

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÕES DE SISTEMAS DE GENOTIPAGEM MULTILOCO SEMI-AUTOMATIZADOS BASEADOS EM MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA FEIJOEIRO

PRISCILA NASCIMENTO RANGEL^{1,2}, ROSANA PERERIRA VIANELO
BRONDANI¹, ROBERTHA AUGUSTA VASCONCELOS GARCIA^{1,2}, MARIA
JOSÉ DEL PELOSO¹, CLAUDIO BRONDANI¹, MATHEW BLAIR³

INTRODUÇÃO: O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das mais importantes leguminosas cultivadas em todo o mundo, integrando uma parte importante da dieta das populações de países da América Latina como México, Colômbia, Brasil entre outros (Islam et al., 2002). No Brasil, a cultura do feijoeiro tem grande importância econômica e cultural, uma vez que esta leguminosa tem lugar de destaque na dieta dos brasileiros e pode ser considerada a principal fonte de ferro para as populações de menor poder aquisitivo. A produção do feijoeiro comum concentra-se principalmente nos países em desenvolvimento, de onde provém grande parte da produção mundial. Um dos fatores limitantes para a cultura do feijoeiro nestes países é a seca, que afeta uma vasta área cultivada (Ramirez_Vallejo e Kelly, 1998). Além disso, outros fatores bióticos e abióticos, como pragas e doenças, também são limitantes para a produção desta cultura. Portanto, existe a necessidade da busca por genótipos que apresentem resistência e/ou tolerância a estes estresses para serem utilizados nos programas de melhoramento genético do feijoeiro comum. Uma vez identificados, os genótipos precisam ser devidamente caracterizados tanto ao nível morfológico quanto molecular. Neste caso, a análise genômica, baseada na tecnologia de marcadores moleculares, que possibilitam a detecção das diferenças entre indivíduos a nível de DNA, tem sido realizada com sucesso para leguminosas de interesse agrônomico (Abe et al., 2003; Maciel et al., 2003) fornecendo medidas precisas da variabilidade genética existente entre e dentro dos acessos de germoplasma e orientando a utilização desses nos programas de melhoramento genético vegetal. Dentre as classes de marcadores de DNA, os microssatélites (SSR – Simple Sequence Repeat) são os mais indicados para estudos de diversidade e caracterização genética, pois possuem alto poder discriminatório, elevado conteúdo de informação de polimorfismo advindo da sua natureza multialélica, são co-dominantes, abundantes no genoma e são facilmente detectados em sistemas automatizados (Rafalski e Tingey, 1993). A utilização de marcadores SSRs para fins de genotipagem individual em larga escala tem evoluído para o desenvolvimento de

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

² Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil;

³ CIAT – Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colômbia.

sistemas de genotipagem multiloco semi-automatizadas, a qual permite que vários fragmentos microssatélites sejam analisados e detectados simultaneamente (sistemas multiplex) em analisador automático de DNA, resultando em maior precisão na detecção alélica, redução de custos e tempo de análise, além de minimizar os erros inerentes de uma análise manual e visual. Este trabalho teve como objetivos: 1) otimizar as condições de amplificação para um conjunto de 20 locos SSR desenvolvidos para feijoeiro e marcados com fluorescência; 2) desenvolver e ajustar sistemas de amplificação e análise automatizada simultânea dos locos SSR; 3) caracterizar a nível molecular os locos SSRs em um conjunto de genótipos visando sua ampla utilização em estudos de análise genômica do feijoeiro.

MATERIAL E MÉTODOS: A população experimental consistiu de 30 genótipos de feijoeiro provenientes do CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Para a análise molecular, foram utilizados 20 marcadores microssatélites desenvolvidos para feijoeiro (Gáitan-Solís et al., 2002; Blair et al., 2003) e marcados com fluorescência (Tabela 1). Treze marcadores foram marcados com a fluorescência 6-carboxifluoresceína (6-Fam) e 7 foram marcados com a hexacloro-6-carboxifluoresceína (Hex). As reações de amplificação foram conduzidas utilizando 15ng de DNA, 0,3 μ M de cada marcador, 0,25mM de cada dNTP, 10mM Tris-HCl (pH8,3), 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,2mg/ml BSA (Soro Albumina Bovina) e 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase. As amplificações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) com um pré-ciclo de 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 1 minuto com a temperatura de anelamento específica de cada marcador e 72°C por 1 minuto, seguido por uma extensão final de 72°C por 7 minutos. A genotipagem automatizada foi conduzida em um analisador automático de DNA (ABI 3100, Applied Biosystems) seguida pela análise dos dados utilizando o software GeneMapper 2.5 (Applied Biosystems). Os parâmetros genéticos dos locos SSRs (PIC – Polymorphism Information Content, heterozigosidades esperada e observada e o número de alelos detectados) foram determinados utilizando o programa GDA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: As condições de amplificação foram as mesmas para os 20 locos SSR utilizados, variando apenas a temperatura de anelamento para cada um, conforme especificado na Tabela 1. O ajuste e determinação da temperatura ótima de anelamento para cada marcador é fundamental, pois garante a especificidade dos produtos amplificados (Brondani et al., 1998), o que resulta em um bom padrão de interpretação dos dados gerados no analisador automático de DNA. Posteriormente foram ajustados os sistemas de amplificação simultânea de um conjunto de marcadores SSR, visando maximizar o número de locos co-amplificados em uma mesma reação de PCR. Marcadores SSR marcados com a mesma fluorescência, porém com faixas de amplificação alélica distintas em no

mínimo 20 pares de base, foram agrupados em um mesmo sistema multiplex. Desta forma, para os 20 SSRs utilizados, foi possível montar 3 conjuntos multiplex, sendo um com 6 marcadores (Painel 1) e dois com 7 marcadores cada (Painéis 2 e 3) (Tabela 1). Dentro de um mesmo painel os marcadores SSR com a mesma TA foram co-amplificados em uma mesma reação de PCR e os SSRs com TA diferentes foram amplificados separadamente, sendo posteriormente reunidos para serem submetidos à eletroforese. Desta forma, a partir de 7 reações de PCR e apenas 3 eletroforeses, foi possível genotipar 20 locos SSRs. Após o ajuste e montagem dos sistemas de amplificação e detecção multiplex, os 20 locos foram utilizados para caracterizar um conjunto de 30 genótipos de feijão. O número de alelos médio encontrado foi de 10 alelos/loco. O PIC médio foi de 0,67, sendo maior para o SSR BM53 (0,94) e menor para o SSR BM98 (0,32). Este conjunto de marcadores serão utilizados para caracterizar rotineiramente os genitores e linhagens derivadas do programa de melhoramento genético do feijoeiro. Os dados da caracterização serão utilizados para a construção de um banco de dados para auxiliar no gerenciamento do programa.

Tabela 1. Marcadores microsatélites de feijoeiro. Os painéis compreendem os locos SSRs analisados simultaneamente. TA é a temperatura de anelamento.

	Marcadores	TA	Amplitude Alélica	Fluorescência
Painel 1	BM170	48°C	155-192	Hex
	BM199	62°C	290-320	6-Fam
	BM212	56°C	196-214	6-Fam
	BMd36	56°C	164-180	6-Fam
	BMd41	56°C	232-255	6-Fam
	BMy06	56°C	135-140	6-Fam
Painel 2	BM138	54°C	195-204	6-Fam
	BM152	56°C	92-138	Hex
	BM157	52°C	100-130	6-Fam
	BM161	52°C	148-190	Hex
	BM53	54°C	278-360	6-Fam
	BMy02	56°C	148-160	6-Fam
	GATS11	56°C	226-230	Hex
Painel 3	BM142	56°C	155-162	6-Fam
	BM184	52°C	150-167	Hex
	BM185	52°C	105-117	6-Fam
	BM98	56°C	242-252	6-Fam
	BMd03	50°C	223-228	Hex
	BMd33	56°C	97-110	Hex
	BMd40	56°C	190-213	6-Fam

CONCLUSÕES: Foram desenvolvidos a partir do presente estudo sistemas de genotipagem multiloco, baseados em marcadores SSR, associados a sistema de detecção fluorescente para uso em feijoeiro. A otimização de sistemas de

genotipagem semi-automatizados para feijoeiro possibilitou que 20 locos SSRs fossem genotipados simultaneamente através de apenas 3 sistemas multiplex. Os marcadores SSR utilizados neste estudo são multialélicos e apresentam elevado PIC, sendo, portanto, ideais para a caracterização genética de genótipos de feijoeiro. O desenvolvimento deste sistema de detecção multiloco semi-automatizado integra hoje uma iniciativa mundial de padronização de sistemas de genotipagem rápida e precisa visando uma ampla caracterização do germoplasma de feijão.

AGRADECIMENTOS: Apoio financeiro do “Generation Challenge Program”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, J.; XU, D. H.; SUZUKI, Y.; KANAZAWA, A.; SHIMAMOTO, Y. (2003) Soybean germplasm pools in Asia revealed by nuclear SSRs. **Theoretical and Applied Genetics**. 106:445-453
- 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 (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and applied genetics**. v. 107, p. 1362-1374. 2003.
- BRONDANI, R. P. V., KIRST, M., CIAMPI, A., GRATTAPAGLIA, D. Optimization of fluorescence-based automated DNA detection of microsatellites in Eucalyptus In: 44 Congresso Nacional de Genética, 1998, Águas de Lindóia. **Genetics and Molecular Biology** (21), 188 – 188, 1998.
- GAITÁN-SOLÍS, E.; DUQUE, M. C.; EDWARDS, K. J.; TOHME, J. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): isolation, characterization, and cross-Species in *Phaseolus* ssp. **Crop Science**. v. 42, p. 2128-2136. 2002.
- ISLAM, F. M. A.; BASFORD, K. E.; REDDEN, R. J.; GONZALEZ, A. V.; KROONENBERG, P. M.; BEEBE, S. Genetic variability in cultivated common bean beyond the two major gene pools. **Genetic Resources and Crop Evolution**. v. 49, p. 271-283. 2002.
- MACIEL, F. L.; ECHEVERRIGARAY, S.; GERALD, L. T. S.; GRAZZIOTIN, F. G. Genetic relationships and diversity among Brazilian cultivars and landraces of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) revealed by AFLP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**. v. 50, p. 887-893. 2003.
- RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. **Trends in Genetics**. v. 9, p.275-279. 1993.
- RAMIREZ-VALLEJO, P.; KELLY, J. D. Traits related to drought resistance in common bean. **Euphytica**. v. 99, p. 127-136. 1998.