controlar o nível de significância global, foi adotado o método de razão de falsas descobertas (FDR- *False Discovery Rate*) proposto por Benjamin e Hocheberg (1995). A construção do mapa foi realizada no programa JoinMap, versão 3.00 (Van Ooijen e Voorrips, 2001). Os grupos de ligação foram estabelecidos com um LOD mínimo de 3,00. A ordem dos marcadores foi estabelecida conforme os seguintes critérios: LOD mínima 2,00, limiar de recombinação = 0,30, valor de *ripple* = 3,00, limiar de *jump* = 5. As frações de recombinação foram convertidas em distâncias de mapa pela função Kosambi (Kosambi, 1944).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos 498 microssatélites testados, 17 (3,41%) não amplificaram e 31 (6,22%) resultaram em um padrão de bandas inespecíficas. Portanto, foram identificados 427 (85,74%) microssatélites que amplificaram produtos de boa qualidade. Destes, 41 (9,60%) foram identificados como sendo polimórficos entre os

genitores e 407 (95,31%) monomórficos. Sendo que, os 41 pares de *primers* polimórficos foram genotipados na população F₂.

Dos 259 *primers* RAPD testados, 239 (92,27%) revelaram um perfil de bandas nítidas e 20 (7,72%) não amplificaram qualquer fragmento. Dos *primers* que amplificaram fragmentos, 71 (27,40%) foram polimórficos e 168 (64,86%) foram monomórficos. Entretanto, em 31 (43,66%) dos *primers* polimórficos o perfil de bandas não se repetia nos indivíduos F₂. Estes marcadores foram descartados da genotipagem devido à baixa repetibilidade das marcas. Desta forma, foram utilizados 40 marcadores na genotipagem da população F₂, que produziram 63 locos polimórficos, originando 1,57 banda polimórfica por *primer*. Um total de 351 produtos de amplificação foi obtido nas análises dos 40 *primers* polimórficos, perfazendo uma média de 7,98 bandas por *primer*. Cerca de 87,3% das bandas polimórficas tiveram seu peso molecular variando entre 500 a 1500 pb. O comprimento médio das marcas polimórficas de RAPD foi 1023,254 pb, sendo que os fragmentos de tamanho máximo e mínimo mostraram 200 pb e 1900 pb, respectivamente.

O baixo polimorfismo obtido neste estudo (15,31%) pode ser atribuído a base genética estreita das plantas cultivadas, e neste caso específico pelos genitores pertencerem ao mesmo pool gênico (Mesoamericano) e ao mesmo grupo (carioca) e possuírem em suas genealogias genótipos ancestrais comum.

A segregação dos 102 marcadores polimórficos (41 locos microssatélites e 61 RAPD) foram analisados em uma progênie composta por 94 indivíduos, abrangendo um total de 9588 pontos genômicos analisados, destes 319 (3,32%) consistem de dados perdidos (115 e 204 correspondem a dados de microssatélites e RAPD, respectivamente). De acordo com análises do teste de χ^2 e do critério de correção de FDR verificou-se que 16 (15,68%) marcadores mostraram distorções da proporção esperada, sendo 3 marcadores microssatélites (U18791, PV 29 e PVM 49) e 13 marcadores RAPD (B10_1050, AB02_1767, B08_1714, F06_704, AF15_1102, W06_836, H01_200, AA18_1634, AE20_748, E06_624, J15_1288, E06_624, J09_996 e AE17_1368). Segundo Santos et al. (2003), mapas baseados em marcadores RAPD geralmente apresentam uma alta distorção de segregação, o que pode ser devido a uma distribuição não aleatória do mapa genético em decorrência do estreitamento genético, seleção natural, presença de incompatibilidade em uma região genômica não específica e problemas na ocorrência da gametogênese. Em seu trabalho, encontrou 22,37% de distorção de segregação utilizando marcadores RAPD na construção de mapa genético em *P. vulgaris*. Os marcadores que apresentaram desvios de segregação mendeliana foram usados nas análises de ligação.

Um total de 102 marcadores foram utilizados para estabelecer o mapa de ligação em feijoeiro comum. Aproximadamente 67% destes (68 locos) foram atribuídos aos grupos de ligação, sendo gerados dezessete grupos com um comprimento total de 781,4 cM. Os tamanhos individuais variaram de 6,7 a 139,0 cM, apresentando uma média de 45,96 ± 32,69. A distância média entre dois marcadores foi de 15,62 cM (Tabela 1).

Tabela 1. Características do mapa de ligação de *Phaseolus vulgaris* L., gerado a partir da população F₂ obtida do cruzamento entre as linhagens CNFC 7812 e CNFC 8056, utilizando marcadores RAPD e microssatélites.

Grupos de ligação	Comprimento do mapa (cM)	Número de marcadores ligados	Distância maior (cM)	Distância menor (cM)
Grupo 1	139,0	11	35,1	0,3
Grupo 2	80,7	7	33,2	3,8
Grupo 3	77,9	6	32,0	3,2
Grupo 4	62,1	3	38,3	23,8
Grupo 5	57,0	7	21,0	2,5
Grupo 6	53,5	3	37,0	16,5
Grupo 7	53,3	3	35,1	18,2
Grupo 8	40,7	3	20,6	20,1
Grupo 9	40,5	4	31,5	9,0
Grupo 10	38,0	5	22,6	2,9
Grupo 11	34,3	3	21,2	13,1
Grupo 12	32,4	2	-	32,4
Grupo 13	26,3	2	-	26,3
Grupo 14	20,8	3	18,7	2,1
Grupo 15	11,5	2	-	11,5
Grupo 16	6,7	2	-	6,7
Grupo 17	6,7	2	-	6,7

4. CONCLUSÃO

Mesmo com a elaboração de mapa de ligação em feijoeiro comum com uma distancia media de 15,62 cM, se faz necessário ampliar o numero de indivíduos da população segregante bem como incluir um maior numero de marcadores moleculares, principalmente marcadores do tipo codominantes. Tal estratégia ampliará a cobertura genômica deste mapa, permitindo maior saturação de região genômica associadas ao teor de proteína em feijoeiro comum.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENJAMIM, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling de false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of Royal Statistics Society.** Series B, v. 57 (1), p. 259-300, 1995.

BLAIR, M. W.; GIRALDO, M. C.; BUENDÍA, H. F. microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theor Appl Genet.** v. 113:100 -109, abril, 2006.

CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter,** Athens, n.4, v.19, p.1-8, 2001.

FERREIRA, L. G.; TELES, F. L.; DAVI, G. S.; BUSO, G. S. C.; BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; MELO, L. C.; DEL PELOSO, M. J.; BASSINELLO, P. Z.; SIBOV, S.T.; CARNEIRO, M. S. Mapa Genético do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) baseado em marcadores microssatélites e RAPD. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG - CONPEEX, 3., 2006, Goiânia. **Anais eletrônicos do III Seminário de pesquisa e pós-graduação**. [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2006. n.p.

HOISINGTON, D., KHAIRALLAH, M., GONZÁLEZ-DE-LÉON, D. **Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory**. 2 ed. México. D. F: CIMMYT, 1994.

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distance from recombination values. **Annuaire of Eugenetics**., v. 12, p. 172-175, 1944.

PRADO, F. G. R. **Identificação de fontes de resistência genética à mancha angular e antracnose em feijoeiro comum por meio de marcadores moleculares e inoculação**. 2005. 111f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Genética e Melhoramento de plantas)- EAEA, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005.

SANTOS, A. S.; BRESSAN-SMITH, R. E.; PEREIRA, M. G.; RODRIGUES, R.; FERREIRA, C. F. Genetic linkage map of *Phaseolus vulgaris* and identification of QTLs responsible for resistance to *Xanthomonas axonopldis* pv. *Phaseoli*. **Fitopatol. Vras**. v. 28(1), jan/fev. 2003.

VAN OOIJEN, J.W e VOORRIPS, R.E. JoinMap® version 3.0: software for the calculation of genetic linkage maps. **Wageningen: Plant Research International**. 2001.

FONTE DE FINANCIAMENTO: CAPES E PRODETAB.

³Mestranda em Biologia Molecular e Celular - Laboratório de Melhoramento de Plantas (EAEA/ UFG), Setor de Melhoramento Vegetal. biolgf@yahoo.com.br

²Mestrando em agronomia. EAEA/ UFG. Setor de Melhoramento Vegetal. teles_fl@yahoo.com.br

³Bolsista de iniciação científica. EAEA/ UFG. giselle_davi@yahoo.com.br

⁴Bolsista de iniciação científica. ICB/UFG. carolinenobrega@pop.com.br

⁵EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia, sac@cenargem.embrapa.br

⁶EMBRAPA – Arroz e Feijão, sac@cnpaf.embrapa.br

⁷Co-orientador/ ICB-UFG. sibov@agro.ufg.br

⁸Orientadora/ ICB-UFG, monalisa@icb.ufg.br