

INTEGRAÇÃO DE MARCADORES SSR NO MAPA GENÉTICO CONSENSO DE FEIJÃO (BAT93 X JALO EEP558)*

MARA CECÍLIA DE MATTOS GRISI^{1,2}, ROSANA PEREIRA VIANELLO
BRONDANI³, MARIA JOSÉ DEL PELOSO⁴, MATTHEW BLAIR⁵,
PAUL GEPTS⁶, CLAUDIO BRONDANI⁷

INTRODUÇÃO: O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura amplamente difundida no Brasil, maior país produtor e consumidor do grão. Marcadores moleculares mapeados e ligados a genes de características de interesse agrícola podem ser utilizados para identificar indiretamente os genótipos de feijão com fenótipo favorável armazenados em bancos de germoplasma. Desta forma, esses marcadores auxiliam o processo de incorporação das características favoráveis em genótipos elite de feijão, favorecendo o desenvolvimento de novas cultivares comerciais. Devido à multiplicidade de objetivos nos programas de melhoramento do feijão, tais como resistência a pragas e doenças, tolerância a estresses bióticos e abióticos, uma única população não pode segregar para todas as características de interesse. Assim, genes para essas características são identificados em mapas desenvolvidos a partir do cruzamento de diferentes genitores, gerando populações segregantes diferenciadas. O desafio, portanto, tem sido estabelecer uma comparação entre estes mapas, permitindo assim que as relações de ligação entre diferentes genes possam ser identificadas em um mapa consenso. A primeira população de mapa consenso para o feijoeiro foi selecionada por Freyre *et al.* (1998), sendo esta uma população de linhas puras recombinantes resultante do cruzamento entre os genótipos BAT93 (linhagem desenvolvida no CIAT) e JaloEEP558 (cultivar brasileira). A população BAT93 x JaloEEP558 (BJ) exibe um alto nível de diversidade para RFLP e outros marcadores, pois seus parentais originam-se de *pools* gênicos da América Central e dos Andes, respectivamente (Nodari *et al.*, 1992). Inicialmente o mapa genético BJ foi construído com 620 marcadores moleculares (RAPD, RFLP, SCAR e isoenzimas) (Freyre *et al.*, 1998). Contudo, é fundamental a incorporação de marcadores microssatélites (SSR) neste mapa, devido à sua ampla dispersão no genoma, codominância, multialelismo e alto conteúdo de informação de polimorfismo desses marcadores. Este trabalho tem como objetivo mapear e integrar um conjunto de marcadores SSR no mapa genético consenso BJ do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.).

¹ Universidade Federal de Goiás, GO. mattosgrisi@yahoo.com.br.

² Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO.

³ Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO.

⁴ Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO.

⁵ International Center for Tropical Agriculture, Cali, Colômbia.

⁶ Department of Agronomy and Range Science, University of California, Davis, USA.

⁷ Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO.

*Apoio financeiro do CNPq/Projeto Universal

MATERIAL E MÉTODOS: O material vegetal foi constituído por 79 linhagens puras recombinantes resultantes do cruzamento BAT93 x Jalo EEP558. As extrações de DNA foram realizadas e a concentração de cada amostra de DNA ajustada para 3 ng/μl. Para a análise genética foram utilizados marcadores SSR, sendo que um total de 292 marcadores foram avaliados quanto ao padrão de amplificação. Destes, 99 SSRs estão disponíveis na literatura (Yu *et al.*, 1999; Gaitán-Solís *et al.*, 2002, Yaish *et al.*, 2003) e 193, desenvolvidos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (dados não publicados). Inicialmente, os 292 locos foram testados à temperatura de 56°C. Os primers que não amplificaram foram submetidos a novos testes com temperaturas mais baixas (48°C, 50°C e 52°C) e, para os SSRs com padrão de amplificação com múltiplas bandas, elevou-se a temperatura de anelamento (58°C e 60°C) na tentativa aumentar especificidade do produto amplificado. Os SSRs selecionados por amplificarem produtos de PCR de fácil interpretação foram avaliados quanto ao polimorfismo entre os parentais do cruzamento BAT93 x Jalo EEP558. As reações de PCR foram conduzidas em um volume final de 15μl e amplificadas em termociclador PT-100 (MJ Research). Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese horizontal em géis de agarose 5%, corados com brometo de etídio (0,1μg/μl). Os SSRs não identificados como polimórficos entre os parentais, em géis de agarose 5%, foram submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida 6% corados com nitrato de prata, possibilitando a separação de fragmentos com menores diferenças em pares de base. Os locos SSR que apresentaram polimorfismo para os parentais foram genotipados na população segregante. A análise de ligação foi efetuada reunindo os dados de segregação obtidos com os marcadores SSR e os dados de segregação previamente publicados, que incluem 119 marcadores (RAPD, RFLP, SCAR e isoenzimas), e estão disponibilizados no endereço <http://www.agronomy.ucdavis.edu/gepts/bjril7.htm>. A distorção de segregação em relação a proporção esperada de 1:1 foi verificada através do teste χ^2 . Os mapas de ligação foram obtidos com o programa Mapmaker versão 2.0 para Macintosh, com os parâmetros de LOD score=3,0, máxima fração de recombinação de 0,3 e função de mapeamento de Kosambi. Os grupos de ligação foram enumerados de acordo com o mapa estabelecido por Freyre *et al.*, 1998.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: Dos 292 locos microssatélites avaliados quanto às condições de amplificação, 223 foram selecionados. Entre os locos selecionados, 120 SSR (54%) foram identificados como sendo polimórficos entre os parentais do cruzamento e, portanto, podem fazer parte da análise de ligação. Até o momento, 75 marcadores SSR foram utilizados na genotipagem da população segregante. Destes, 24% dos locos tiveram o polimorfismo detectado em géis de agarose, e os demais 76% em géis de poliacrilamida. Dos 75 marcadores, 5 apresentaram um alelo nulo para um dos parentais (BM167, BM153, AJ416389, AJ416391 e PV6). A ausência de amplificação de um alelo em linhagens de feijão pode ser o resultado de mutações (deleções ou substituições) no sítio de anelamento do primer, ou a deleção do microssatélite num loco específico. Dos 75 SSRs genotipados na

população BJ, 3 (PV54, PV218 e PV6) desviaram da segregação esperada de 1:1 ($P < 0.05$), o que está dentro do esperado devido apenas ao acaso, que seria de aproximadamente 3,75 marcadores ($\alpha = 0.05$). A análise de ligação foi realizada com 194 marcadores (119 do mapa original e 75 SSRs utilizados na genotipagem da população neste trabalho). Destes, 169 (84,5%) foram mapeados e distribuídos ao longo de 12 grupos de ligação (Figura 1), excedendo o número de cromossomos de feijão ($n=11$). Apenas 6 marcadores SSR genotipados não foram mapeados com os parâmetros de mapeamento adotados. Os grupos 4a e 4b correspondem ao grupo de ligação 4 do mapa desenvolvido por Freyre *et al.*, 1998. O mesmo ocorreu para os grupos 7a e 7b, que foram correspondentes ao grupo 7. Três estratégias poderiam ser empregadas para integrar estes marcadores no mapa genético e também para reduzir a formação de grupos de marcadores isolados: a primeira seria diminuir o LOD score, fazendo com que os marcadores tivessem maiores chances de serem posicionados em algum ponto do mapa; a segunda seria o teste de mais marcadores, esperando que estes pudessem fazer a ponte entre o grupo de ligação principal e os marcadores ou grupos não integrados, e a terceira seria o aumento do tamanho da amostra, o que resultaria na possibilidade de conseguir detectar ligação mesmo a grandes distâncias. O tamanho dos grupos de ligação variou de 295,53 cM a 16,63 cM, com uma média de 101,7 cM. O tamanho total do mapa foi estimado em 1322 cM, bem próximo ao valor de 1226cM estabelecido por Freyre *et al.* (1998) que relata para feijão o maior número de marcadores mapeados para a espécie *Phaseolus vulgaris* L..

CONCLUSÕES: Dos 223 locos SSR avaliados quanto ao polimorfismo no cruzamento BAT93 x Jalo EEP558, 54% detectaram polimorfismo entre os parentais e estão sendo integrados neste mapa consenso. Estes resultados indicam a possibilidade de se alinhar mapas genéticos construídos originalmente com marcadores menos informativos, a partir da genotipagem da população segregante com um número reduzido de marcadores codominantes que possuam, porém, um elevado conteúdo de informação genética e uma ampla distribuição ao longo do genoma. A partir de um mapa genético baseado exclusivamente em locos SSR abre-se a possibilidade real do desenvolvimento de um mapa referência útil para as espécies do gênero *Phaseolus*, com novas perspectivas para a análise de homologia entre QTLs mapeados em diferentes populações segregantes e a busca direcionada de novos alelos a QTLs em genótipos armazenados em bancos de germoplasma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FREYRE, R.; SKROCH, P.W.; GEFFROY, V.; ADAM-BLONDON, A.F.; HIRMOHAMADALI, A.; JOHNSON, W. C.; LLACA, V.; NODARI, R.O.; PEREIRA P.A.; TSAI S.M.; TOHME J.; DRON M.; NIENHUIS J.; VALLEJOS C.E.; GEPTS P. Towards an integrated linkage map of common bean . 4.

Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. **Theoretical Applied Genetics**, v. 97, p. 847-856, 1998.

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.

NODARI, R.O.; KOINANGE, E.M.K.; KELLY, J.D.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean. I. Development of genomic DNA probes and levels of restriction fragment length polymorphism. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 84, p.186-192, 1992.

YAISH, M.W.F., VEJA, M. P. Isolation of (GA)_n microsatellite sequences and description of a predicted MADS-box sequence isolated from common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p.337-342, 2003.

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.

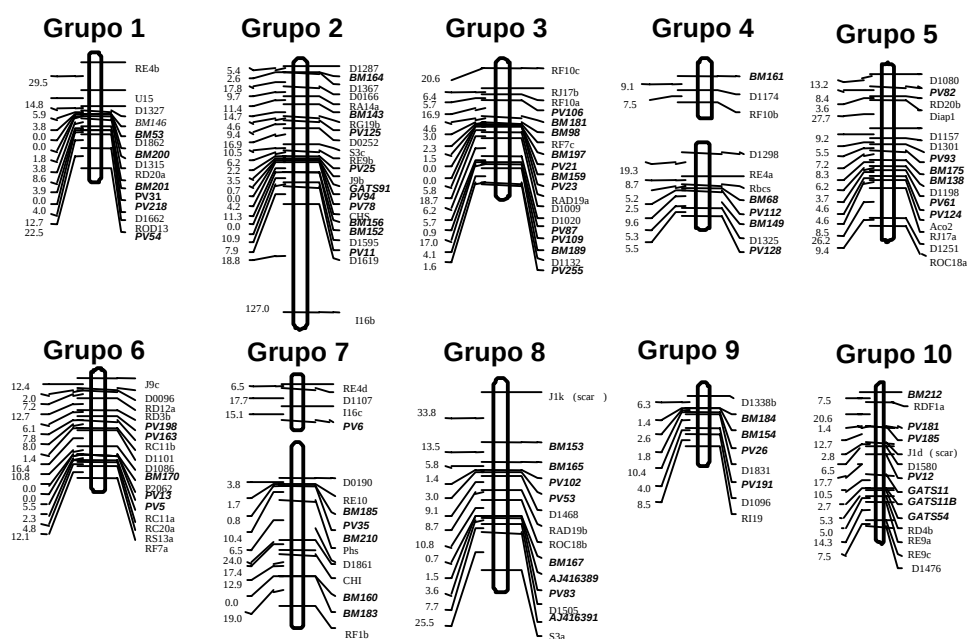


Figura 1. Mapa de ligação para a população Bat 93 x Jalo EEP558 integrando um conjunto de marcadores SSRs (indicados em negrito).