UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES NA CONSTRUÇÃO DE MAPA GENÉTICO EM FEJJOEIRO COMUM, VISANDO A IDENTIFICAÇÃO DE QTL's ASSOCIADOS AO TEOR DE PROTEÍNAS EM GRÃOS

LUCIANA GOMES FERREIRA¹, FÁBIO LUIS TELES², GISELLE SANTOS DAVI², ANA LÍVIA RIBEIRO KOZLOWSKI², RUDY CAMILO NUNES¹, GLÁUCIA SALLE CORTOPASSI BUSO³, ROSANA PEREIRA VIANELLO BRONDANI⁴, CLÁUDIO BRONDANI⁴, LEONARDO CUNHA MELO⁴, MARIA JOSÉ DEL PELOSO⁴, PRISCILA ZACZUK BASSINELLO⁴, SERGIO TADEU SIBOV¹, MONALISA SAMPAIO CARNEIRO¹

INTRODUÇÃO: O desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares na análise genética de espécies e, potencialmente, no melhoramento de plantas. 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 (Lee, 1995). Além da localização dos QTLs (Quantitative Trait Loci) e a determinação de seus efeitos, o desenvolvimento de mapas de ligação permite o entendimento da estrutura do genoma e estudos de sintonia. A construção destes mapas genéticos requer a escolha de genitores que apresentam o máximo de polimorfismo, e que sejam produzidas gerações em que os locos estejam em desequilíbrio de ligação. A identificação de um grande número de marcadores moleculares polimórficos constitui uma etapa primordial, pois quanto mais marcas houver no mapa (maior saturação), maior será a capacidade informativa deste mapa, e conseqüentemente mais rapidamente os dados serão utilizados nos programas de melhoramento (Staub et al., 1996, Carneiro & Vieira, 2002). Dentre os marcadores moleculares utilizados nos estudos de mapeamento genético, os marcadores microssatélites, também denominados SSR (Simple Sequence Repeats), destacam-se por serem altamente informativos, multialélicos e por apresentarem alta reprodutibilidade. A compreensão a nível molecular de características relacionadas à qualidade nutricional, como o teor de proteína, poderá permitir uma melhor exploração na variabilidade genética existente, implicando resultados mais eficientes em programas de melhoramento de feijoeiro. O objetivo deste trabalho foi selecionar marcadores microssatélites polimórficos para construção de um mapa genético a partir de uma população F₂ oriunda do cruzamento entre as linhagens de feijoeiro carioca CNFC 7812 e CNFC 8056.

¹ Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

² Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás

³ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Embrapa Arroz e Feijão.

MATERIAL E MÉTODOS: Para obtenção da população segregante (F_2) foi realizado um cruzamento entre as linhagens CNFC 7812 e CNFC 8056, sendo estas contrastantes para o teor de proteína com 24 e 19%, respectivamente. O DNA genômico foi extraído conforme descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998), com modificações. A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 1%, comparando a amostra com uma série de concentrações conhecidas do DNA (10, 20 50 e 100 ng) do fago lambda. Para seleção dos marcadores SSR polimórficos foram utilizados os dois genitores e quatro indivíduos da F_2 . Foram testados 211 pares de primers das bibliotecas PV (*Phaseolus vulgaris*), 58 de BM (Bean microsatellite) e 43 outros (AJ416, AG, X e Z), perfazendo um total de 312 microssatélites, destes apenas os primers PVs são provenientes de bibliotecas genômicas, o restante dos primers foi obtido a partir de seqüências gênicas. As reações de amplificação foram realizadas com 15 ng de DNA, 1X Buffer, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTPs, 0,28 mM dos primers R + F, 1U de *Taq* DNA polimerase. As amostras foram submetidas à desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto; temperatura de anelamento do primer (48 a 56° C) por 1 minuto e a extensão final a 72°C por 1 minuto. Os produtos resultantes da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e a visualização das bandas realizada em solução de nitrato de prata conforme descrito por Creste et al. (2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO: Do total de 312 microssatélites testados, apenas 12 (3,84%) não amplificaram qualquer fragmento, 43 (13,78%) amplificaram locos polimórficos, 203 (65,06%) foram monomórficos e 54 (17,3%) foram considerados de difícil análise (Tabela 1). Os locos SSR de difícil análise referem-se àqueles que resultaram em produtos de amplificação de baixa intensidade e de padrões de múltiplas bandas. Dos 43 microssatélites polimórficos encontrados, 24 (55,8%) locos foram obtidos a partir de bibliotecas genômicas e, 19 (44,18%) de bibliotecas gênicas.

Tabela 1. Marcadores microssatélites testados entre os genitores CNFC 7812 e CNFC 8056 e quatro indivíduos da população.

Biblioteca de					Difícil	
SSR	Polimórfico	Monomórfico	Não Amplificou	Análise	TOTAL	
PV	24	130	10	47	211	
BM	14	39	2	3	58	
Outros*	5	34	0	4	43	
TOTAL	43	203	12	54	312	

* Outros: AJ416, AG, X e Z.

As porcentagens de locos polimórficos encontradas foram de 11,37% para os SSR derivados de bibliotecas genômicas e de 18,81% para aqueles isolados de biblioteca gênica. Blair et al. (2003), utilizando duas populações RIL (linhagens endogâmicas

recombinantes) de feijoeiro, observaram que os marcadores SSR provenientes de bibliotecas gênicas (46,3%) foram menos polimórficos quando comparados com os de bibliotecas genômicas (64,3%). No entanto, em outros trabalhos semelhantes taxas de polimorfismo entre microssatélites gênicos e genômicos foram observadas (Chagné et al, 2004; Barbosa, 2005). Neste trabalho, a não amplificação de locos microssatélites genômicos foi mais freqüente do que a de locos gênicos. Ao contrário do resultado aqui exposto, Blair *et al.*(2003) observaram que a não amplificação foi mais freqüente em microssatélites baseados em seqüências gênicas quando comparados com as genômicas. A diferença entre os resultados é provavelmente devido à presença de íntrons nos pares de primers desenvolvidos para *P. vulgaris*.

CONCLUSÕES: Foi possível detectar polimorfismo entre os marcadores microssatélites testados para as linhagens CNFC 7812 e CNFC 8056, sendo que os pares de primers oriundos de bibliotecas gênicas apresentaram uma maior taxa de polimorfismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, A. V. G. **Construção de um mapa de ligação para espécies do genoma B relacionadas ao amendoim (*Arachis hypogaea* – ABB)**. 2005. p.97. Tese (Doutorado) – UNESP, Botucatu.
- 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.). **Theor Appl Genet.**, v.107, p.1362-1374, set, 2003.
- CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. A. C. Mapas Genéticos em Plantas. **Bragantia**, Campinas, v. 61, p.89-100, 2002.
- CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, n.4, v.19, p.1-8, 2001.
- CHAGNÉ, D.; CHAUMEIL, P.; RAMBOER A.; COLLADA, C.; GUEVARA, A.; CERVERA, M-T.; VENDRAMIN, G.G.; GARCIA, V.; FRIGERIO, J.M.; ECHT, C.; RICHARDSON, T.; PLOMION, C.; Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, p.1204-1214, 2004.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: Embrapa/Cenargen, 1998. 220p.
- LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. **Adv. Agron.**, v.55, p.263-344, 1995.
- STAUB, J.E, SERQUEN, F.C., GUPTA, M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. **HortScience**, Alexandria, v.31, p.729-740, 1996.