

MAPEAMENTO GENÉTICO DA RESISTENCIA A MURCHA DO FUSARIO EM FEIJOEIRO COMUM

Thiago Willian Almeida Balsalobre¹, Danilo Elton Evangelista¹, Larissa Prado da Cruz¹, Luis Guilherme Virgílio Fernandes¹, Fernanda Zatti Barreto¹, Joaquim Geraldo Cáprio da Costa² e Monalisa Sampaio Carneiro³

Resumo

Este trabalho objetivou identificar marcadores microssatélites ligados a genes de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em feijoeiro comum. Foram utilizadas duas linhagens (FT Tarumã e Macanudo) contrastantes em níveis de resistência à doença para obter a geração F₂, e posteriormente famílias F_{2:3}. A genotipagem com os marcadores microssatélites foi realizada na geração F₂, e fenotipagem para resistência em casa de vegetação nas famílias F_{2:3}. Foi adotada a estratégia de BSA (*Bulked Segregant Analysis*). Um total de 167 marcadores microssatélites foram avaliados nos genitores e nos *bulks* resistentes e suscetíveis. Marcadores potencialmente ligados a genes de resistência, identificados pelo método BSA, foram avaliados em cerca de 100 indivíduos segregantes para confirmar a existência de ligação. Dois marcadores, *PvM 066* e *PvM 127*, mostraram-se significativamente associados ($p < 0,000266$ e $p < 0,0037571$).

Introdução

O feijoeiro comum é a principal leguminosa utilizada na alimentação humana, apresenta grande importância econômica e social, sendo um elemento importante como fonte protéica na dieta de enorme parcela da população mundial. (FERREIRA, 2006).

No Brasil, o feijão é cultivado tanto por pequenos agricultores, quanto por empresários rurais altamente tecnificados. Embora o Brasil seja o maior produtor e consumidor mundial de feijão, ainda apresenta baixa produtividade, devido, dentre outros fatores, a ocorrência de doenças, entre elas a murcha ou amarelecimento de fusário causada por *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, que provoca danos econômicos consideráveis à produção (CÂNDIDA, 2008).

Os sintomas da doença manifestam-se por perda de turgescência, amarelecimento, queda progressiva de folhas e escurecimento dos vasos, podendo variar consideravelmente em intensidade, dependendo da reação da cultivar, severidade de infecção e condições de ambiente (ABAWI, 1989). Pesquisas têm mostrado que este patógeno apresenta pouca variação genotípica e que a herança da resistência genética da planta é controlada por poucos genes (SALGADO; SCHWARTZ; BRICK, 1995; BALSALOBRE *et al.*, 2008), o que facilita na obtenção de cultivares superiores pela transferência de alelos de resistência de fontes não comerciais e, muitas vezes, não adaptadas, para cultivares elite (ALZATE-MARIN *et al.*, 2005).

O estudo de caracteres quantitativos vem sendo realizado por meio de estimativas de parâmetros genéticos obtidos a partir da mensuração fenotípica, ou seja, tais estimativas representam o somatório dos efeitos dos locos segregando para o caráter. A principal alternativa para o conhecimento do número aproximado de locos atuando no controle genético dos caracteres quantitativos, de como esses locos encontram-se distribuídos no genoma e qual a intensidade dos seus efeitos, é estudá-los indiretamente, por meio da associação com marcadores genéticos (PEREIRA, 2006).

O objetivo deste trabalho foi o mapeamento de genes associados à resistência à murcha de fusário em feijoeiro comum, utilizando marcadores microssatélites.

1. Graduação em Biotecnologia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, CEP 13600-970. E-mail: thiago2pierre@hotmail.com; daniloe@hotmail.com; larissa.p.cruz@hotmail.com; luisgui530@hotmail.com; fernandazatti@hotmail.com

2. Pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antonio de Goiás, Goiás, CEP 75375-000. E-mail: caprio@cnpaf.embrapa.br

3. Professora Adjunto do Departamento de Biotecnologia Vegetal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, CEP 13600-970. E-mail: monalisa@cca.ufscar.br

Material e Métodos

Material vegetal

O plantio e inoculação foram conduzidos em casa de vegetação na Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antonio de Goiás, Goiás. A extração do DNA e as análises com os marcadores microssatélites foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de São Carlos, *campus* de Araras, São Paulo. Como genitor resistente ao isolado FOP 46 foi utilizada a cultivar FT Tarumã, e como suscetível a cultivar Macanudo (RAVA; SARTORATO; COSTA, 1996)

Cruzamento controlado foi realizado entre FT Tarumã e Macanudo para obter a geração F_1 . Os indivíduos dessa geração foram autofecundados, originando a geração F_2 . Da geração F_2 , os indivíduos foram autofecundados produzindo 120 famílias $F_{2,3}$. Uma solução contendo esporos do fungo foi utilizada para inoculação artificial em casa de vegetação das famílias de feijoeiro da geração $F_{2,3}$. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com duas repetições, sendo que cada uma foi composta por seis indivíduos $F_{2,3}$. Os tratamentos foram constituídos por 120 famílias $F_{2,3}$, que foram avaliadas quanto a resistência a murcha do fusário com base na escala diagramática com notas de severidade que variam de 1 (0% de tecido afetado) a 9 (75% de tecido afetado) (CÂNDIDA, 2008; BALSALOBRE *et al.*, 2008). Com base na avaliação da resistência, para cada cruzamento foram constituídos *bulks* resistente e suscetível, ou seja, genótipos com notas de 1 a 3 formaram o *bulk* resistente e, de 7 a 9 o *bulk* susceptível.

Genotipagem com marcadores microssatélites

O DNA foi extraído a partir de 250 mg de folhas frescas de acordo com Hoisington, Khairallah, Gonzalez-de-Leon (1994). A quantificação das amostras de DNA foi realizada em gel de agarose 1%, comparando-as com uma série de concentrações conhecidas do DNA (20, 40, 80 e 160 ng) do fago λ , visualizadas através da coloração com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g/ml}$) sob luz ultravioleta.

Os genitores e os seus respectivos *bulks* foram avaliados quanto ao polimorfismo para 167 locos microssatélites (destes 157 foram gênicos e 10 genômicos). Os locos que apresentaram polimorfismo foram genotipados na população $F_{2,3}$. As reações de amplificação foram feitas em volume final de 15 μl , contendo 15 ng de DNA molde, 0,50 unidade de *Taq* DNA polimerase (Fermentas), 1X tampão da *Taq*, 200 μM de cada dNTP, 0,25 μM de *primer forward*, 0,25 μM de *primer reverse*, 2500 μM de MgCl_2 e água Milli-Q. As condições de amplificações foram estabelecidas conforme Hanai *et al.* (2007). As reações foram realizadas no termociclador Applied biosystems, modelo 9700 PCR System.

Após a amplificação, cada amostra recebeu 7,5 μl de tampão de carregamento e em seguida foi submetida à desnaturação de 94 °C por 5 minutos. A eletroforese dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de poliacrilamida 6,5% em cuba vertical Sequi Gen GT da BioRad durante 2 horas e 30 minutos sob potência constante de 70 W. A visualização das bandas foi realizada em solução de nitrato de prata conforme descrito por Creste *et al.* (2001).

Análises Estatísticas

Análises estatísticas para verificação de ligação entre locos marcadores e genes de resistência a *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, foram realizadas por meio de análise de variância, onde genótipos marcadores para cada loco marcador foram considerados variáveis independentes e a severidade da doença, variável dependente (EDWARDS; STUBER; WENDEL, 1987). Testes de regressão linear foram utilizados para estimar as magnitudes das variâncias fenotípicas para resistência explicadas pelas associações genes-marcadores (R^2).

Resultados e Discussão

Dos 167 locos marcadores testados, 157 mostraram-se não informativos, ou seja, não revelaram polimorfismos entre as linhagens genitoras. Dos 10 locos informativos, sete revelaram polimorfismo entre os segregantes agrupados (*PvM 037*, *PvM 115*, *PvM 127*, *PvM 066*, *PvM 118*, *FJ 51* e *FJ 55*),

demonstrando potencial de estarem ligados a QRL (*Quantitative Resistance Loci*) a *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fig. 1).

Dos sete locos marcadores analisados, dois (*PvM066* e *PvM127*) mostraram associação significativa ($p < 0,000266$ e $p < 0,037571$, respectivamente) com resistência a *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Para estes marcadores, o restante da população segregante também foi genotipada (99 indivíduos para o marcador *PvM 066* e 100 indivíduos para o marcador *PvM 127*) e o teste de regressão linear foi aplicado para verificar a magnitude do efeito fenotípico da ligação entre marcador/QRL. A associação entre o loco marcador *PvM 066* e o QRL explicou 15,61 % da variação fenotípica para resistência verificada entre as plantas F_2 , ao passo que a associação com *PvM 127* explicou 6,54% (Tab. 1).

Na associação *PvM 127/QRL* a severidade média para a classe genotípica homocigota para alelos do genitor resistente foi de 5,34, enquanto que aquela homocigota para alelos do genitor suscetível foi de 6,20. Para a classe heterocigota, a média foi de 5,43, não diferindo estatisticamente da primeira classe. Assim, o alelo do genitor resistente contribuiu em 12,4 % na redução da severidade da doença quando em heterocigose no loco em questão. Para a associação *PvM 066/QRL*, a severidade média para a classe genotípica homocigota para alelos do genitor resistente foi de 4,52, ao passo que aquela homocigota para alelos do genitor suscetível foi de 5,20, o que representa uma redução de 13 % na severidade da doença quando em heterocigose no loco em questão.

Neste trabalho, foi identificada uma região genômica associada à resistência à *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, por meio de sua ligação a dois marcadores microssatélites. Este trabalho representa um primeiro relato da utilização destes marcadores para o mapeamento da murcha do fusário em feijoeiro comum. Microssatélites são descritos na literatura como marcadores altamente polimórficos. Embora isso seja comprovado em muitos trabalhos (HANAI *et al.*, 2008), tal tendência não foi verificada neste estudo. Apenas 5,98 % dos locos marcadores testados revelaram diferenças alélicas entre as linhagens genitoras. Esse fato pode ter ocorrido devido a proximidade genética (ambos de origem Mesoamericanos) com *backgrounds* genéticos oriundos do mesmo tipo de grão comercial (carioca).

Conclusão

Embora a taxa de polimorfismo tenha sido baixa no cruzamento analisado, dois marcadores, *PvM 066* e *PvM 127*, mostraram-se significativamente associados ($p < 0,000266$ e $p < 0,0037571$) a genes de resistência a *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, permitindo, assim, a utilização destes em programas de melhoramento genético do feijoeiro comum.

Referências

ABAWI, G. S. Root rots. In: SCHWARTZ, H. F.; PASTOR CORRALES, M. A. (Eds.). *Bean production problems in the tropics*. Cali: CIAT, 1989. p. 105-157.

ALZATE-MARIN, A. L. *et al.* Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.30, n. 4, p. 333-342, ago. 2005.

BALSALOBRE, T. W. A.; CÂNDIDA, D. V.; EVANGELISTA, D. E.; COSTA, J. G. C.; CARNEIRO, M. S. Controle genético da resistência a Murcha-de-Fusário em feijoeiro comum. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 9., 2008, Campinas. *Anais...* . Campinas: ..., 2008. p. 01. CD-ROM.

CÂNDIDA, D. V. *Controle genético da resistência à Fusarium oxysporium em feijoeiro comum*. 2008. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeats polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gel by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, Athens, v.19, n.4, p.299-306, dez. 2001.

EDWARDS, M. D.; STUBER, C. W.; WENDEL, J. F. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize: numbers, genomic distribution and types of gene action. *Genetics*, Bethesda, v. 116, p. 113-125, mai. 1987.

FERREIRA, L. G. *Mapa genético do feijoeiro comum (Phaseolus vulgaris L.) baseado em marcadores microssatélites e RAPD*. 2006. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular) - Programa de Pós-graduação em Biologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.

HANAI, L. R. *et al.* Development, characterization, and comparative analysis of polymorphism at common bean SSR loci isolated from genic and genomic sources. *Genome*, Toronto, v. 50, n. 3, p. 266-277, mar. 2007.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZALEZ-DE-LEON, D. *Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory*. 2. ed. México: CIMMYT, 1994. 88p.

PEREIRA, H. S. *Seleção assistida por marcadores microssatélites para produtividade de grãos em feijoeiro*. 2006. 149 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

RAVA, C. A.; SARTORATO, A.; COSTA, J. G. C. Reação de genótipos de feijoeiro comum ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em casa de vegetação. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.21, n. 2, p.296-300, jun. 1996.

SALGADO, M. O.; SCHWARTZ, H. F.; BRICK, M. A. Inheritance of resistance to a Colorado race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common beans. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 79, n. 3, p.279-289, mar. 1995.

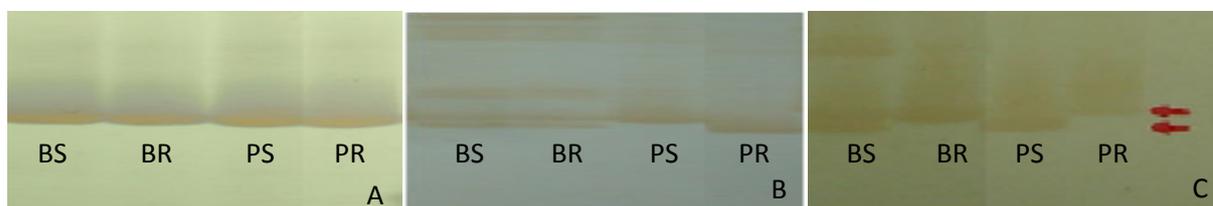


Figura 1. Perfil de marcadores microssatélites em linhagens de feijoeiro comum. **Fig. 1A**, marcador microssatélite *PvM 062* não informativos nos genitores e bulks; **Fig. 1B**, marcador microssatélite *PvM 029* polimórfico entre os genitores, e não informativo nos bulks; e **Fig. 1C**, marcador microssatélite *PvM 127* polimórfico entres os genitores e nos bulks. PR = genitor resistente. PS = genitor suscetível. BR = grupo de plantas F₂ resistente. BS = grupo de plantas F₂ suscetível.

Tabela 1. Locus marcadores microssatélites associados à resistência à murcha do fusário do feijoeiro comum em casa de vegetação.

Marcadores	R ^{2a}	P ^b	N. de indivíduos genotipados
<i>PvM 066</i>	15,61	p<0,000266	99
<i>PvM 127</i>	6,54	p <0,037571	100

^a porcentagem da variação fenotípica da resistência a *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* explicada pela associação do loco marcador e o gene, estimada por regressão linear.

^b nível de probabilidade da análise de variância.