

SELEÇÃO DE MARCADORES SSRs PARA O DESENVOLVIMENTO DE MAPA GENÉTICO PARA FEIJÃO VISANDO A IDENTIFICAÇÃO DE QTLs

ROBERTHA AUGUSTA VASCONCELOS GARCIA^{1,3}, ROSANA PEREIRA
VIANELLO BRONDANI¹, CLAUDIO BRONDANI¹, LEONARDO MELO¹,
GLÁUCIA S. C. BUSO², PRISCILA BASSINELLO¹, MONALISA SAMPAIO
CARNEIRO³, SÉRGIO TADEU SIBOV⁴, MARIA JOSÉ DEL PELOSO¹.

INTRODUÇÃO: O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura de grande importância econômica e social no Brasil, pois representa a fonte de proteína vegetal mais significativa para a alimentação. O feijão é extremamente diversificado em termos de cultivo, utilização, variabilidade morfológica, representando um forte impacto na cadeia produtiva e na distribuição de renda do País. A seleção para produtividade e outras características agrônomicas de interesse, incluindo resistência a fatores bióticos e abióticos, arquitetura da planta, hábito de crescimento, qualidade nutricional e tempo de cocção, é uma prática utilizada pelos melhoristas com intuito de desenvolver cultivares com um desempenho superior. O melhoramento para redução do tempo de cocção visa obter cultivares com grãos que permitem o cozimento mais rápido, adequando o consumo ao ritmo de vida de grande parte da população brasileira. A construção de detalhados mapas genéticos por meio de marcadores moleculares, incluindo os microssatélites (SSRs), tem gerado uma vasta quantidade de informações úteis para identificação de locos relacionados a características de interesse, que em última análise, complementam informações genéticas que visam a obtenção de genótipos superiores. Deste modo, pode-se avaliar a composição genotípica de populações inteiras, seguir segmentos cromossômicos ou marcadores individuais relacionados a características de interesse, durante todo o desenvolvimento de uma cultivar. Este estudo tem como objetivo selecionar um conjunto de marcadores SSR para a construção de um mapa genético para feijão baseado em marcadores SSRs, o qual será utilizado para a análise de QTLs (Quantitative Trait Loci) para a característica tempo de cocção em feijão.

MATERIAL E MÉTODOS: O material vegetal utilizado para a seleção dos locos foram os genitores da população que será mapeada para a característica tempo de cocção: Laranja (parental doador), que possui tempo de cocção reduzido, e CNFM 7875, bem adaptado às condições de cultivo e com qualidade agrônômica

¹ Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, Brasil. roberthagarcia@yahoo.com.br

² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brasil.

³ Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil.

⁴ Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, Brasil.

desejável, além de possuir cor, tamanho e formato de grão comercial. O DNA genômico foi extraído pelo método do CTAB proposto por Doyle e Doyle (1987). A concentração do DNA foi estimada por eletroforese em gel de agarose 1% por comparação visual com o DNA-padrão do fago λ . A concentração de DNA foi estimada a partir da comparação visual das bandas, reveladas pela coloração com brometo de étidio a 0,5 μ g/mL, sendo que a concentração de cada amostra de DNA foi ajustada para 3 ng/ μ l. Um conjunto de 288 marcadores SSR, sendo 109 previamente desenvolvidos, caracterizados e disponibilizados na literatura para feijão (Yu et al., 2000; Gaitán-Solís et al., 2002; Blair, et al., 2003) e 179, desenvolvidos na Embrapa Recursos e Biotecnologia (dados não publicados), foram testados quanto às condições de amplificação e polimorfismo entre os genitores. Dos 288 marcadores, 242 foram desenvolvidos a partir de bibliotecas genômicas (242 locos), e 46 obtidos no GenBank. Inicialmente, os marcadores foram testados à temperatura de 56°C. Os marcadores que não amplificaram foram submetidos a condições de amplificação de menor estringência, ou seja, sofreram redução em sua temperatura de anelamento (48°C, 50°C, 52°C). Para os SSRs com padrão de amplificação com múltiplas bandas, aumentou-se a temperatura de anelamento, visando aumentar a especificidade do produto amplificado (58°C e 60°C). As reações de amplificação foram conduzidas em um volume final de 15 μ l, em termociclador PTC-100 (MJ Research) e os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em géis de poliacrilamida 6%, corados com nitrato de prata. Para os locos SSRs identificados como polimórficos entre os genitores, ajustou-se as condições para a eletroforese simultânea de dois locos SSRs considerando-se o tamanho dos fragmentos amplificados e a intensidade, na etapa de coloração, do produto amplificado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: Dos 288 marcadores testados, após a otimização das condições da PCR, 250 (77%) amplificaram produtos de boa qualidade fornecendo um padrão de bandas de fácil interpretação, e apenas 38 (13%) produziram amplificação inespecífica ou nenhuma amplificação. Dos 250 SSRs com padrão de amplificação satisfatório, 63 (25,20%) apresentaram polimorfismo entre os genitores. Dados similares foram obtidos por Frei et al. (2005), onde dos 108 marcadores SSRs, 30,56% foram polimórficos e apenas 4,63% não amplificaram. Dos locos polimórficos 84,1% foram provenientes de bibliotecas genômicas e 15,9% de seqüências do GenBank. A maior capacidade de SSRs derivados de bibliotecas genômicas em detectar polimorfismo entre os parentais, em relação aos oriundos do GenBank, deve-se ao fato de que estes últimos são em sua maioria obtidos a partir de seqüências genômicas expressas, e consequentemente mais conservadas. Um maior aproveitamento quanto ao nível de polimorfismo em populações de mapeamento foi relatado por Yu et al. (2000) onde, dos 37 locos SSRs provenientes de GenBank analisados em genótipos de feijão, 43,24% foram polimórficos e apenas 13,51% não amplificaram. O baixo polimorfismo encontrado entre os locos avaliados pode estar relacionado à estreita base genética da cultura, pois os genitores do cruzamento avaliado são linhagens

elite do mesmo centro de domesticação (Mesoamericano), o que justificaria a reduzida variabilidade alélica encontrada. Atualmente existe uma preocupação em aumentar a variabilidade genética do feijão, através da introdução de genótipos de base genética ampla como genitores dos programas de melhoramento e pré-melhoramento da Embrapa.

CONCLUSÕES: Marcadores SSR derivados de bibliotecas genômicas foram mais polimórficos do que os SSR obtidos a partir de sequências do GenBank. Em função do reduzido nível de polimorfismo identificado entre os SSR para os genitores da população de mapeamento utilizada, um número adicional de SSRs derivados de novas bibliotecas genômicas está sendo desenvolvido. Os marcadores SSR identificados como polimórficos entre os genitores estão sendo genotipados em uma população composta por 94 indivíduos F₂, e os dados de segregação serão utilizados para a construção do mapa de ligação e análise de QTLs. A expectativa é que ao final deste estudo sejam identificados marcadores SSR associados à característica tempo de cocção em feijão, e obtidas linhagens com tempo de cocção reduzido, visando o lançamento de cultivares comerciais com maior valor agregado.

AGRADECIMENTOS: Apoio financeiro do PRODETAB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- BUSO, G.S.C.; AMARAL, Z.P.; BRONDANI, R.P.V.; REIS, A.M.M.; MORETZSOHN, M.C. & FERREIRA, M. E. **In: Anais do Simpósio de Recursos Genéticos da América Latina e Caribe (Sirgealc)**. Embrapa, Brasília, 1999.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- FREI, A.; BLAIR, M.W.; CARDONA, C.; BEEBE, S.E.; GU, H.; DORN, S. QTL Mapping of resistance to *Thrips palmi* Karny in common bean. **Crop Science**, n.45, p.379-387, 2005.
- 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**, v. 42, p. 1228-1236, 2002.
- LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BAARLOW, A.; DALY, M.J.; LINCOLN, S.E. et al. Mapmaker: an interactive computer package for constructing

primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, v. 1, p.174-181, 1987.

NELSON, J.C. Q Gene: software for marker-based genomic analysis and breeding. **Molecular Breeding**, v.3, p.239-245, 1997.

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.