

# MAPA GENÉTICO DE FEIJÃO-CAUPI COM MARCADORES DERIVADOS DE MARCADORES GÊNICOS E NÃO CODIFICANTES

Lidiane Lindinalva Barbosa Amorim<sup>1</sup>, Alberto Vinicius Casimiro Onofre<sup>1</sup>, José Ribamar Costa Ferreira Neto<sup>2</sup>, Roberta Lane Oliveira da Silva<sup>2</sup>, Carolina Neves Correia<sup>2</sup>, Manasses Daniel da Silva<sup>2</sup>, Reginaldo de Carvalho<sup>3</sup>, Ralf Horres<sup>4</sup>, Márcio de Carvalho Moretzsohn<sup>5</sup>, Ilza Maria Sittolin<sup>6</sup>, Maurisrael de Moura Rocha<sup>6</sup>, Francisco Rodrigues Freire Filho<sup>6</sup>, Semíramis Jamil Hadad Monte<sup>7</sup>, Valesca Pandolfi<sup>2</sup>, Genira Pereira de Andrade<sup>8</sup>, Gilvan Pio Ribeiro<sup>8</sup>, Éderson Akio Kido<sup>2</sup> e Ana Maria Benko Iseppon<sup>9</sup>

## Resumo

O presente estudo buscou a construção de um mapa genético de feijão-caupi, incluindo genes de resistência ao vírus do mosaico severo do caupi (CPSMV), bem como sua associação a marcadores moleculares. Para isso, uma população de 94 RILs F<sub>6</sub>, segregando para reação ao vírus foi genotipada a partir de quatro categorias de marcadores: SSR-EST, ISSR, DAF e CAPS. Adotando o LOD de 2,0 e uma frequência máxima de recombinação de 0,40, foram mapeados 53 locos em 11 grupos de ligação cobrindo uma distância de recombinação total de 716,2 cM. O gene de resistência ao CPSMV foi mapeado no grupo de ligação 1, entre dois marcadores SSR-EST, a 6,1 cM do primeiro e 24,1 do segundo. As etapas seguintes envolvem o mapeamento fino desta região, visando identificar marcadores mais proximamente ligados ao gene de resistência ao CPSMV para uso em programas de seleção assistida por marcadores moleculares, no melhoramento do feijão-caupi.

## Introdução

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] destaca-se mundialmente como um dos produtos agrícolas de alta expressão econômica, social e nutricional, sendo um alimento básico tanto em países subdesenvolvidos quanto em desenvolvimento, das regiões tropicais e subtropicais, particularmente da África e na América do Sul. As doenças que acometem a cultura do feijão-caupi são as principais causas da baixa produtividade no Brasil, notadamente as de etiologia viral. O vírus do mosaico severo do caupi (*Cowpea severe mosaic virus*, CPSMV) e os mosaicos de potyvírus podem causar perda acima de 50% na produção (PIO-RIBEIRO; ASSIS; ANDRADE, 2005).

O processo de seleção de genótipos resistentes pelas técnicas convencionais é relativamente demorado e laborioso, dependendo de condições ambientais adequadas. Assim, os melhoristas podem adotar qualquer aplicação de marcadores moleculares que possam melhorar a eficiência de seleção, diminuindo custos em programas de melhoramento, tais como o desenvolvimento de mapas de ligação gênica e identificação de genes controlando características qualitativas (COSTA *et al.*, 2008). Contudo, a grande maioria dos estudos dessa natureza tem sido realizada em países da África e nos Estados Unidos, utilizando acessos adaptados a condições ambientais diferentes das encontradas no Brasil. O presente trabalho teve como objetivo construir um mapa genético de feijão-caupi baseado em marcadores moleculares, mediante a análise de uma população segregante F<sub>6-7</sub> obtida pela Embrapa Meio-Norte a partir do cruzamento dos genitores BR14-Mulato e IT85F-2687.

<sup>1</sup> Alunos do Doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, CEP 50670-420. Email: lidiane.amorim@gmail.com; vinicius.alberto@gmail.com

<sup>2</sup> Departamento de Genética, Laboratório de Genética Molecular, UFPE. Email: nederson.kido@gmail.com

<sup>3</sup> Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, CEP 52171-900.

<sup>4</sup> GenXpro, Frankfurt Main, Alemanha. Email: horres@genxpro.de

<sup>5</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, CP 02372. Email: marciocm@cenargen.embrapa.br

<sup>6</sup> Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI, CEP 64006-220, CP: 001. ilza@cpamn.embrapa.br; mmrocha@cpamn.embrapa.br

<sup>7</sup> Universidade Federal do Piauí, Campus Petrônio Portela bloco 16. CEP 64049-550, Teresina - PI, Brasil.

<sup>8</sup> Departamento de Agronomia, UFRPE. Email: genira@ufrpe.br, gilvan@ufrpe.br;

<sup>9</sup> Coordenadora Projeto NordEST/RENORBIO, Departamento de Genética, UFPE. Email: ana.benko.iseppon@pq.cnpq.br.

Apoio Financeiro: CAPES, FACEPE, CNPq, RENORBIO/FINEP/BNB

## Material e Métodos

Um isolado do CPSMV foi inoculado mecanicamente nos parentais e em 221 linhas endogâmicas recombinantes (RILs) da geração F<sub>7</sub> via extrato vegetal tamponado, contendo tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0 acrescido de 0,1% de sulfito de sódio na proporção de 1:10 (p/v), utilizando-se Celite e Carborundum 600 *mesh* como abrasivos. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação por 30 dias para observação de reações sintomatológicas e avaliação da presença do vírus por teste sorológico de dupla difusão em ágar, usando anti-soro específico para o mesmo.

O isolamento do DNA genômico dos parentais e das 94 RILs F<sub>6</sub> foi realizado usando-se folhas frescas, ou congeladas em freezer a -80°C, segundo a metodologia descrita em Weising *et al.* (1995). A geração de marcadores DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) seguiu metodologia descrita por Simon *et al.* (2007). As reações de ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*) foram conduzidas em um volume final de 20 µL contendo: 0,7U de enzima 'Taq DNA polimerase', tampão da enzima 1 X, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 50 µM de *primer* e 25 ng de DNA genômico. O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento do *primer* a 49,7-58°C (dependendo do *primer*) por 35 seg e extensão a 72°C por 2 min, seguida de extensão final por 7 min a 72°C. As reações foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,8%, corado com brometo de etídio a 0,5 µg/mL.

Os marcadores microssatélites (SSR) utilizados neste trabalho foram oriundos de: (1) sequências expressas - ESTs, de *Phaseolus vulgaris* (L.), pertencentes ao banco de dados TIGR *Plant Transcript Assemblies* (2) ESTs originadas de ensaios sob estresse salino e reação a viroses em diferentes bibliotecas de feijão-caupi, pertencentes ao projeto NordEST; (3) sequências de feijão-caupi de regiões ricas em genes, pertencentes ao banco de dados *Cowpea Genomics Knowledge Base*. Os motivos SSR perfeitos foram identificados com a ajuda do software TRA (BILGEN; KARACA; INCE, 2004). Após essa etapa, pares de *primers* foram desenhados para flanquear essas regiões com ajuda do programa Primer3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000). Essas reações apresentaram volume total de 20 µL [20 ng de DNA genômico, 1x PCR buffer, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 µM de dNTPs, 0,15 µM de cada *primer* e 0,5 U de Taq DNA polimerase], e desnaturação inicial de 5 min, a 95 °C, seguida de 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 54 °C e 1 min a 72 °C, com extensão final de 10 min a 72° C. Ao final, as amostras foram misturadas com igual volume de tampão de carregamento e desnaturadas (95 °C, por 5 min). Os fragmentos amplificados foram separados em gel de acrilamida 7% (p/v) em condição desnaturante (7 M de uréia), sendo a visualização dos amplicons realizada após coloração com nitrato de prata.

Além disso, foram incluídos *primers* específicos desenvolvidos a partir de bibliotecas de EST de leguminosas do projeto *Grain Legume Integrated Project* e *primers*-âncora (Legs) desenvolvidos na Universidade de Aarhus, na Dinamarca, pelo grupo do Dr. Jens Stougaard. Esses marcadores geraram bandas únicas monomórficas e foram então digeridos com várias endonucleases para detecção de polimorfismo nos parentais. Com isso, foi possível gerar marcadores CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*). As análises de ligação foram feitas usando-se o programa Mapmaker, versão 2.0 (LANDER *et al.*, 1987). Um LOD score mínimo de 2,0 e uma fração de recombinação máxima ( $\theta$ ) de 0,40 foram utilizados como parâmetros para o estabelecimento dos grupos de ligação, usando-se a função "group".

## Resultados e Discussão

Foi possível distinguir com facilidade os indivíduos suscetíveis (n=137) dos resistentes (n=84), uma vez que os primeiros apresentaram sintomas inequívocos de mosaico severo, bolhosidade nas folhas e necrose nos caules, enquanto que os indivíduos resistentes não apresentaram sintomas. Em testes de dupla difusão em ágar a formação de linha de precipitação foi observada apenas nos indivíduos suscetíveis, claramente identificados pelos sintomas descritos.

No que se refere ao mapa, a presença de 11 grupos de ligação corresponde ao anteriormente reportado por Ouédraogo *et al.* (2002), sendo também encontrado em outras espécies do gênero *Vigna*, como observado em *V. mungo*, e *V. angularis*. O estudo do número cromossômico somático de espécies do gênero *Vigna*, incluindo o feijão-caupi, tem sido feito por vários autores, e o número mais

frequentemente encontrado tem sido  $2n=22$ . Verifica-se, portanto, que o número de grupos de ligação é igual ao número haplóide de cromossomos do feijão-caupi.

Os 53 locos mapeados cobriram uma distância de recombinação total de 716,2 cM, a qual apresenta-se menor que a encontrada em outros mapas genéticos já construídos, fato justificado pelo número reduzido de marcadores. Os 11 grupos de ligação variaram em tamanho de 11,0 a 191,6 cM (Fig. 1). O grupo 1 é o que apresenta maior número de marcadores, sendo o grupo que inclui o gene de resistência a CPSMV. A distribuição dos intervalos entre dois marcadores adjacentes variou entre 0 e 50 cM, com média de 18 cM. A distância entre alguns marcadores no grupo de ligação 1, 3 e 5 foi muito menor que a média observada se levado em consideração todo o conjunto de dados.

No mapa gerado, observa-se também uma clusterização (agrupamento) de marcas, principalmente no que se refere aos marcadores ISSR, especialmente nos grupos de ligação G1, G2, G3 e G5. Observações similares têm sido feitas em mapas gerados para diferentes leguminosas, como por exemplo, em grão-de-bico (WINTER *et al.*, 2000), onde os autores, ao lado da clusterização, destacam a subclusterização de marcadores do mesmo tipo, incluindo marcadores do tipo SSR, DAF e AFLP. Deve-se salientar que os marcadores semi-arbitrários do tipo ISSR amplificam preferencialmente áreas de DNA repetitivo não codificantes, as quais habitualmente apresentam menores taxas de recombinação.

Os marcadores CAPS e SSR-EST tenderam a mapear em agrupamentos, sugerindo que em feijão-caupi genes de resistência encontram-se fisicamente clusterizados, tal como observado em outras plantas cultivadas, incluindo leguminosas como grão-de-bico. A vantagem de se utilizar marcadores CAPS derivados de marcadores gênicos de única cópia como os marcadores Legs, é que é possível transferir informações dos mapas de outras leguminosas através do mapeamento comparativo, enriquecendo assim o mapa de feijão-caupi. Os marcadores derivados da biblioteca de EST construída a partir de duas variedades de feijão-caupi com sensibilidade contrastante ao estresse salino (VUPIST02011C02 e VUPEST0814E05) foram posicionados próximos à região de resistência ao CPSMV. Essa observação reforça a utilidade do uso de genes candidatos para desenvolvimento de marcadores e identificação de regiões genômicas que controlam características de interesse.

O presente mapa será útil na alocação de marcadores morfológicos em avaliação e na identificação de QTL relacionados a características agronomicamente importantes, incluindo a resistência a doenças, assim como para estudos genéticos e evolutivos.

## Referências

BILGEN, M.; KARACA, M.; INCE, A. G. A software program combining sequence motif searches with keywords for finding repeats containing DNA sequences. *Bioinformatics*, Oxford, v. 20, p. 3379-3386. 2004.

COSTA, F. R.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; PINHEIRO, J. B.; KIIHL, R. F. S.; CALVO, E. S.; DI MAURO, A. O. Marcadores RAPD para detecção de resistência à ferrugem-asiática-da-soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1733-1739, 2008.

CGKB Cowpea Genomics Knowledge Base. <http://cowpeagenomics.med.virginia.edu/CGKB>

GLIP Grain Legume Integrated Project. <http://bioweb.abc.hu/cgi-mt/pisprim/pisprim.pl>

LANDER, E. S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, L.; BARLOW, A.; DALY, M. J.; LINCOLN, S. E.; NEWBURG, S. E. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, Austin, v. 1, p. 174-181. 1987.

OUÉDRAOGO, J. T.; GOWDA, B. S.; JEAN, M.; CLOSE, T. J.; EHLERS, J. D.; HALL, A. E.; GILLASPLE, A. G.; ROBERTS, P. A.; ISMAIL, G.; BRUENING, G.; GEPTS, P.; TIMKO, M. P.; BELZILE, F. J. A. improved genetic map for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) combining AFLP, RFLP, RAPD, biochemical makers end biological resistance traits. *Genome*, v. 45, p.175-188. 2002.

PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS F. M.. ANDRADE, G. P. Doenças do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: KIMARI, H., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds.) *Manual de Fitopatologia 2: doenças das plantas cultivadas*. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres. v. 2, 2005. p. 215-222.

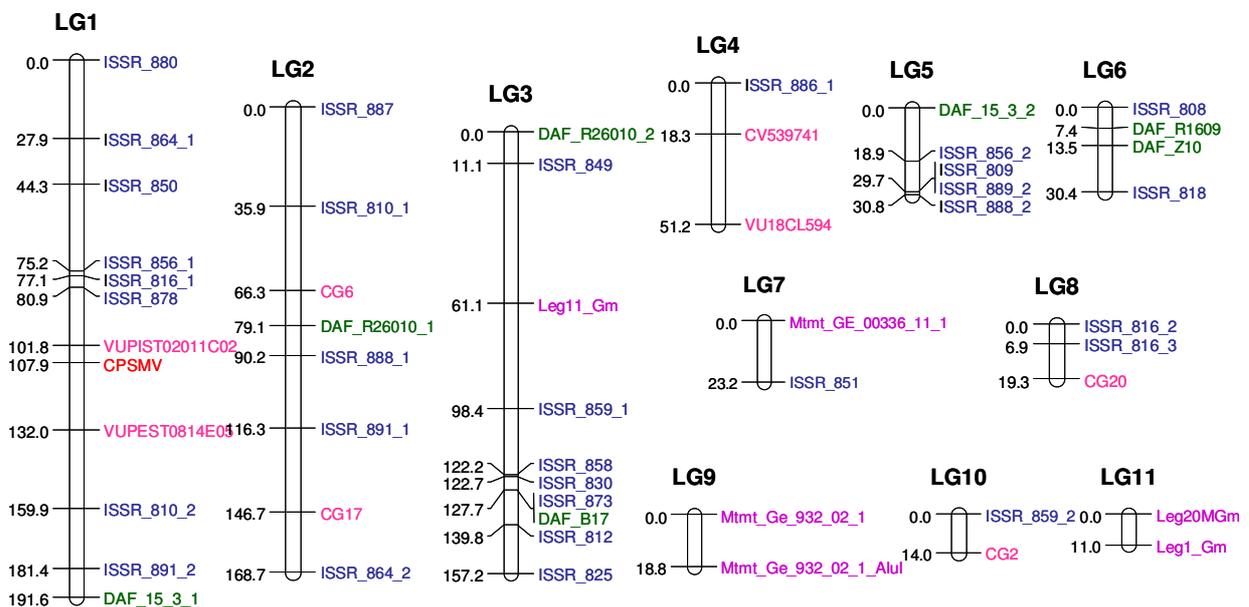
ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Ed.). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press, 2000. p. 365-386.

SIMON, M. V.; BENKO-ISEPPON, A. M.; RESENDE, L. V.; WINTER, P.; KAHL, G. Genetic diversity and phylogenetic relationships in *Vigna Savi* germplasm revealed by DNA amplification fingerprinting (DAF). *Genome*, Ottawa, v. 50, p. 538-547. 2007.

TIGR Plant Transcript Assemblies data base. <http://plantta.tigr.org>

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; KAHL, G. *DNA fingerprinting in plants*. Boca Raton, USA. 1995. 322 p.

WINTER, P.; BENKO-ISEPPON, A. M.; HÜTTEL, B.; RATNAPARKHE, M.; TULLU, A.; SONNANTE, G.; PFAFF, T.; TEKEOGLU, M.; SANTRA, D.; SANT, V. J.; RAJESH, P. N.; KAHL, G.; MUEHLBAUER, F. J. A linkage map of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome based on recombinant inbred lines from a *C. arietinum* x *C. reticulatum* cross: localization of resistance genes for *Fusarium* wilt races 4 and 5. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 101, p.1155-1163. 2000.



**Figura 1.** Mapa de ligação para o feijão-caupi obtido através da análise de 94 linhas endogâmicas recombinantes F<sub>6-7</sub> geradas a partir do cruzamento entre BR14-Mulato e IT85F-2687. Os nomes dos marcadores são mostrados à direita e as distâncias absolutas em cM (centimorgan) são mostradas à esquerda. Os marcadores ISSR encontram-se representados em azul; verde, rosa e lilás indicam marcadores DAF, SSR-EST e CAPS, respectivamente. O marcador gerado pela segregação para resistência ao *Cowpea severe mosaic virus* está representado pela sigla CPSMV, destacada em vermelho. Os 11 grupos de ligação estão ordenados de acordo com seu tamanho.