

DETECÇÃO DE LOCOS POLIMÓRFICOS UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES E RAPD EM FEIJOEIRO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.) VISANDO O MAPEAMENTO DE QTL PARA TEOR DE FIBRA.

TELES, Fábio Luís ^(1,A); **FERREIRA**, Luciana Gomes ⁽²⁾; **SANTOS**, Giselle dos ⁽¹⁾; **SILVEIRA**, César Rafael F. ⁽¹⁾; **SANTOS JÚNIOR**, Agenor C. M. ⁽¹⁾; **SILVANO**, Geovane S. ⁽¹⁾; **NÓBREGA**, Carolina C. ⁽¹⁾; **FERREIRA**, Luciene Cristina; **BUSO**, Gláucia S. C. ⁽⁴⁾; **BRONDANI**, Rosana P. V. ⁽³⁾; **BRONDANI**, Cláudio ⁽³⁾; **MELO**, Leonardo C. ⁽³⁾; **DEL PELOSO**, Maria José, ⁽³⁾; **BASSINELLO**, Priscila Z. ⁽³⁾; **CARNEIRO**, Monalisa S. ⁽⁵⁾; **SIBOV**, Sérgio Tadeu ⁽⁶⁾.

Palavras chaves – Marcadores moleculares, mapeamento genético, feijão.

1. INTRODUÇÃO

Para atender de forma rápida e precisa às necessidades de aumento da qualidade do grão no feijoeiro comum, as técnicas de melhoramento genético da cultura necessitam ser aprimoradas. Deste modo, ferramentas moleculares tornam-se uma importante alternativa possibilitando a identificação de regiões genômicas que controlam essas características, como o teor de fibras, por exemplo. O grão de feijão apresenta um equilíbrio interessante nas proporções de fibras solúveis e insolúveis para a alimentação humana. Assim, para o aumento da qualidade nutricional do grão de feijão, existe a necessidade da condução de estudos dirigidos para a obtenção de maiores informações relativas ao número de genes envolvidos, sua localização nos cromossomos, e a contribuição relativa de cada um deles na expressão final do caráter. Ferramentas moleculares são as mais adequadas para este estudo e, para o feijoeiro, já são utilizadas tanto na construção de mapas genéticos com diversos tipos de marcadores moleculares (Blair et al., 2006; Grisi 2006, Blair et al 2003; Yu et al., 2000) quanto na análise da diversidade genética (Franco et al., 2001, Emygdio, 2003).

Das classes de marcadores moleculares existentes, os microssatélites são os que mais se aproximam do marcador ideal para estudos de mapeamento genético e para a caracterização e exploração da variabilidade genética. Marcadores microssatélites são abundantes e uniformemente distribuídos por todo o genoma, co-dominantes e multialélicos, apresentando o maior conteúdo informativo por loco gênico entre todas as classes de marcadores moleculares. O que limita a utilização de microssatélites de forma ampla é o elevado custo inicial para seu desenvolvimento. Entretanto, uma vez desenvolvidos, esses marcadores tornam-se acessíveis a outros laboratórios através da publicação das seqüências dos iniciadores (*primers*) necessários para sua amplificação. Porém, ainda não existe um número suficiente de marcadores microssatélites que possibilitem uma ampla cobertura do genoma do feijoeiro.

Assim, para a obtenção de mapas genéticos com um número maior de marcas, outros tipos de marcadores podem ser utilizados. Marcadores RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA* - Williams et al., 1990) são uma classe de marcadores moleculares de menor custo e obtenção mais simples do que os marcadores microssatélites. Além do baixo custo, facilidade e rapidez em sua utilização, marcadores RAPD possuem a vantagem de não ser necessário o

conhecimento prévio da seqüência a ser amplificada. A desvantagem deste marcador, em relação a sua utilização para a confecção de mapas genéticos, é seu caráter dominante, não sendo possível à distinção de indivíduos heterozigotos.

O objetivo deste trabalho foi buscar locos informativos tanto de marcadores microssatélites quanto RAPD para a confecção de um mapa genético em feijoeiro comum visando o mapeamento de QTL relacionados ao teor de fibra.

2. MATERIAL E MÉTODOS.

Para o desenvolvimento de uma mapa genético em feijoeiro comum para o mapeamento de QTLs associados ao teor de fibras, uma população de mapeamento foi formada com 94 plantas F_2 originadas a partir do cruzamento das linhagens CNFC-7812 e CNFC-7829, contrastantes para o caráter teor de fibras, com 12,7% e 17% respectivamente. Para as análises moleculares, a seleção de um conjunto de marcadores polimórficos para a confecção do mapa de ligação é o primeiro passo para o mapeamento. Os testes foram realizados utilizando o DNA das linhagens contrastantes e de dois indivíduos da população F_2 .

O DNA genômico foi isolado de acordo como o protocolo Ferreira e Grattapaglia (1998) com modificações. A quantificação de DNA foi realizada comparando-se a concentração de amostras de DNA de cada acesso com amostra de DNA de fago λ na concentração de 10ng/ μ L, submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1,0% e a concentração das amostras de DNA das amostras foram obtidas comparando-se a fluorescência das mesmas, coradas com BrEt (Brometo de etídio) e visualizadas sobre luz ultravioleta.

Entre os marcadores microssatélites foram testados pares de *primers* das bibliotecas PVBR (*Phaseolus vulgaris* desenvolvido pelo Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Cenargen), PVIAC (*Phaseolus vulgaris* desenvolvido pelo Instituto Agrônomo de Campinas) BM (Bean microsatellite - GAITÁN-SOLÍS, 2002) AJ416 (bankgene), PvM (*Phaseolus vulgaris* desenvolvido na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Esalq) e outros (Bankgene), totalizando 496 microssatélites. Para a reação de amplificação por PCR foram utilizados 15 ng de DNA genômico em um volume final de 15 μ L contendo: 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,8; 1,5 mM $MgCl_2$; 04 mM dNTPs; 0,28 μ M de cada *primer* e 1U de *Taq* DNA polimerase. Utilizou-se termociclador modelo My Cycler (Bio-Rad), programado para 30 ciclos repetidos de 94°C por 1 minuto, 48°C a 56°C (dependendo do par de *primers*) por 1 minuto e 72°C por 7 minutos. Após, foi realizado um ciclo adicional de extensão a 72°C por 1 minuto. Os produtos das reações de amplificação foram separados eletroforicamente em géis de poliacrilamida a 6% corados com nitrato de prata.

Os *primers* RAPD testados na busca de locos polimórficos pertencem às séries: OPAA, OPA, OPC, OPE, OPF, OPG, OPH, OPT, OPW e OPZ da Operon Technologies, totalizando 214 *primers*. Nas reações de amplificação foram utilizados um volume final de 25 μ L contendo: 0,2mM Tris HCl pH 2.4; 0,5M de KCl; 3mM $MgCl_2$; 0.25mM dNTPs; 30ng de *primer*, 15 ng de DNA genômico, 1 U de *Taq* polimerase e H_2O q.s.p, submetidas à amplificação em equipamento termociclador My Cycler da Bio - Rad, utilizando o programa de 39 ciclos repetidos de 94°C por 15 segundos (desnaturação), 35°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 1 minuto (extensão), com um ciclo final de extensão a 72°C por 1 minuto (Emygdio et al. 2003). Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em agarose a

1,4% em tampão TBE (Tris-borato 90mM e EDTA 2mM). Após o término da eletroforese os géis serão corados com brometo de etídeo (0.5 ng/mL) e fotografados sob luz ultravioleta.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

Foram selecionados 136 locos polimórficos sendo 62 de microssatélites e 74 RAPD. Dentre os microssatélites 87% (431) mostraram bandas nítidas e bem definidas, entre estes 14% (62 - AG - 1 ; AJ416401; BM-150; BM-151; BM-154; BM-158; BM-166; BM-170; BM-183; BM-184; BM-185; BM-187; BM-188; BM-201; BM-205; BM-211; BM-53; BM-68; K-03288; PV-107; PV-12; PV-163; PV-227; PV-34; PV-37; PV-46; PV-54; PV-60; PV-67; PV-71; PV-78; PV-83; PV-87; PV-93; PVm 01; U - 18791; X-0466; X-80051; Z - 30347; PVm 02; PVm 13; PVm 52; PVm 21; PVm 65; PVm 45) foram polimórficos, 2% (9) não apresentaram repetibilidade e 84% (360) eram monomórficos.

Dos *primers* RAPD 97% (207) apresentaram bandas nítidas e definidas. Destes, 73% (151) foram monomórficos e 27% (56) foram polimórficos (Figura 1). Dentre os polimórficos, descartou-se 23% (13) por não apresentarem o mesmo padrão de polimorfismo em uma amostra maior de indivíduos F₂ restando 43 marcadores (OPA-02; OPA-04; OPA-13; OPAA-01; OPAA-02; OPAA-03; OPAA-09; OPAA-16; OPAC-07; OPAE-11; OPB-08; OPB-11; OPB-13; OPC-01; OPC-02; OPD-07; OPE-16; OPF-03; OPG-03; OPH-01; OPH-12; OPH-17; OPH-18; OPI-14; OPI-18; OPI-19; OPJ-16; OPL-14; OPL-17; OPN-07; OPP-07; OPR-13; OPW-19; OPZ-08). Dos 77% (43) restantes foi possível obter 74 locos polimórficos, com uma média de 1,7 locos por *primer*.

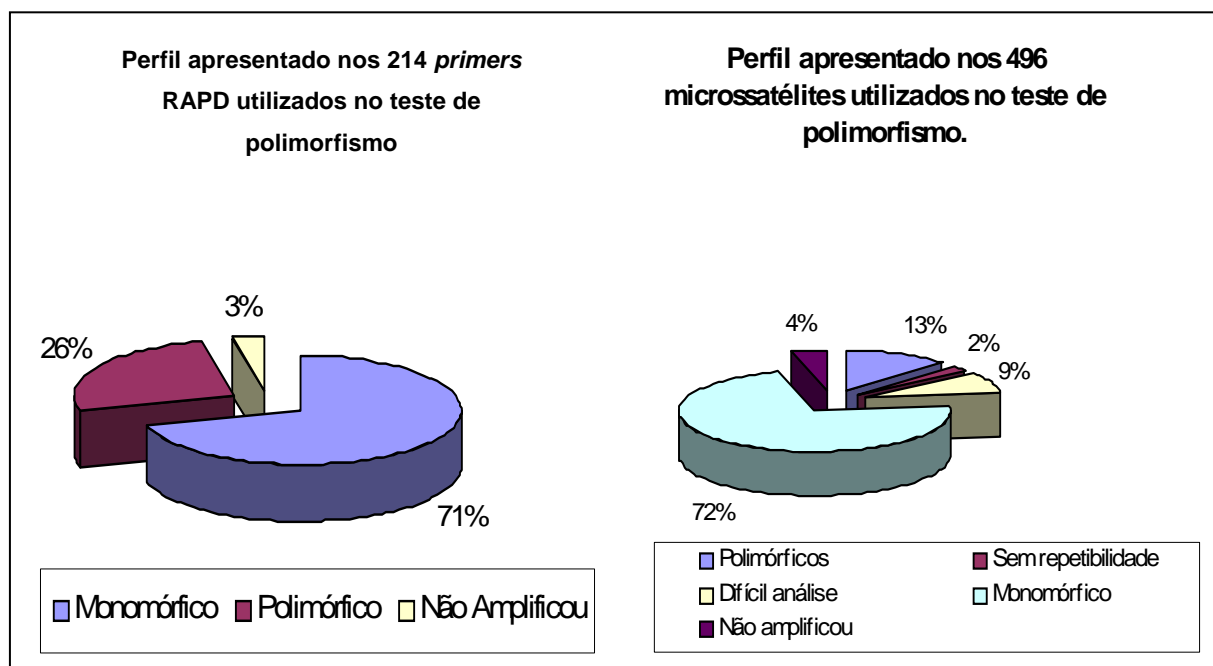


Figura 1 – Síntese dos resultados dos testes de polimorfismo utilizando marcadores microssatélites e RAPD.

Estas baixas taxas de polimorfismo demonstradas nestes resultados podem ser explicadas pelo estreitamento da base genética das plantas cultivadas e, no caso específico deste trabalho, pela origem dos genitores, pois tanto CNFC-7812 e CNFC-7229 pertencem ao mesmo *pool* gênico (Mesoamericano) e mesmo grupo (Carioca), além de possuírem em suas genealogias genótipos ancestrais comuns. Entretanto, além de serem contrastantes para o caráter a ser mapeado, as linhagens utilizadas neste trabalho já estão prontas para utilização em programas de melhoramento, tendo valores agrônômicos de interesse agregados.

4. CONCLUSÕES

Embora o número de locos polimórficos obtidos com os dois tipos de marcadores tenha sido pequena, esta quantidade permite que um primeiro esboço de um mapa genético em feijoeiro comum possa ser elaborado.

5. BIBLIOGRAFIA.

BLAIR, M.W. MUÑOZ, C. GARZA, R.; CARDONA, C. Molecular mapping of genes for resistance to the bean pod weevil (*Apion godmani* Wagner) in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, n.112: p.913–923. 2006.

BLAIR, M.W.; PEDRAZA, F.; BUENDÍA, H. F.; GAITÁN-SOLÍS, E.; BEEBE, S.E.; GEPTS, P.; TOHME, J. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical Applied Genetics**, n.107, p.1362–1374, 2003.

EMYGDIO; B.M.; ANTUNES; I. F.; NEDEL; J.L.; CHOER; E. Diversidade genética em cultivares locais e comerciais de feijão baseada em marcadores RAPD. **Pesquisa agropecuária brasileira**. Brasília, v. 38, n. 10, p. 1165-1171, 2003

FERREIRA; M. E.; GRATTAPAGLIA; D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: Embrapa, 1996. 220p.

FRANCO, M.C.; CASSINI, S.T.A.; OLIVEIRA, V.R.; TSAI, S.M.. Caracterização da diversidade genética em feijão por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa agropecuária brasileira**. Brasília, v. 36, n. 2, p. 381-385, 2001.

GAITÁN-SOLÍS, E.; DUQUE, M. C.; EDWARDS, K. J.; TOHME, J. Microsatellite Repeats in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, Characterization, and Cross-Species Amplification in *Phaseolus* ssp. **Crop Science**. 42:2128–2136. 2002.

GRISI, M. C. M. Mapeamento genético de locos microssatélites em feijoeiro comum na população Bat93 e Jalo EEP558. 2006. 111f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Genética e Melhoramento de plantas)- EAEA, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.

WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A., TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful s genetics markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p. 6531-6535, 1990.

YU, K.; PARK, S.J.; POYSA, V.; GEPTS, P. Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris*L.). **The Journal of Heredity**, v. 91, p. 429-434, 2000.

Fontes Financiadora: PRODETAB/EMBRAPA; CAPES.

^AMestrando em agronomia. EAEA/ UFG. Setor de Melhoramento Vegetal. teles_fl@yahoo.com.br

¹ Laboratório de Melhoramento de Plantas (EAEA/ UFG), Setor de Melhoramento Vegetal.

²Mestranda em Biologia Molecular e Celular - Laboratório de Melhoramento de Plantas (EAEA/ UFG), Setor de Melhoramento Vegetal. biolgf@yahoo.com.br

³MBRAPA – Arroz e Feijão, sac@cnpaf.embrapa.br

⁴EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia, sac@cenargem.embrapa.br

⁵Co-orientadora/ ICB-UFG. sibov@agro.ufg.br

⁶Orientador/ ICB-UFG, monalisa@icb.ufg.br