

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES AFLP PARA MAPEAMENTO GENÉTICO EM FEIJÃO-CAUPI

Carolina Neves Correia¹, Roberta Lane de Oliveira Silva², José Ribamar Costa Ferreira Neto³, Juliana Carmem Queiroz Pedroza de Almeida⁴, Manassés Daniel da Silva¹, Maurisrael de Moura Rocha⁵, Francisco Rodrigues Freire Filho⁵, Ana Maria Benko-Iseppon⁶ e Ederson Akio Kido⁶

Resumo

O feijão-caupi apesar de ter sido uma das primeiras espécies investigadas por geneticistas, ainda recebe pouca atenção do ponto de vista científico e apresenta disponibilidade restrita de dados, quando comparado com outras leguminosas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver marcadores moleculares AFLP para uso em população de mapeamento (RIL) oriunda do programa de melhoramento da Embrapa Meio-Norte. Foram testadas 64 combinações de *primers* em amplificações via PCR com DNAs dos genitores para avaliação do grau de polimorfismo entre eles. Das combinações testadas, 55 amplificaram fragmentos e três não. O número de fragmentos amplificados foi em média 45 por combinação, com cerca de 10 polimorfismos, em média. A seleção de *primers* é etapa fundamental na construção de mapas de ligação, contribuindo para a otimização da genotipagem da progênie de mapeamento.

Introdução

Atualmente, o feijão-caupi é uma das 23 espécies cultivadas mais importantes. O Brasil é o segundo maior produtor dessa leguminosa, atrás somente da Nigéria. A produção nacional ocorre principalmente na região Nordeste, onde possui grande valor estratégico, por suas características potenciais de ampla variabilidade genética, capacidade de adaptação, potencial produtivo e eficiência na fixação biológica de nitrogênio, além de excelente valor nutritivo (FREIRE FILHO *et al.*, 1999). Apesar de ter sido uma das primeiras espécies investigadas por geneticistas, o feijão-caupi ainda recebe pouca atenção do ponto de vista científico e mundial, resultando em uma disponibilidade de dados ainda restrita, quando comparado a outras leguminosas (CHEN *et al.*, 2007). Isso decorre em parte, por ser uma cultura associada, majoritariamente, a cultivos de subsistência, principalmente em países pobres ou em desenvolvimento, apesar de exceções, como a produção norte-americana e o uso em conservas.

O melhoramento genético da cultura é feito de modo convencional, a partir de inúmeros cruzamentos e seleções em diferentes anos e locais. No Brasil, ele é realizado principalmente pela Embrapa Meio-Norte e empresas estaduais de pesquisa, como o IPA, em Pernambuco. Expansões da cultura para novas áreas, nas regiões Centro-Oeste e Norte, é uma realidade, bem com a necessidade de incorporação de novas tecnologias pelo melhoramento convencional. O mapeamento genético de genótipos oriundos de programas de melhoramento brasileiro, permitirá no futuro o uso da seleção assistida e a detecção de locos controladores de caracteres quantitativos (QTL) importantes para a cultura em nossas condições. Esse é um dos objetivos do Projeto NordEST, inserido no programa RENORBIO. O projeto dispõe de progênie com 221 linhas endogâmicas recombinantes (RIL), geradas pelo programa de melhoramento da Embrapa Meio-Norte, e resultantes do cruzamento dos genótipos IT85F-2687 e BR14-Mulato, portadores de reações contrárias às viroses CPSMV (*Cowpea*

¹ Graduandos de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, CEP 50670-901. E-mail: carolin.correia@gmail.com; manassesdaniel@gmail.com

² Departamento de Genética, Laboratório de Genética Molecular, UFPE. CEP 50670-90. Email: netocostaferreira@gmail.com

³ Bolsista DTI/CNPq. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, CEP 50670-901. E-mail: lane.roberta@gmail.com

⁴ Graduando de Biomedicina, Faculdade Maurício de Nassau, Recife, PE, CEP 51200-010. E-mail: julianaq2@hotmail.com

⁵ Pesquisadores, Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI, CEP 64006-220. E-mail: freire@cpamn.embrapa.br; mmrocha@cpamn.embrapa.br

⁶ Professores Adjuntos. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, CEP 50670-901. E-mail: ana.benko.iseppon@pq.cnpq.br; ederson.kido@gmail.com

Apoio financeiro: CNPq.

severe mosaic virus) e CABMV (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*), entre outras características de produção importantes. A progênie encontra-se atualmente em ensaio em campo para coleta de dados fenotípicos. Desta forma, o desenvolvimento de marcadores moleculares nesta progênie permitirá a confecção de um mapa genético importante para a cultura. Dentre os diversos marcadores, aqueles do tipo AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), cuja técnica é considerada uma das mais sensíveis para a detecção de polimorfismos ao longo dos genomas, apresentam-se de boa para elevada reprodutibilidade. Seu caráter multiplex, gerando um grande número de bandas informativas por reação, associado à cobertura ampla do genoma, será útil, portanto, na saturação do mapa de ligação. O objetivo deste trabalho foi desenvolver marcadores moleculares AFLP para uso nesta progênie de mapeamento.

Material e Métodos

Material vegetal e extração de DNA

Os DNAs genômicos dos genitores IT85F-2687 e BR14-Mulato foram isolados a partir de folhas frescas, de acordo com Weising *et al.* (1995).

Obtenção dos marcadores AFLP

A metodologia seguiu basicamente as recomendações do fabricante do kit AFLP 'Analysis System I' (Invitrogen Life Technologies). Pré-amplificações e amplificações seletivas foram realizadas em termociclador T1-Thermocycler (Biometra Inc.). As condições de amplificação seguiram as recomendações do kit. Os produtos de PCR, após adição de tampão formamida 98 % (v/v), 10 mM EDTA, 0,025% (p/v) de azul de bromofenol e 0,025 % (p/v) de xileno cianol, na razão 2:1, foram desnaturados (90°C por 5 min) e mantidos em gelo. Após pré-corridas de 30 minutos a 50 W, 10 µL das amostras desnaturadas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 7% (p/v) em condição desnaturante (7M de uréia), durante corrida de 2 h, a 65 W, em cuba vertical, tipo de seqüenciamento (C.B.S Scientific Co.). A visualização dos fragmentos foi feita via coloração com AgNO₃, conforme Bassam *et al.* (1991). Todas as 64 combinações de *primers* disponíveis no kit foram testadas com os DNAs dos genitores para avaliação do grau de polimorfismo, determinação das condições gerais de amplificação, e de visualização dos marcadores obtidos. Amostra sem DNA e contendo os componentes do mix foi incluída como controle negativo.

Resultados e Discussão

Das 64 combinações de *primers* disponíveis, três não amplificaram (NA; Tab.1) e as demais geraram um total de 2912 marcadores, sendo observados 663 polimorfismos entre os genitores. O número de fragmentos amplificados por combinação de *primers* variou de 7 a 75, com média de aproximadamente 48 por combinação, inferior àqueles observados por Ouédraogo *et al.* (2001), com média de 80 (variando de 58 a 166), mas revelados por autoradiografia, e Fang *et al.* (2007) com média de 64 (variando de 41 a 81). Parte da diferença é, portanto, creditada aos diferentes genótipos usados, às condições de corrida eletroforética e de revelação dos géis. Em média, foram observados cerca de 10 polimorfismos por combinação de *primers*, sendo que 235 polimorfismos consistiram de presença de banda apenas em BR14-Mulato, com ausência no outro genitor (aqui considerados como do tipo **a**), enquanto que 428 apresentaram presença de banda apenas em IT85F-2687 (do tipo **b**). Em 48 das 64 combinações de *primers*, o número de polimorfismos do tipo **a** foi inferior ao tipo **b** e em somente duas combinações o número de polimorfismos foi o mesmo. Essa menor quantidade de polimorfismos entre os genitores (23% dos fragmentos amplificados) em comparação aos monomorfismos observados (77%) é reflexo da base genética comum, compartilhada por estes e muitos dos materiais do melhoramento (HEINZ, 1987), especialmente aqueles provenientes de mesmo programa de melhoramento. A importância dos polimorfismos reflete na qualidade de informação proporcionada pelos diferentes tipos de marcadores (LESPINASSE *et al.*, 2000). No geral, as

melhores combinações para obtenção de polimorfismos, dentre os *primers* direcionados para o sítio de *EcoRI*, foram AGC, ACC e ACG, enquanto que para *MseI* foram CAT, CTA e CAA. Especificamente, as melhores combinações para obtenção de polimorfismos foram ACC / CAT (43), AGC / CAA (28), AGG / CTT (26), ACC / CAA e AGC / CTC (25 cada) (Tabela 1), estando de acordo, no geral, com os resultados obtidos por Ouédraogo *et al.* (2001), com autoradiografia. Um exemplo de gel obtido com algumas das combinações pode ser vista na Figura 1. O número de fragmentos amplificados, tendo um dos *primers* ACA (derivado de *EcoRI*) foi considerado pequeno (máximo de 38), independente da combinação do outro *primer* (relativo ao sítio de *MseI*), enquanto que para ACT, várias combinações amplificaram menos que 10 polimorfismos (Tab.1). Combinações mais ou menos eficientes são esperadas, por isso a análise prévia da genotipagem dos genitores é importante, além disso problemas relacionados à amplificação (pré-amplificação ou amplificações seletivas) podem ter ocorrido.

Conclusões

A seleção de *primers* para a genotipagem de progênies e construção de mapas de ligação deve ser feita levando-se em consideração os resultados de um teste de *primers* prévio e os trabalhos existentes na literatura. Preferencialmente, devem ser escolhidos os *primers* que apresentarem maiores polimorfismos entre os genitores. Cerca de 600 polimorfismos do tipo AFLP poderão ser estudados em segregação na população de mapeamento em questão.

Referências

- BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.E.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry.*, 1991. vol.196, issue 1, p. 80-83.
- CHEN, X.; LAUDEMAN, T.W.; RUSHTON, P.J.; SPRAGGINS, T.A.; TIMKO, M.P. CGKB: an annotation knowledge for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) methylation filtered genomic genespace sequences. *BMC Bioinformatics.*, 2007. v. 8, p. 129-137.
- FANG, J.; CHAO, C.T.; ROBERTS, P.A.; Ehlers, J.D. Genetic diversity of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] in four West African and USA breeding programs as determined by AFLP analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution.*, 2007. v. 54, p. 1197–1209.
- FREIRE FILHO, F.R.; CARDOSO, M.J.; RIBEIRO, V.Q.; ATHAYDE SOBRINHO, C.; SILVA, P.H.S. Introdução, avaliação e utilização de germoplasma de feijão macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Relatório Técnico Anual da Unidade de Execução de Âmbito Estadual de Teresina 1990.*, 1991. Teresina, p. 126-131.
- HEINZ, D.J. Sugarcane Improvement: Current Productivity and Future Opportunities. *Proceedings of the International Sugarcane Breeding Workshop.*, 1987. COPERSUCAR, São Paulo.
- LESPINASSE, D.; RODIER-GOUD, M.; GRIVET, L.; LÉCONTE, A.; LEGNATE, H.; SEGUIN, M. A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp) based on RFLP, AFLP, microsatellite, and isozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics.*, 2000. v. 100, p. 127-138.
- OUÉDRAOGO, J.T.; MAHESHQARI, V.; BERNER, D.K.; ST-PIERRE, C.A.; BELZILE, F.; TIMKO, M.P. Identification of AFLP markers linked to resistance of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) to parasitism by *Striga gesnerioides*. *Theoretical and Applied Genetics.*, 2001. v. 102, p. 1029-1036.
- WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; KAHL, G. DNA fingerprinting in plants. *Boca Raton.*, 1995. USA. 322 p.

Tabela 1. Fragmentos polimórficos entre os genitores BR14 mulato e IT85F-2687 em relação ao total de fragmentos obtidos com combinações de *primers* AFLP (bases seletivas que iniciam com A são referentes aos *primers* para *EcoRI* e aqueles com C são de *MseI*).

Bases Seletivas	CAA	CAC	CAG	CAT	CTA	CTC	CTG	CTT
AAC	9/64	9/58	6/47	18/59	7/44	NA	5/25	3/61
AAG	9/72	13/75	7/57	6/49	13/62	5/36	4/64	0/41
ACA	6/19	4/13	0/8	NA	5/7	0/10	1/12	6/38
ACC	25/47	13/47	3/15	43/68	16/69	11/48	16/62	13/71
ACG	9/61	11/44	11/44	17/61	20/56	13/56	8/48	15/30
ACT	2/29	4/26	4/49	4/37	22/56	7/39	3/56	NA
AGC	28/45	13/47	17/41	13/45	13/64	25/70	15/42	8/37
AGG	11/64	17/63	7/46	18/66	11/67	9/65	6/48	26/62

NA – Combinações que não amplificaram

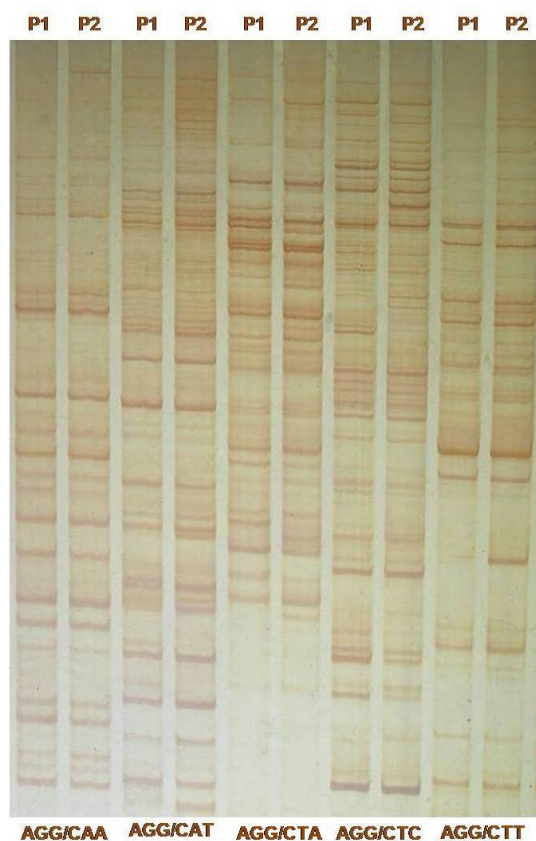


Figura 1. Padrão de amplificação dos genitores BR14 mulato (P1) e IT85F-2687 (P2) com combinação de *primers* AFLP (somente as três bases seletivas estão representadas para *EcoRI/MseI*, respectivamente).