

# Mapa genético baseado em marcadores microssatélites e RAPD utilizando populações de melhoramento contrastante para teor de fibra no feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.)

Fábio Luis Teles<sup>1</sup>, Luciana Gomes Ferreira<sup>1</sup>, Giselle dos Santos Davi<sup>1</sup>, César Rafael Silveira<sup>1</sup>, Agenor Santos Júnior<sup>1</sup>, Geovane Silvano<sup>1</sup>, Carolina Nóbrega<sup>1</sup>, Gláucia Salle Cortopassi Buso<sup>2</sup>, Rosana Perreira Vianello Brondani<sup>3</sup>, Cláudio Brondani<sup>3</sup>, Leonardo Cunha Melo<sup>3</sup>, Maria José Del Peloso<sup>3</sup>, Priscila Zaczuk Bassinello<sup>3</sup>, Sérgio Tadeu Sibov<sup>4</sup>, Monalisa Sampaio Carneiro<sup>5</sup>.

## Introdução

Incontestável fonte protéica, obtendo a denominação de “carne da população de baixa renda”, o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L) é a leguminosa mais consumida no Brasil formando a base da nossa alimentação diária. Estima-se que o feijão faz parte da dieta de mais de 300 milhões de pessoas no mundo todo e, além da proteína, fornece 25 a 30% dos níveis recomendados de ferro, 25% de magnésio e cobre, e 15% de potássio e zinco [1]. Outra questão nutricional que vem ganhando atenção, no que se diz a respeito de qualidade nutricional e saúde, é a fibra alimentar presente no feijão. As fibras presentes nos alimentos são componentes importantes da dieta humana, pois exercem efeitos benéficos na saúde, auxiliando na prevenção de doenças do sistema digestivo e do coração, de câncer de cólon e de mama, contribuindo também para a redução do colesterol e no controle glicêmico. Em estudos avaliando a dieta do brasileiro, constataram que a principal fonte de fibra alimentar advém da ingestão de feijão.

O objetivo deste trabalho foi à construção de um mapa genético do feijoeiro comum, utilizando populações de melhoramento contrastante para o teor de fibra com base em marcadores microssatélites e RAPD.

## Material e métodos

### Material vegetal

Foram selecionadas duas linhagens elites CNFC 7812 e CNFC 7829 com 12,7% e 17% de teor de fibras, respectivamente, obtendo-se uma população F<sub>2</sub> de 94 indivíduos. Essas linhagens pertencem ao programa de melhoramento da Embrapa Arroz e Feijão. A linhagem

CNFC 7812 foi originada a partir do cruzamento BZ 3836-1// FEB 166 / AN 910523, o mesmo cruzamento que originou a cultivar lançada BRS-Pontal pela Embrapa [2], e a linhagem CNFC 7829 foi proveniente do cruzamento BZ 3836-1 //AN 910518 / CB 734579. Essas linhagens pertencem ao programa de melhoramento da Embrapa Arroz e Feijão que visa resistência a doenças, principalmente antracnose e crestamento.

### Isolamento, quantificação e seleção de marcadores

A genômico isolado utilizando o método CTAB proposto por [3]. A quantificação foi realizada após eletroforese em gel de agarose (1%) de alíquotas de cada amostra, comparando-as com uma série de concentrações conhecidas do DNA (10, 20, 50 e 100 ng) do fago  $\lambda$ . A concentração de DNA foi estimada a partir da comparação visual da intensidade das bandas, revelada pela coloração com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) sob luz ultravioleta. A avaliação inicial do nível de polimorfismo, objetivando a seleção dos *primers* microssatélites e RAPD, foi realizada utilizando-se os dois genitores (CNFC 7812 e 7829) e quatro indivíduos da população de mapeamento. Foram utilizados uma bateria 712 marcadores, sendo 498 microssatélites e 214 RAPD.

### Construção do mapa genético

Para os microssatélites foram utilizados seguintes códigos padrões: letra “A” para indicar um indivíduo homocigoto para o alelo “a” neste loco (P<sub>1</sub>/CNFC 7812); a letra “B” para indicar um indivíduo homocigoto para o alelo “b” (P<sub>2</sub>/CNFC 7829), e a letra “H” indicando um indivíduo heterocigoto contendo ambos os alelos “a” e “b” (F<sub>1</sub>). De acordo com o comportamento dos genitores nos locos RAPD selecionados foram utilizadas duas codificações. Para locos

1. Discentes da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, CEP 74001-970. E-mail: teles.fl@gmail.com

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

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

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

5. Professor Adjunto do Departamento de Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de São Carlos, Araras, SP, CEP 13600 – 970. E-mail: monalisa@cca.ufscar.br

RAPD em que o genitor CNFC 7812 apresentou ausência de banda foi denominado A para a ausência e C para a presença da banda, denotando assim a letra C para a informação de “não A”. Nos locos RAPD em que a ausência de banda foi para o genitor CNFC 7829, esta ausência foi codificada com a letra B e a presença de banda nestes locos pela letra D, denotando agora “não B”.

As análises de ligação e determinação da ordem dos marcadores foram feitas com o auxílio do programa Joinmap versão 3.0® [4]. 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 primeira, 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, criando o mapa *framework*, que foi indicando por meio do comando *fixed order*, e a segunda etapa, foram alocados novos marcadores utilizando critérios 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. O desenho da versão final do mapa de ligação foi gerada com auxílio do programa MapChart [5].

## Resultados e Discussão

Foram obtidos 104 locos polimórficos para a construção do mapa genético. Foram analisados 214 *primers* RAPD sendo que 207 (96,7 %) revelaram um perfil de bandas nítidas e reproduzíveis, e 7 (3,3%) não amplificaram qualquer fragmento. Dos *primers* que amplificaram fragmentos, 27% (56 *primers*) revelaram pelo menos um loco polimórfico e 73% (151) foram monomórficos. Foram testados 498 locos microssatélites, sendo que 408 (82%) originaram-se biblioteca genômica e 90 (18%) de biblioteca gênica. Do total de microssatélites analisando, 423 (85%) amplificaram produtos de boa qualidade fornecendo um padrão de bandas de fácil interpretação, e 75 (15%) produziram amplificação inespecífica ou nenhuma amplificação. Dos 423 microssatélites que apresentaram produtos de amplificação definidos, 65 (15%) foram polimórficos e 358 (85%) monomórficos. A maioria dos mapas construídos em feijoeiro comum utilizou populações segregantes oriundas de genitores de centro de origem diferentes (Andino x Mesoamericano) [6], [7], [8], [9], [10], [11], [12] ou a utilização de linhagens selvagens cruzadas com linhagens modernas [13], [14] para como estratégia para elevar o polimorfismo. Este trabalho optou por utilizar como genitores linhagens elites, oriundas de populações de melhoramento, que já possui agregada na sua constituição genética características de interesse econômico, como resistência a doenças, tipo de grão carioca e etc. Ferreira, (2006) [15] utilizando, também

populações de melhoramento, entretanto sem grau de parentesco entre os genitores obteve índice semelhante ao encontrado neste trabalho (41 microssatélites polimórficos em 498 testado – 8,2%).

Dos marcadores selecionados, 26 (25%) apresentaram distorção dos padrões de segregação esperados. Foi possível construir 11 grupos de ligação, com 50 locos mapeados, e tendo uma cobertura do genoma de 646,3cM (Tabela 01). Como o tamanho do genoma do feijoeiro foi estimado em torno de 1200 cM [16], estima-se que a cobertura genômica deste trabalho foi de 53,8% do genoma do feijoeiro. O tamanho dos grupos variou de 16,3 cM (grupo 11) a 115,5cM (grupo 1). O número de marcas ligadas variou de 8 (grupo 01) a 2 (grupos 9, 10 e 11). Foi possível construção de um mapa genético, baseando-se em uma população de melhoramento, oriunda de genitores aparentados. Entretanto este mapa necessita de uma maior saturação.

## Referências

- [1] CIAT in focus (2001) Common bean: the nearly perfect food. p 1-10, 2002.
- [2] Del Peloso, M. J et al. 2003. BRS Pontal: Nova Cultivar de Feijoeiro Comum de Tipo de Grão Carioca com Alto Potencial Produtivo. Comunicado Técnico 64. Centro Nacional de Pesquisa Arroz e Feijão. Santo Antônio de Goiás, GO.
- [3] HOISINGTON, D., KHAIRALLAH, M., GONZÁLEZ-DE-LÉON, D. 1994. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. 2 ed. México. D. F: CIMMYT.
- [4] 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.
- [5] VOORRIPS RE. 2002. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. J Hered, v. 93:77-78.
- [6] GEPTS, P. 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.
- [7] NODARI, 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.
- [8] 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.
- [9] YU, K.; PARK, S. J.; POYSA, V.; GEPTS, P. 2000. Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris*). Journal of Heredity, v. 91, p. 429-434.
- [10] MC CLEAN, LEE, R. K.; OTTO, C.; GEPTS, P.; BASSETT, M. J. 2002. Molecular and phenotypic mapping of genes controlling seed coat pattern and color in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). The Journal of Heredity, Washington, v.93, n.2. p148-152.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.

- [14]GUZMAN-MALDONATO, S. H.; MARTINEZ, O.; ACOSTA-GALLEGOS, J. A.; GUEVARA-LAR, F.; PAREDES-LOPEZ, O. 2003. Putative quantitative trait loci for physical and chemical components of common bean. *Crop Science*, n. 43, p.1029-1035.
- [15] 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.
- [16]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.

**Tabela 1.** Número de marcadores microssatélites e RAPD, comprimento em centimorgans (cM), distância máxima e mínima (cM) dos onze grupos de ligação gerados no mapa genético de *Phaseolus vulgaris* L, obtido a partir da população F<sub>2</sub> oriunda do cruzamento entre as linhagens CNFC 7812 e 7829.

<b>Grupos de ligação</b>	<b>Comprimento (cM)</b>	<b>Número de marcadores ligados (SSR/RAPD)</b>	<b>Distância máxima (cM)</b>	<b>Distância mínima (cM)</b>
1	115,5	8 (5/3)	41,9	3,2
2	89,9	6 (0/6)	19,3	8,9
3	85,5	5(5/0)	34,8	13,1
4	69,9	5 (2/3)	26,0	1,0
5	65,8	5 (2/3)	32,8	3,5
6	57,9	3 (0/3)	31,1	26,8
7	51,9	3 (3/0)	44,1	7,8
8	38,4	4 (0/4)	19,4	1,4
9	28,8	2 (0/2)	-	28,8
10	26,7	2 (0/2)	-	26,7
11	16,3	2 (0/2)	-	16