

MAPA GENÉTICO UTILIZANDO POPULAÇÕES DE MELHORAMENTO DO FEIJOEIRO COMUM

Luciana Gomes Ferreira¹, Fábio Luis Teles², Gláucia Salle Cortopassi Buso³, Rosana Perreira Vianello Brondani⁴, Cláudio Brondani⁴, Leonardo Cunha Melo⁴, Maria José Del Peloso⁴, Priscila Zaczuk Bassinello⁴, Sérgio Tadeu Sibov⁵, Monalisa Sampaio Carneiro⁶.

Introdução

O feijoeiro comum é uma leguminosa autógama, diplóide (n=11) com cromossomos e genoma relativamente pequenos, contendo 0,66 picogramas de DNA por genoma haplóide, o que equivale a $6,33 \times 10^8$ pares de nucleotídeos [1]. É a principal leguminosa utilizada na alimentação humana, apresenta grande importância econômica e social, sendo um elemento importante como fonte proteica na dieta de enorme parcela da população mundial, em especial nos países onde o consumo de proteína animal é limitado, por razões econômicas, religiosas e culturais [2]. O melhoramento clássico tem sido responsável pelo aumento do potencial produtivo das cultivares de feijão, através de programas para aumento da tolerância à seca e resistência a doenças e pragas. Mas para atender as necessidades de aumento da qualidade nutricional do feijão, as técnicas de melhoramento genético devem ser aprimoradas. Uma alternativa possível é a utilização de ferramentas moleculares que possibilitem a identificação das regiões genômicas que controlam estas características e fornecem a melhor estimativa da diversidade genética, pois são independentes de efeitos ambientais.

O mapeamento genético possibilita a cobertura e análise completa de genomas, a decomposição de características genéticas complexas nos seus componentes mendelianos, a localização de regiões genômicas que controlam caracteres de importância econômica, a quantificação do efeito dessas regiões na característica estudada e a canalização de toda essa informação para uso em programas de melhoramento [3].

Neste trabalho, o objetivo foi o desenvolvimento de um mapa de ligação, através da utilização de marcadores microssatélites e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), para a uma população de melhoramento genético de feijoeiro comum de tipo de

grão carioca. A construção deste mapa contribuirá para o melhoramento genético do feijoeiro comum, incorporando as informações resultantes da análise genômica na identificação de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) para qualidade de grão em feijão.

Material e métodos

A população de mapeamento foi obtida a partir do cruzamento entre as linhagens CNFC (Centro Nacional de Feijão Carioca) 7812 e 8056 pertencentes ao programa de melhoramento genético da Embrapa Arroz e Feijão. Ambas linhagens pertencem ao centro de origem Mesoamericano, tipo de grão carioca, possuem grãos com padrão comercial, alta produtividade, arquitetura de plantas semi-prostrada e reação intermediária as principais doenças que acometem o feijoeiro comum. Os genitores CNFC 7812 e 8056 foram contrastantes para o teor de proteína, com respectivamente 24 e 19%. A partir da população de mapeamento composta de 94 indivíduos da F₂ foi extraído o DNA genômico utilizando o método CTAB proposto por [4].

Com a intenção de selecionar marcadores informativos, foram avaliados 498 *primers* microssatélites e 269 RAPD, que foram utilizados na triagem dos dois genitores e quatro indivíduos da população de mapeamento. As reações de amplificação dos microssatélites e dos RAPDs foram realizadas conforme [5]. Para os marcadores microssatélites, os produtos resultantes da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poli(acrilamida) [acrilamida/bisacrilamida (19:1) 6 %, uréia 7,5 M, tampão 1X TEB] de 0,5 mm de espessura. A visualização das bandas foi efetuada em solução de nitrato de prata conforme descrito por [6]. Nos marcadores RAPD, os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese (3V/cm em géis de agarose 1,2%, e EDTA 2mM), corados com brometo de etídeo (0,5µg/ml).

Com base no conjunto de marcadores microssatélites e RAPD polimórficos utilizados na genotipagem da população F₂ foi construída uma matriz de dados constituída do nome de cada marcador e dos dados de

1.Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, CEP 74001-970. E-mail: biolgf@yahoo.com.br

2.Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, CEP 74001-970. E-mail: teles.fl@gmail.com

3.Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, CEP 70770 – 900. E-mail: buso@cenargen.embrapa.br

4.Pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia, GO, CEP 75375 – 000. E-mail: sac@cnpaf.embrapa.br

5.Professor Adjunto do Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, CEP 74001-970. E-mail: stsibov@yahoo.com.br

6.Professor Adjunto do Departamento de Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de São Carlos, Araras, SP, CEP 13600 – 970. E-mail:

segregação apresentados pelo marcador nos genitores e na população de mapeamento. Para a verificação da ocorrência de distorção de segregação, os locos foram submetidos ao teste de aderência de “qui-quadrado” (χ^2). Para estabelecer o ponto de corte considerando o nível de significância conjunto do teste (α^*) foi usado o critério da ‘razão de falsas descobertas’ (FDR - *false discovery rate*) proposto por [7].

As análises de ligação e determinação da ordem dos marcadores foram feitas com o auxílio do programa Joinmap versão 3.0® [8]. O mapeamento foi realizado utilizando o procedimento F_2 , que é recomendado pelo programa para a construção de mapas de ligação a partir de uma população F_2 resultante da autofecundação de plantas da geração F_1 originadas do cruzamento entre dois genitores inteiramente homocigotos. Os grupos de ligação foram estabelecidos com LOD *score* mínimo de 3,00 utilizando o comando *LOD grouping*. A ordem dos marcadores nos grupos de ligação foi estabelecida em duas etapas: a) primeiramente, adotou-se como critério uma frequência máxima de recombinação de 0,30 e um LOD *score* mínimo de 2,00, e valores de *jump* = 5,00 e *ripple* = 3,00. De acordo com esses critérios foi criado o mapa *framework*, que foi indicado por meio do comando *fixed order*, e b) na segunda etapa, foram alocados novos marcadores ao *framework* utilizando critérios de frequência de recombinação e LOD *score* menos rigorosos que na primeira etapa, mas sendo mantidos os valores atribuídos para *jump* e *ripple* da etapa anterior. As frações de recombinação foram convertidas em valores de distância de mapa pela função Kosambi [9]. O desenho da versão final do mapa de ligação foi gerada com auxílio do programa MapChart [10].

Resultados

Na seleção de *primers* SSR foram testados 498 microssatélites, após as otimizações das condições da PCR, 17 (3,4%) não amplificaram e 41 (8,2%) resultaram em um padrão de múltiplas bandas, inviabilizando o seu uso para análise. Ao final dos ajustes das condições de amplificação foram identificados 440 (88,3%) *primers* microssatélites que amplificaram produtos de boa qualidade e fácil interpretação. Destes, 56 (12,7%) foram polimórficos entre os genitores, e 384 (87,3%) monomórficos. Dos 56 *primers* polimórficos, 46 (13,7%) locos polimórficos que foram obtidos a partir de bibliotecas genômicas e, 10 (11,1%) de bibliotecas gênicas. Somente, 51 pares de *primers* polimórficos foram genotipados na população de mapeamento. Cerca de 3,9% (16) dos microssatélites genômicos e 1,1% (1) dos gênicos não amplificaram qualquer fragmento. O aparecimento de um padrão de múltiplas bandas foi verificado em 9,0% (37) dos SSRs genômicos e 4,4% (4) dos microssatélites gênicos. Não foram observadas diferenças na intensidade das bandas nos padrões de microssatélites genômicos e gênicos. Dos 259 *primers* RAPD analisados, 239 (92,3%) revelaram um perfil de

bandas nítidas e reproduzíveis, e 20 (7,7%) não amplificaram qualquer fragmento. Para os *primers* que amplificaram fragmentos, 18,4% (44 *primers*) revelaram pelo menos um loco polimórfico e 81,6% (195) foram monomórficos.

As análises de qui-quadrado revelaram que para 15 (14,8%) dos marcadores foi rejeitada a hipótese de nulidade ($P < 0,05$), adotando-se o critério de FDR. Todos os 15 marcadores que apresentaram desvios na segregação mendeliana foram mantidos nas análises de ligação. As análises de ligação foram realizadas utilizando-se 101 marcadores polimórficos (41 marcadores microssatélites e 60 RAPD). Trinta e dois marcadores (31,7%) não foram atribuídos a nenhum dos grupos de ligação (marcadores não ligados), sendo 25 marcadores RAPD e 7 microssatélites.

Um total de 69 locos (68,3%) foram mapeados e distribuídos ao longo de dezessete grupos de ligação. Os tamanhos dos grupos de ligação variaram de 6,7 (grupo 16 e 17) a 139,0 cM (grupo 1), apresentando uma média de $49,4 \pm 36,8$ cM. O número de marcadores mapeados nos grupos de ligação variou de 2 (grupo 15, 16 e 17) a 11 (grupo 1). A distância média entre dois marcadores foi de 16,4 cM. Aproximadamente 25% dos intervalos nos grupos de ligação foi superior a 25 cM, sendo 42,3 a maior distância e 0,3 cM a menor distância encontrada. O comprimento total do mapa foi de 840,7 cM. A distribuição dos marcadores RAPD e microssatélites não foi uniforme nos grupos de ligação. Aproximadamente 46,4% das marcas concentram-se nos grupos de ligação 1, 2, 3 e 4, que juntos correspondem a 49,2% do comprimento total do mapa. O grupo de ligação 1 apresentou o maior número de marcadores (11), bem distribuídos, tendo uma distância média de 13,9 cM e, com a formação de um agrupamento, com uma distância de 0,3 cM.

Discussão

No presente estudo, a distância total do mapa foi estimada em 840,7 cM, aproximadamente 68,6% do valor de 1226 cM do mapa consenso estabelecido por [11], e semelhante ao valor de 869,5 cM obtido por [12], que utilizaram 84 marcadores (80 microssatélites, um SCAR, dois morfológicos e uma proteína – faseolina). Inicialmente, o mapa genético desenvolvido no presente trabalho fundamentava-se na análise de marcadores microssatélites para construção dos grupos de ligação. Entretanto, em função do baixo polimorfismo detectado por estes marcadores entre os genitores, optou-se pela diversificação das classes de marcadores utilizando os RAPD. Considerando-se que quase a totalidade dos marcadores SSRs utilizados no presente trabalho foram oriundas de bibliotecas genômicas enriquecidas é possível que alguns *primers* estejam amostrando a mesma região do genoma, desfavorecendo a representatividade de outras regiões genômicas, promovendo uma redundância da informação genética. Adicionalmente, os marcadores RAPD permitiram explorar outras regiões genômicas possivelmente distintas daquelas vasculhadas pelos marcadores microssatélites, propiciando uma cobertura mais ampla dos possíveis pontos de polimorfismos presentes nos genitores. A taxa de *primers* RAPD polimórficos (16,9%, 44/259) identificados foi

aproximadamente o dobro da encontrada nos marcadores SSRs (8,23%, 41/498). No presente estudo, os locos RAPD foram úteis para ampliação do número de pontos no mapa genético. Entretanto, tais marcadores detectam o polimorfismo genético de maneira binária, ou seja, são dominantes, o que dificulta a utilização deste conjunto de marcas em estudos de homologia e integração com mapas genéticos previamente publicados de feijoeiro.

A construção de mapas genéticos fundamenta-se em maior polimorfismo entre genitores para elaboração de mapas saturados. Os genitores escolhidos para o mapeamento devem ser contrastantes, já que o número de marcas no mapa representa o número de pontos contrastantes encontrados nos genitores [13]. Entretanto, do ponto de vista de um programa de melhoramento genético a escolha de genitores muito divergentes pode acarretar a obtenção de linhagens descendentes de baixo ou nenhum valor agrônomico e comercial. Nos programas de melhoramento genético, a obtenção dos cultivares modernos de feijoeiro prioriza os cruzamentos entre genótipos elites, principalmente entre materiais do mesmo centro de origem (Mesoamericano x Mesoamericano ou Andino x Andino). Já cruzamentos resultantes de conjunto gênico distintos podem trazer ligações gênicas indesejáveis aumentando a probabilidade de ocorrência de alelos desfavoráveis, o que elevaria o tempo necessário de obtenção dos cultivares. De um modo geral, os principais mapas internacionais de feijoeiro comum foram construídos a partir de genótipos pertencentes a centros de origens distintos (Mesoamericano x Andino) [14, 15,16,17], em que a eficiência na obtenção de linhagens comerciais, mesmo quando orientadas pela seleção assistida pelos marcadores moleculares, é baixa e demorada. Entretanto, tais mapas revelam altos níveis de polimorfismo permitindo uma ampla saturação dos mesmos.

Considerando que genitores CNFC 7812 e CNFC 8056 apresentam divergência para o teor de proteína, a aplicação imediata do mapa genético construído neste trabalho consiste na busca de ligação de locos marcadores (RAPD e SSRs) com regiões controladoras de caracteres quantitativos (QTL). O mapeamento com precisão destes QTLs, bem como a quantificação fenotípica dos teores de proteína no grão, poderão gerar informações rápidas e auxiliar o desenvolvimento de linhagens comerciais de feijoeiro mais ricas em proteína, o que elevaria ainda mais a qualidade nutricional deste alimento.

O presente trabalho mostrou que foi possível construir mapas genéticos consistentes a partir de populações de feijoeiro comum oriundas de genitores do mesmo centro de origem e do mesmo de tipo de grão. Tal resultado permite a utilização imediata do presente mapa de ligação nos programas de melhoramento genético de feijoeiro comum

Referências

- [1] ARUMUGANATHAM, K., EARLE, E.D. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.9, p. 208-218.
- [2] ANTUNES, P. L.; BILHALVA, A. B.; ELIAS, M.C.; SOARES, G.J.D. 1995. Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivares Rico 23, Carioca, Pirata-1 e Rosinha-G2. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.1, n. 1.
- [3] LEE, M. 1995. DNA markers and plant breeding programs. *Adv. Agron.*, v.55, p.263-344.
- [4] HOISINGTON, D., KHAIRALLAH, M., GONZÁLEZ-DE-LÉON, D. 1994. *Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*. 2 ed. México. D. F: CIMMYT.
- [5] FERREIRA, L. G. 2006. Mapa genético utilizando população de melhoramento do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) baseado em marcadores microssatélites e RAPD. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Biologia, UFG, Goiânia, 107p.
- [6] CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. 2001. Detection of simple sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, Athens, n.4, v.19, p.1-8.
- [7] BENJAMIN, Y.; HOCHEBERG, Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of Royal Statistics Society. Series B*, v. 57 (1), p. 589-300.
- [8] VAN OOIJEN, J. W.; VOORRIPS, R. E. 2001. JoinMap® version 3.0: Software for the calculation of genetic linkage maps. *Plant Research International*, Wageningen, the Netherlands.
- [9] KOSAMBI, D. D. 1944. The estimation of map distance from recombination values. *Annuaire of Eugenetics*, v. 12, p. 172-175.
- [10] VOORRIPS, R. E. 2002. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal Hered.*, v. 93:77-78.
- [11] FREYRE, R. et al. 1998. Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. *Theor. Appl. Genet.* n.97, p.847-856.
- [12] BLAIR, M. W.; GIRALDO, M. C.; BUENDÍA, H. F. 2006. Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet.* v. 113:100-109.
- [13] CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. 2002. Mapas genéticos em plantas. *Bragantia*, Campinas, v.61, n. 2, p. 89-100.
- [14] NODARI, R. O.; TSAI, S. M.; GILBERTSON, R. L.; GEPTS, P. 1993. Towards an integrated linkage map of common bean. II. Development of an RFLP-based linkage map. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v. 85, p. 513-520.
- [15] VALLEJOS, C. E.; SAKIYAMA, N. S.; CHASE, C. D. 1992. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. *Genetics*, v. 131, p. 733-740.
- [16] BLAIR et al. 2003. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet.*, v.107, p.1362-1374.
- [17] GRISI, M. C. M. 2006. Mapeamento genético de locos microssatélites em feijoeiro comum na população Bat93 e Jalo EEP558. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Agronomia, UFG, Goiânia, 111p.

