

BUSCA POR MARCAS MOLECULARES ASSOCIADAS AO GENE QUE CONFERE RESISTÊNCIA AO VÍRUS DO MOSAICO DOURADO NO FEIJOEIRO COMUM (*Phaseolus vulgaris L.*)

LECIANE KARITA OLIVEIRA^{1,2}, ROSANA PEREIRA VIANELLO BRONDANI¹, LEONARDO CUNHA MELO¹, CLAUDIO BRONDANI¹, MARIA JOSÉ DEL PELOSO¹

INTRODUÇÃO: O mosaico dourado do feijoeiro, causado pelo “Vírus do Mosaico Dourado do Feijoeiro” (VMDF), é uma doença que ocasiona severa redução da produção nas principais áreas de cultivo do feijoeiro no Brasil, podendo inviabilizar completamente a safra “da seca”. A prevenção da doença dá-se pela recomendação de época de plantio mais adequada para a safra da seca, evitando assim o pico populacional da mosca branca (vetor transmissor do vírus) e também, de forma menos efetiva, pelo controle, por meio de agrotóxicos, deste agente vetor. Ainda não existe consenso sobre o mecanismo de controle genético da resistência ao VMDF, pois tanto a herança mono como poligênica foram identificadas (Pessoni et al., 1997; Vellez et al., 1998). Para feijão, marcadores RAPD vêm sendo utilizados com sucesso na identificação de regiões genômicas associadas às características controladas por poucos genes, podendo ser posteriormente transformados em marcadores loco-específicos, facilitando a seleção indireta de genótipos resistentes (Urrea et al., 1996). O desenvolvimento de cultivares com tolerância ao VMDF poderá não somente aumentar a competitividade da cultura do feijoeiro, mas também viabilizar o cultivo em áreas hoje não recomendadas, devido a alta incidência da doença. Este trabalho objetivou o desenvolvimento de genótipos de feijoeiro com resistência ao VMDF baseado em retrocruzamento assistido por marcadores, e identificar, através da técnica de “Bulk Segregant Analysis” (BSA), marcadores moleculares ligados aos genes de resistência ao VMDF, visando o desenvolvimento de marcadores loco-específicos.

MATERIAL E MÉTODOS: Três populações segregantes RC1 foram geradas utilizando o mesmo genitor recorrente, ARC 100-4, e três genitores tolerantes ao patógeno: linhagens DOR 303, PHAS 8328 e G23554, todos pertencentes ao centro de origem Mesoamericano. As plantas com ausência de sintomas de VMDF, designadas como resistentes, foram selecionadas em casa de vegetação após infestação com indivíduos de mosca branca virulíferas. A segunda etapa de seleção envolveu a identificação dos indivíduos resistentes possuindo a maior parte de seu genoma oriundo do genitor recorrente, detectado por marcadores SSR. Um conjunto de 45 marcadores SSR, previamente desenvolvidos, caracterizados e disponibilizados na literatura para feijão, foram testados quanto às condições de amplificação e ao

¹ Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia, Brasil.

² Universidade Católica de Goiás, Goiânia, Brasil. lecianeoliveira@hotmail.com

polimorfismo entre os genitores dos três cruzamentos. A análise dos dados de frequência alélica foi feita utilizando o programa FSTAT e NTSys (Goudet, 1995; Rohlf, 1989). Para a identificação de marcas moleculares associadas ao gene de resistência ao VMDF, empregou-se a metodologia de BSA (Bulk Segregant Analysis, Michelmore et al., 1991), a qual se baseia em marcadores RAPD. *Bulks* contendo 20 indivíduos susceptíveis e 20 resistentes ao VMDF foram montados para cada um dos 3 cruzamentos. Quando foram observadas bandas RAPD exclusivas para os *bulks* resistentes ou susceptíveis, os indivíduos destes *bulks* foram analisados separadamente para o marcador RAPD que detectou esta diferença.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: Dos 45 SSRs testados, 20 foram selecionados por detectarem polimorfismo e amplificarem produtos de boa qualidade, fornecendo um padrão de bandas de fácil interpretação. A partir da matriz de similaridade genética gerada foram indicados, em uma ordem hierárquica, para cada uma das três populações, os genótipos resistentes ao VMDF e com a maior parte do genoma do parental cultivado. A utilização dos marcadores moleculares possibilitou identificar entre os genótipos resistentes, os que possuíam maior similaridade genética com o genitor recorrente, reduzindo com isto o número de retrocruzamentos. Para a busca de marcas moleculares ligadas ao gene da resistência ao VMDF, foram analisados 528 marcadores RAPD, para três cruzamentos (ARC 100-4 x DOR 303 e ARC 100-4 x PHAS 8328, ARC 100-4 x G 23554), utilizando *bulks* contendo 20 indivíduos susceptíveis e 20 resistentes, totalizando 3.168 reações de PCR. Foram identificadas 53 bandas RAPD diferenciadoras dos *bulks* para o cruzamento ARC 100-4 x DOR303, 73 para o cruzamento ARC 100-4 x PHAS 8328 e 48 para o cruzamento ARC 100-4 x G 23554. Para o cruzamento ARC 100-4 x DOR 303, todos os 53 marcadores RAPD que apresentaram bandas diferenciadoras foram analisados em cada indivíduo dos *bulks* resistentes e susceptíveis, e foram identificados 8 marcadores promissores e que estão sendo detalhadamente analisados nos 10 indivíduos resistentes e susceptíveis restantes do *bulk*. Marcadores RAPD previamente identificados (R2 e W12, Urrea et al., 1996) como associados ao gene de resistência ao VMDF foram relatados na literatura. Entretanto, no presente estudo estas marcas não apresentaram um padrão diferencial de amplificação entre os indivíduos resistentes e susceptíveis inviabilizando sua utilização para a seleção assistida. Isto indica a provável existência de diferentes locos gênicos envolvidos na resistência ao VMDF, quando analisados distintos genótipos resistentes. Esta diferença nos genes de resistência pode ser creditada a resposta destes genótipos aos diferentes tipos virais (VMDF que ocorre no Brasil e o Vírus do mosaico dourado amarelo do feijoeiro que ocorre na América Central). Existe a possibilidade de, ao identificarmos o marcador potencialmente associado ao gene de resistência pela análise de BSA, não estarmos acompanhando efetivamente a co-segregação do marcador ao gene de reação ao VMDF. Para termos certeza de que o marcador identificado esteja co-segregando ao loco de interesse, é fundamental realizar uma análise de ligação nas populações segregantes desenvolvidas.

CONCLUSÕES: De um modo prático, a integração entre as informações da resistência dos genótipos derivados do cruzamento para incorporação da resistência ao VMDF e a determinação destes genótipos mais geneticamente relacionados aos genitores recorrentes, possibilitaram concentrar esforços nos genótipos com maior potencial de resistência, além de reduzir o número de retrocruzamentos necessários para recuperar maior parte do genoma do genitor cultivado. Para o cruzamento Arc 100 x DOR 303 foram identificadas 8 marcas moleculares putativamente associadas à resistência ao VMDF. Entretanto, para os marcadores detectados como sendo ligados ao gene de resistência, será determinada a proximidade do loco marcador ao gene através da análise nas populações segregantes por mapas moleculares saturados baseados em marcadores SSR. Desta forma, pode-se obter informações mais precisas e detalhadas sobre a localização dos alelos que conferem a resistência ao VMDF. Pretende-se com este estudo fortalecer o uso rotineiro de ferramentas moleculares junto aos programas de melhoramento genético do feijoeiro, acelerar o processo de desenvolvimento de genótipos resistentes ao VMDF, ampliar o conhecimento sobre a resistência ao VMDF, e implementar a seleção assistida por marcadores na identificação de genótipos resistentes ao VMDF.

AGRADECIMENTO: Ao apoio financeiro do Projeto Universal/CNPq

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GOUDET, J. FSTAT: a computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, 86: 485-486, 1995.
- MICHELMORE, R.H; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregant populations (RAPD/RFLP). **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 9828-9832, 1991.
- PESSONI, L.A.; ZIMMERMANN, M.J.D.; FARIA, J.C. Genetic control of characters associated with bean golden mosaic geminivirus resistance in *Phaseolus vulgaris* L. **Brazilian Journal of Genetics** 20 (1): 51-58, 1997.
- ROHLF, F.J. NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. **Exeter Publisher**, New York, NY, 1989.
- URREA, C.A.; MIKLAS, P.N.; BEAVER, J.S.; RILEY, R.H. A codominant randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker useful for indirect selection of bean golden mosaic virus resistance in common bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 121 (6): 1035-1039, 1996.
- VELEZ, J.J.; BASSETT, M.J.; BEAVER, J.S.; MOLINA, A. Inheritance of resistance to bean golden mosaic virus in common bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 123 (4): 628-631, 1998.