MAPEAMENTO DE QTL ASSOCIADOS À MANCHA ANGULAR E AO OÍDIO EM FEIJÃO COM BASE EM UM MAPA DE LIGAÇÃO ENRIQUECIDO COM MARCADORES RGA*

Luiz Ricardo **HANAI**[1]
Luciane **SANTINI**[1]
Leonardo Cunha **MELO**[2]
João Bosco dos **SANTOS**[3]
Luis Eduardo Aranha **CAMARGO**[4]
Maria Lucia Carneiro **VIEIRA**[1]

INTRODUÇÃO

A cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é de extrema importância para o Brasil e, também, em termos mundiais, sendo necessário o desenvolvimento de pesquisas que possibilitem a melhoria da produção e da qualidade dos grãos e o aumento da produtividade das lavouras. No aspecto produtivo, os problemas fitossanitários são os principais limitadores. A espécie é atacada tanto por doenças fúngicas quanto por vírus e bactérias. Cultivares resistentes têm sido produzidos com sucesso, por muitos anos, através de melhoramento clássico. No entanto, o desenvolvimento de marcadores moleculares e a construção de mapas genéticos têm possibilitado o emprego de estratégias de melhoramento mais sofisticadas, como o uso da seleção assistida.

Os mapas genético-moleculares permitem a localização de regiões controlando caracteres tanto de herança simples quanto complexa (Quantitative Trait Loci), permitindo, a partir do mapeamento de QTL, se estudar a arquitetura genética de caracteres de interesse. Do ponto de vista do melhoramento, é interessante que os mapas possam ser completamente saturados indicando a localização de genes e QTL, sejam eles para resistência a pragas e doenças, performance agronômica, adaptabilidade, síndrome da domesticação, qualidade, ou qualquer outro caráter importante. Estas informações podem ser usadas em programas de melhoramento tanto para a obtenção de novas cultivares pela seleção assistida por marcadores, quanto para auxiliar os melhoristas a entender os efeitos e o modo de ação dos locos que controlam caracteres de interesse.

Este trabalho teve como objetivos a construção de um mapa genético enriquecido com marcadores RGA (*Resistance Gene Analogs*) em feijão (2n = 22) e o seu uso no mapeamento de QTL de resistência ao oídio (*Erysiphe polygoni*) e à mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*).

MATERIAL E MÉTODOS

O mapa de ligação baseado em marcadores SSR (*Simple Sequence Repeat*) AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e RGA foi construído usando uma população de RILs derivada do cruzamento entre "Carioca" e Flor de Mayo". A população de mapeamento consistiu de 94 famílias $F_{5:7}$. (MELO et al., 2002).

O isolamento de DNA e o desenvolvimento de marcadores SSR foram realizados conforme descrito em HANAI et al. (2007). Os marcadores RGA foram gerados conforme SANTINI et al. (2007) e os marcadores AFLP seguiram o protocolo de VOS et al. (1995)

---

* Apoio financeiro: FAPESP e CNPq
[1] Departamento de Genética, ESALQ/USP
[2] Embrapa Arroz e Feijão
[3] Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras
[4] Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP.

otimizado em nosso laboratório. O programa Mapmaker/Exp versão 3.0 (LANDER et al., 1987) foi usado para as análises de agrupamento e a ordenação dos locos no mapa. Os grupos de ligação foram identificados pela análise de marcadores comuns ao mapa referência de feijão (FREYRE et al. 1998).

Para as análises de mapeamento de QTL, foram utilizados os dados fenotípicos de reação à mancha-angular e ao oídio obtidos por MELO e colaboradores (2002). As famílias dessa população foram avaliadas em duas épocas diferentes de plantio (época das secas e do inverno) em duas localidades do estado de Minas Gerais (Lavras e Patos de Minas). No presente trabalho, foram consideradas apenas as médias de ambientes. A co-segregação dos marcadores com as médias das características foi detectada pelo mapeamento por intervalo composto através do *software* QTL Cartographer para Windows (versão 2.5). O limiar para se aceitar um QTL foi obtido através de 1000 permutações com 5% de significância. O pico de LOD *score* foi usado para estimar a posição mais provável do QTL no mapa de ligação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dados de segregação de 295 locos (9 locos SSR-genômicos, 18 SSR-EST, 225 AFLPs e 43 RGA) foram analisados para a construção do mapa da população "Carioca" x "Flor de Mayo" (CFM). O mapa de ligação apresentou 12 GL, pois o grupo correspondente ao B8 da população Bat x Jalo (população núcleo de mapeamento de *P. vulgaris*) permaneceu dividido (Figura 1), formando os grupos CFM1 e CFM12. No total, 133 marcadores foram ordenados no *framework* com LOD>2, gerando um mapa com 923,6 cM de comprimento, com uma distância média de 6,9 cM entre marcas e uma cobertura de aproximadamente 77% do genoma da espécie, cujo tamanho é estimado em 1200 cM. Com relação aos marcadores RGA, dos 43 locos analisados, 40 estão distribuídos em 9 GL. Interessantemente, os GL CFM1 e CFM4 foram os que apresentaram maior número de marcadores RGA mapeados neste estudo, assim como, seus correspondentes B8 e B2 na população Bat x Jalo (SANTINI et al., 2007).

Três QTL para resistência ao oídio foram detectados. Os dois primeiros QTL estão no grupo de ligação CFM4, um localizado entre as marcas DKCR_216 (a 6 cM) e C05_210 (a 10 cM), e o outro está posicionado sobre a marca PvM21 (0 cM). O terceiro QTL está no grupo CFM8, posicionado entre as marcas C23_195 (7 cM) e C24_325 (4 cM). Os dois primeiros QTL possuem efeito negativo, contribuindo para a diminuição do dano causado pelo patógeno e o terceiro contribuindo para o aumento do dano. Já, para a reação à manha angular foram detectados dois QTL, um no grupo de ligação CFM3 entre os marcadores PvM49 (a 17 cM) e C05_130 (a 0,2 cM) e um no grupo CFM4 na mesma posição do marcador PvM21 (0 cM). Os dois QTL mapeados para reação à mancha angular mostraram efeito aditivo negativo, atuando no sentido de diminuir a severidade da doença. Os resultados para os cinco QTL mapeados neste trabalho estão sumarizados na tabela 1 e sua representação gráfica na figura 2.

No grupo de ligação CFM4, estão três marcadores RGA próximos aos QTL de resistência. O marcador DKCR_216 a 6 cM de um dos QTL de resistência ao oídio e os marcadores DKEF_138 e DKEF_140 foram alocados como acessórios em região compreendida por QTL de resistência ao oídio e à mancha angular. Também no grupo de ligação CFM8, foram co-localizados os marcadores RGA, DRPF_225 (alocado como acessório) e DRPF_230 (no *framework*) com um QTL de resistência ao oídio. Estes resultados são corroborados pela presença de um gene de resistência à mancha angular no grupo B8 (MIKLAS et al. 2006), que para a população CFM é correspondente ao grupo CFM1 (no qual foram alocados 9 marcadores RGA).

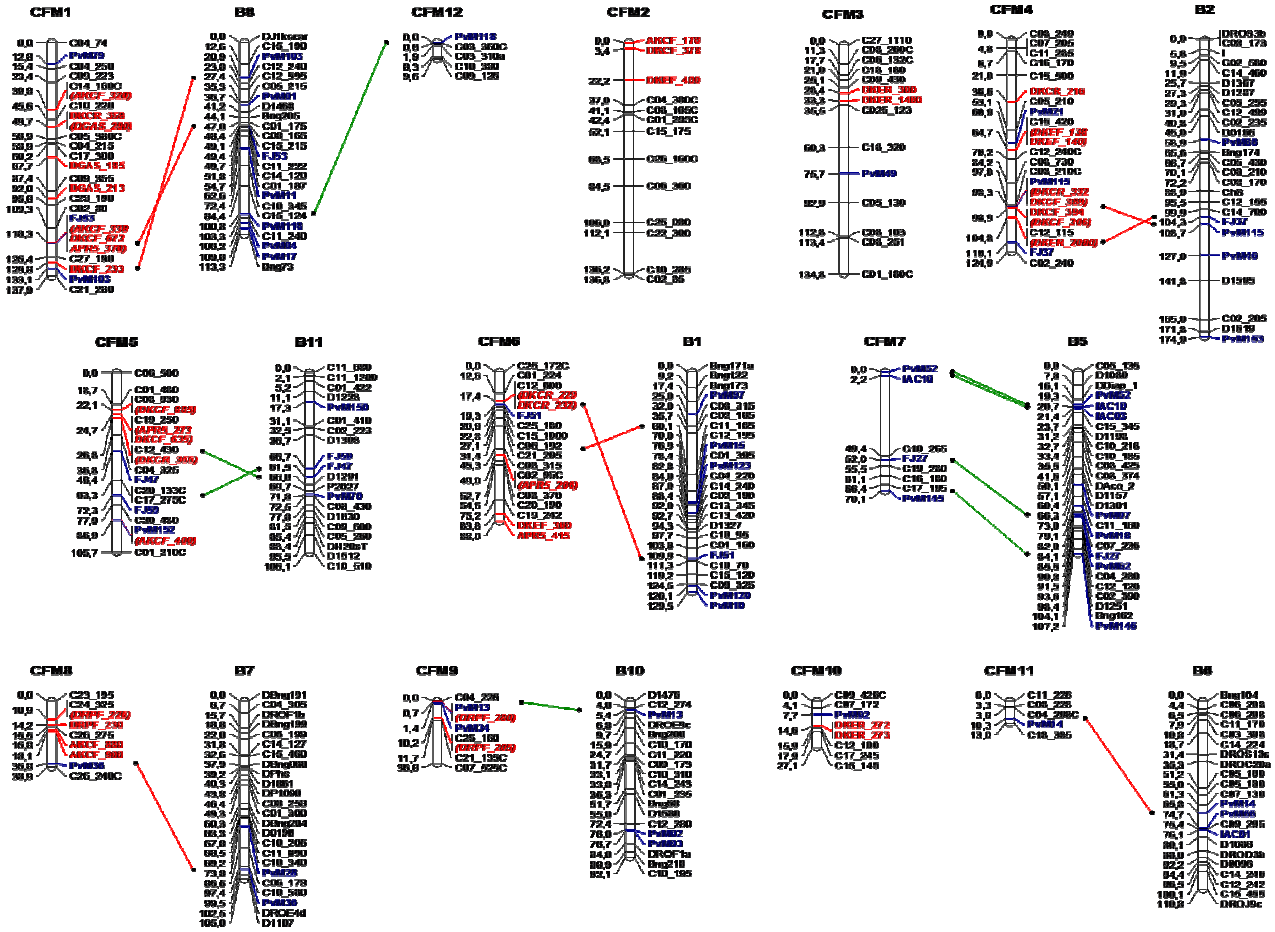

Figura 1. Mapa de ligação da população CFM e sua correspondência ao mapa da população BJ. Os locos realçados em azul são microssatélites e os locos em vermelho são RGA (os marcadores acessórios estão entre parênteses e em itálico).

Tabela 1 - Marcadores associados à reação ao oídio e à mancha angular na população de feijão derivada do cruzamento entre "Carioca" e "Flor de Mayo", usando o *software* QTL Cartographer.

Marcador mais próximo	Posição do QTL (cM)[1]	Grupo de ligação	LOD	R^2 (%)	*a*
		Oídio			
DKCR_216	6,0	CFM4	3,06	22,15	-0,57
PvM21	0,0	CFM4	6,24	29,80	-0,67
C24_325	4,0	CFM8	2,92	18,38	0,52
		Mancha angular			
PvM49	0,2	CFM3	3,15	16,71	-0,24
PvM21	0,0	CFM4	4,50	22,54	-0,28

[1]Distância do pico do QTL ao marcador mais próximo

Para a seleção assistida por marcadores é interessante que os QTL sejam estáveis nos diferentes ambientes. Neste trabalho, foram usadas médias gerais dos ambientes onde as doenças foram avaliadas; assim somente os QTL de efeitos gerais foram detectados e potenciais marcadores podem ser selecionados para o uso em seleção assistida, especialmente aqueles posicionados próximos aos picos dos QTL, como os apresentados na tabela 1. Aqui, usando um mapa de ligação razoavelmente saturado, três QTL para oídio e dois para mancha angular foram identificados. Estes resultados evidenciam a utilidade do mapa genético desenvolvido neste trabalho.

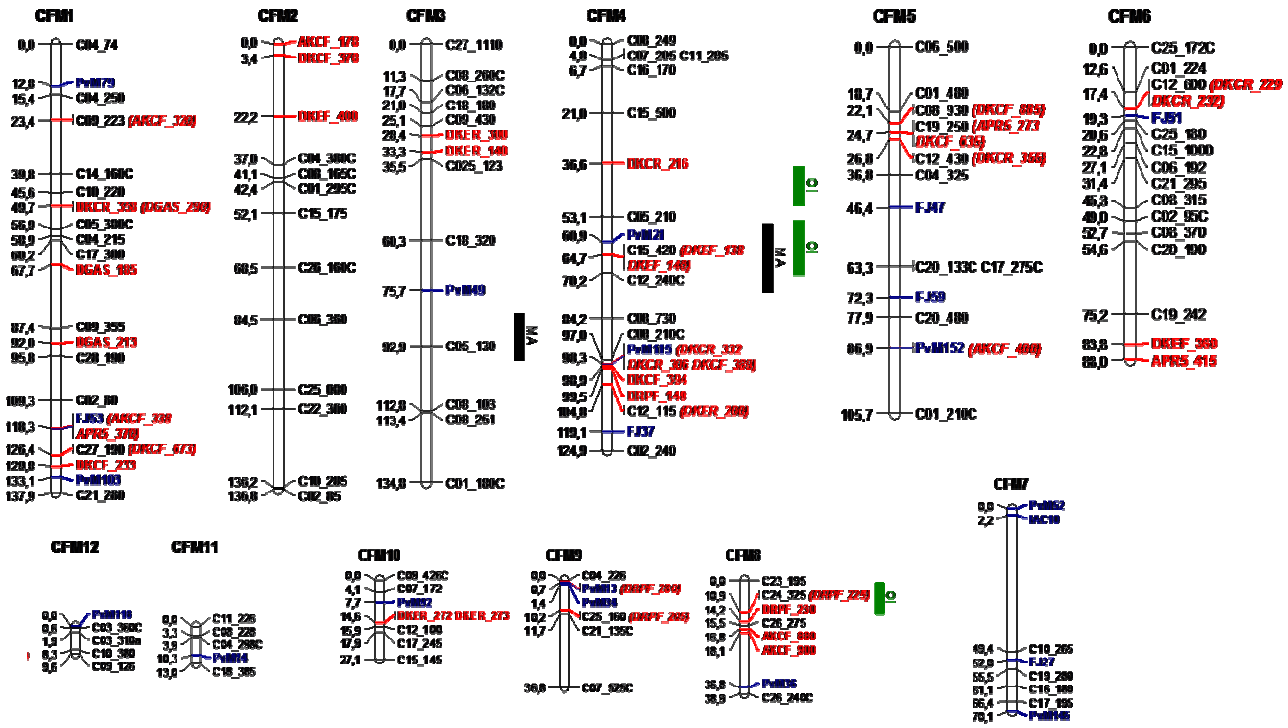

Figura 2. Mapa de ligação da população CFM. Os locos realçados em azul são microssatélites, os locos em vermelho são RGA (os marcadores acessórios estão entre parênteses e em itálico) e os demais são marcadores AFLP. Ao lado do mapa são mostrados os QTL detectados em suas posições mais prováveis (em verde: oídio e em preto: mancha angular).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FREYRE, R.; SKROCH P.W.; GEFFROY, V.; ADAM-BLONDON, A-F.; SHIRMOHAMADALI, 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 and Applied Genetics.** v 97, p. 847-856, 1998.

HANAI L.R.; CAMPOS T.; CAMARGO, L.E.A; BENCHIMOL, L.L.; SOUZA, A.P.; MELOTTO, M; CARBONELL, S.A.M; CHIORATTO, A.F.; CONSOLI, L.; FORMIGHIERI, E.F.; SIQUEIRA, M.V.B.M.; TSAI, S.M.; VIEIRA, M.L.C. Development, characterization and comparative analysis of polymorphism at common bean-SSR loci isolated from genic and genomic sources. **Genome**, v.50, p. 266-277, 2007.

LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHANSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M.J.; LINCOLN, S.E.; NEWBURG, L. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, v1, p.174-181, 1987.

MELO, L.C.; SANTOS, J.B.; FERREIRA, D.F. Mapeamento de QTLs para reação ao oídio e mancha-angular do feijoeiro em diferentes locais. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 37, n. 8, p. 1115-1126, 2002.

MIKLAS, P.N.; KELLY, J.D.; BEEBE, S.E.; BLAIR, M.W. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. **Euphytica,** v147, p. 105-131, 2006.

SANTINI, L.; HANAI, L.R.; CONSOLI, L.; PAULA, F.M.; FUNGARO, M.H. P.; VIEIRA, M.L.C. Mapeamento de RGAs (*Resistance Genes Analogs*) em feijão. **Resumos do 15º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP (SIICUSP)**, n.1140, São Paulo, 2007.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. V.; HORNES, M.; FRITERS, A.; POT, J.; PALEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, n.21, p. 4407-4414, 1995.

Área: Biotecnologia