

# MARCADORES MOLECULARES FUNCIONAIS ASSOCIADOS COM RESISTÊNCIA A MURCHA DE FUSÁRIO EM FEIJOEIRO COMUM

Thiago Willian Almeida Balsalobre<sup>1</sup>, Danilo Elton Evangelista<sup>1</sup>, Larissa Prado da Cruz<sup>1</sup>, Luis Guilherme Virgílio Fernandes<sup>1</sup>, Fernanda Zatti Barreto<sup>1</sup>, Joaquim Geraldo Cáprio da Costa<sup>2</sup> e Monalisa Sampaio Carneiro<sup>3</sup>

## Resumo

Este trabalho objetivou selecionar marcadores microssatélites polimórficos em populações segregantes derivadas dos cruzamentos entre cultivares resistentes (Milionário 1732 ou FT Tarumã) e susceptível (Macanudo) à murcha do fusário. Adicionalmente, foi realizada análise *in silico* da função protéica dos marcadores funcionais com relação a resposta de defesa do feijoeiro comum sob ataque de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Para cada cruzamento 120 indivíduos foram fenotipados para resistência à doença, e com base nestes resultados construídos os *bulks* resistente e susceptível. Um total de 167 marcadores microssatélites foram utilizados para avaliar os *bulks* de cada cruzamento. Foram selecionados oito marcadores polimórficos para o cruzamento Milionário 1732 x Macanudo e sete para o cruzamento FT Tarumã x Macanudo. As análises *in silico* indicam que os marcadores polimórficos estão possivelmente envolvidos com os mecanismos de resistência do feijoeiro.

## Introdução

O Brasil é um dos maiores produtores e consumidores de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) do mundo. Esse fato deve-se à importância dessa cultura na dieta alimentar da grande maioria da população brasileira como fonte protéica de baixo custo (RIBEIRO, 2007). Entretanto, a cultura é afetada pela ocorrência de algumas doenças como a murcha de fusário do feijoeiro, causada por *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, sendo responsável por danos econômicos consideráveis à produção.

Os sintomas da doença manifestam-se por perda de turgescência, amarelecimento, queda progressiva de folhas e escurecimento dos vasos, podendo variar consideravelmente em intensidade, dependendo da reação da cultivar, severidade de infecção e condições de ambiente (ABAWI, 1989). Pesquisas têm mostrado que este patógeno apresenta pouca variação genotípica e que a herança da resistência genética da planta é controlada por poucos genes (SALGADO; SCHWARTZ; BRICK, 1995; BALSALOBRE *et al.*, 2008), o que facilita na obtenção de cultivares superiores pela transferência de alelos de resistência de fontes não comerciais e, muitas vezes, não adaptadas, para cultivares elite (ALZATE-MARIN, 2005).

Entretanto, a técnica de inoculação usada para o teste do germoplasma é bastante trabalhosa. Inicialmente as sementes são semeadas em bandejas, e após doze dias, as raízes das plantas são mergulhadas na suspensão de conídios do patógeno. Depois de doze dias da inoculação, as plantas são avaliadas de acordo com escala de notas de severidade da doença.

No programa de melhoramento em que devem ser selecionadas plantas resistentes dentro de populações segregantes, as quais possuem número elevado de plantas (entre 200 a 1000), a metodologia de inoculação torna-se praticamente inexecutável. A utilização de marcadores moleculares na seleção de plantas nas gerações segregantes, de F<sub>2</sub> a F<sub>5</sub>, por exemplo, facilitaria a seleção de genótipos resistentes sem os inconvenientes da metodologia de inoculação.

Os objetivos deste trabalho foram: selecionar marcadores microssatélites polimórficos em populações segregantes derivadas dos cruzamentos entre cultivares resistentes (Milionário 1732 ou FT Tarumã) e susceptível (Macanudo) à murcha do fusário visando o mapeamento de QTL, e avaliar a

1. Graduação em Biotecnologia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, CEP 13600-970. E-mail: thiago2pierre@hotmail.com; daniloe@hotmai.com; larissa.p.cruz@hotmail.com; luisgui530@hotmail.com; fernandazatti@hotmail.com

2. Pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antonio de Goiás, Goiás, CEP 75375-000. E-mail: caprio@cnpaf.embrapa.br

3. Professora Adjunto do Departamento de Biotecnologia Vegetal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, CEP 13600-970. E-mail: monalisa@cca.ufscar.br

possível função protéica desempenhada pelas sequências que originaram os microssatélites polimórficos através de análises *in silico*.

## Material e Métodos

O plantio e inoculação foram conduzidos em casa de vegetação na Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antonio de Goiás, Goiás. A extração do DNA e as análises de seleção dos marcadores microssatélites foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de São Carlos, *campus* de Araras, São Paulo. Como genitores resistentes ao isolado FOP 46 foram utilizadas as cultivares Milionário 1732 e FT Tarumã, e como suscetível a cultivar Macanudo (RAVA; SARTORATO; COSTA, 1996).

Cruzamentos controlados foram realizados entre Milionário 1732 X Macanudo e FT Tarumã X Macanudo para obter a geração F<sub>1</sub>. Os indivíduos dessa geração foram autofecundados, originando a geração F<sub>2</sub>. Da geração F<sub>2</sub>, em cada cruzamento foram autofecundados 120 genótipos produzindo 12 famílias F<sub>2,3</sub>. Essas famílias foram avaliadas quanto a resistência a murcha do fusário com base na escala diagramática com notas de severidade que variam de 1 (0% de tecido afetado) a 9 (75% de tecido afetado) (CÂNDIDA, 2008; BALSALOBRE *et al.*, 2008). Com base na avaliação da resistência, para cada cruzamento foram constituídos *bulks* resistente e susceptível, ou seja, genótipos com notas de 1 a 3 formaram o *bulk* resistente e, de 7 a 9 o *bulk* susceptível.

O DNA foi extraído a partir de 250 mg de folhas frescas de acordo com Hoisington; Khairallah; Gonzalez-de-Leon (1994). A quantificação das amostras de DNA foi realizada em gel de agarose 1%, comparando-as com uma série de concentrações conhecidas do DNA (20, 40, 80 e 160 ng) do fago  $\lambda$ . A visualização das bandas foi realizada através da coloração do gel com brometo de etídio (0,5  $\mu$ g/ml) sob luz ultravioleta.

Os genitores dos cruzamentos (FT Tarumã, Milionário 1732 e Macanudo) e os seus respectivos *bulks* foram avaliados quanto ao polimorfismo para 167 locos microssatélites (157 gênicos e 10 genômicos). As reações de amplificação foram feitas em volume final de 15  $\mu$ l, contendo 15 ng de DNA molde, 0,50 unidade de *Taq* DNA polimerase (Fermentas), 1X tampão da *Taq*, 200  $\mu$ M de cada dNTP, 0,25  $\mu$ M de *primer forward*, 0,25  $\mu$ M de *primer reverse*, 2500  $\mu$ M de MgCl<sub>2</sub> e água Milli-Q. As condições de amplificações foram estabelecidas conforme Hanai *et al.*, (2007). As reações de amplificações foram realizadas no termociclador Applied biosystems, modelo 9700 PCR System.

Após a amplificação, cada amostra recebeu 7,5  $\mu$ l de tampão de carregamento e em seguida foi submetida a desnaturação de 94 °C por 5 minutos. Após a desnaturação as amostras foram acondicionadas no gelo e aplicadas em gel de poli(acrilamida/bis(acrilamida) (19:1) 6,5 %, uréia 7,5 M, tampão 1X TBE] de 0,5 mm de espessura. A eletroforese dos fragmentos amplificados foi realizada em cuba vertical Sequi Gen GT da BioRad durante 2 horas e 30 minutos sob potência constante de 70 W. A visualização das bandas foi realizada em solução de nitrato de prata conforme descrito por Creste *et al.*, (2001).

As sequências dos marcadores microssatélites funcionais polimórficos foram alinhadas contra sequências depositadas no banco de dados de proteínas do NCBI (National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTX>). Esse alinhamento visou verificar putativa homologia das sequências contendo os microssatélites polimórficos com proteínas responsáveis pela resposta da interação planta-patógeno.

## Resultados e Discussão

No cruzamento Milionário 1732 X Macanudo, dos 167 marcadores microssatélites analisados, oito (4,79%) foram polimórficos. Destes, sete foram de origem gênica e um de origem genômica: PvM 002, PvM 004, PvM 118, PvM 037, PvM 115, PvM 127, PvM 13.a e FJ 51. No cruzamento FT Tarumã X Macanudo, dos 167 marcadores microssatélites analisados, sete (4,19%) foram polimórficos, sendo cinco de origem gênica e dois de origem genômica: PvM 037, PvM 115, PvM 127, PvM 066, PvM 118, FJ 51 e FJ 55. Quatro foram polimórficos em ambos cruzamentos, sendo todos de origem gênica (PvM 037, PvM 115, PvM 118 e PvM 127) (Tab. 1).

Cerca de 20% dos *primers* SSRs não amplificaram qualquer fragmento. A não amplificação de locos microssatélites gênicos (18%) foi mais freqüente que a de genômicos (1,2%). Estes resultados

corroboram com Blair *et al.*, (2003), os quais observaram que a não amplificação foi mais freqüente em SSRs gênicos quando comparados com SSRs genômicos (Tab. 1).

O nível de polimorfismo está diretamente relacionado com a diversidade genética presente na população em estudo. No presente trabalho, o baixo polimorfismo verificado nos dois cruzamentos (4,79% e 4,19%) pode ser atribuído à base genética estreita das plantas cultivadas, e neste caso específico pelos genitores pertencerem ao mesmo centro de origem (Mesoamericano) e apresentarem o mesmo tipo de grão (carioca). Ferreira (2006), estimou a taxa de polimorfismo dos marcadores microssatélites em 9% quando utilizou cruzamento entre genitores de feijoeiro comum provenientes de mesmo pool gênico e raça.

Com base nas análises *in silico*, verificou-se uma putativa função protéica das sequências dos marcadores microssatélites analisados com enzimas ou vias metabólicas que podem estar relacionadas com mecanismo de resposta de defesa/resistência das plantas a presença de patógenos.

O marcador PvM 037 apresenta homologia (65,9% de identidade) com região codificadora de proteína nuclear que se liga ao RNA, sugerindo possivelmente mecanismo transducional relacionado com a defesa da planta quando sob ataque de fitopatógeno, como no aumento dos níveis de fitoalexinas (faseolina, faseolidina, entre outras), de quitinases e de  $\beta$ -1,3-glucanases.

O marcador PvM 118 está associado com região codificadora de proteína quinase com atividade fosfotransferase (Ser/Thr quinase), responsável por ativar ou desativar a cascata MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) nas plantas em resposta ao etileno, sendo este, um sinalizador para as respostas de defesa.

O marcador PvM 066 apresenta homologia (77,3% de identidade) com região codificadora de família de proteínas associadas com dormência/auxina, sugere que a dormência a qual pode provocar a queda das folhas pode ser um reflexo de alterações no nível de auxinas influenciado pelo ataque de patógeno.

O marcador PvM 002 está associado com região codificadora da enzima Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase responsável pela adição de uma molécula de hidrogênio ao NAD formando NADH em etapa da glicólise. Possivelmente, o aumento da atividade dessa enzima é compreendida devido ao aumento na respiração de plantas afetadas pelo ataque de patógenos, pois os tecidos doentes passam a utilizar suas reservas de carboidratos em função do aumento da atividade metabólica, ou seja, biossíntese e acúmulo de vários compostos ligados aos mecanismos de defesa.

O marcador PvM 13.a está associado com região codificadora de proteína estrutural do ribossomo, o que também sugere aumento na atividade metabólica de defesa quando sob ataque do patógeno.

Os marcadores PvM 004, PvM 115 e PvM 127 quando submetidos ao banco de dados do NCBI, não apresentaram homologia com região codificadora de proteína de função conhecida.

## Conclusão

Embora a taxa de polimorfismo tenha sido baixa nos cruzamentos analisados, os marcadores microssatélites polimórficos apresentaram homologia com regiões codificadoras de proteínas que possivelmente estão associadas com os mecanismos de resistência do feijoeiro ao ataque do *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Esta evidência sugere que as marcas polimórficas selecionadas apresentam um potencial no mapeamento de QTL para murcha do fusário em feijoeiro comum.

## Referências

ABAWI, G. S. Root rots. In: SCHWARTZ, H. F.; PASTOR CORRALES, M. A. (Eds.). *Bean production problems in the tropics*. Cali: CIAT, 1989. p. 105-157.

ALZATE-MARIN, A. L. *et al.* Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.30, n. 4, p. 333-342, ago. 2005.

BALSALOBRE, T. W. A.; CÂNDIDA, D. V.; EVANGELISTA, D. E.; COSTA, J. G. C.; CARNEIRO, M. S. Controle genético da resistência a Murcha-de-Fusário em feijoeiro comum. In:

CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 9., 2008, Campinas. *Anais...* . Campinas: ..., 2008. p. 01. CD-ROM.

BLAIR, M. W.; PEDRAZA, F.; BUENDIA, H. F.; GAITÁN-SOLÍS, E.; BEEBE, S. E.; GEPTS, P.; TOHME, J. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean. *Theoretical and Applied Genetics*, Verlag, v. 107, n. 8, p. 1362-1374, set. 2003.

CÂNDIDA, D. V. *Controle genético da resistência à Fusarium oxysporium em feijoeiro comum*. 2008. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeats polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gel by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, Athens, v.19, n.4, p.299-306, dez. 2001.

FERREIRA, L. G. *Mapa genético do feijoeiro comum (Phaseolus vulgaris L.) baseado em marcadores microssatélites e RAPD*. 2006. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular) - Programa de Pós-graduação em Biologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.

HANAI, L. R. *et al.* Development, characterization, and comparative analysis of polymorphism at common bean SSR loci isolated from genic and genomic sources. *Genome*, Toronto, v. 50, n. 3, p. 266-277, mar. 2007.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZALEZ-DE-LEON, D. *Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory*. 2. ed. México: CIMMYT, 1994. 88p.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. *BLASTX*. Disponível em: < <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>> Acesso em: 07 abr. 2009.

RAVA, C. A.; SARTORATO, A.; COSTA, J. G. C. Reação de genótipos de feijoeiro comum ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em casa de vegetação. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.21, n. 2, p.296-300, jun. 1996.

RIBEIRO, E. H. *Avaliação de linhagens endogâmicas recombinadas de feijão comum (Phaseolus vulgaris L.) obtidas pelo método SSD (Single Seed Descent)*. 2007. 77 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2007.

SALGADO, M. O.; SCHWARTZ, H. F.; BRICK, M. A. Inheritance of resistance to a Colorado race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common beans. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 79, n. 3, p.279-289, mar. 1995.

**Tabela 1** - Triagem dos locos microssatélites quanto ao polimorfismo e origem de suas bibliotecas entre os genitores e os bulks resistente e susceptível de cada cruzamento analisado (Milionário 1732 x Macanudo e FT Tarumã x Macanudo).

Séries	Origem	Polimórfico	%*	Monomórfico	%*	Não Amplificou	%*	Total
Milionário 1732 x Macanudo								
PvM	Gênica	7	4,19	119	71,25	31	18,56	157
FJ	Genômica	1	0,60	7	4,20	2	1,20	10
FT Taumã x Macanudo								
PvM	Gênica	5	3	121	72,45	31	18,57	157
FJ	Genômica	2	1,19	6	3,6	2	1,19	10

\* Porcentagem sobre o total de marcadores (167).