

SELEÇÃO DE *PRIMERS* VISANDO IDENTIFICAÇÃO DE MARCAS DAF ASSOCIADAS A QTL'S EM FEIJÃO-CAUPI

A. T. B. LIMA¹, K. J. DAMASCENO-SILVA², M. M. ROCHA², A. M. BENKO-ISEPPON³, E. A. KIDO³,
L. L. B. AMORIM⁴, A. V. C. ONOFRE⁴

Resumo - O feijão-caupi é uma importante fonte de alimento no mundo, e tem ocupado um lugar importante na dieta de pessoas em muitos países, como uma excelente e de menor custo fonte de proteína, ácidos graxos, aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais. Objetivou-se selecionar *primers* para serem usados em reações DAF visando a seleção de marcas que possam estar associadas a QTL's na espécie. Visando a otimização da reação foram testadas diferentes concentrações de MgCl₂, de *primer* e de dNTP. Na seleção, 46 *primers* foram testados e com base no padrão de bandas obtidas, 12 *primers* se revelaram polimórficos. Os *primers* mostraram-se eficientes na identificação de polimorfismos em feijão-caupi.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*, DAF, polimorfismo.

PRIMERS SELECTION AIMING DAF MARKERS IDENTIFICATION ASSOCIATED TO QTL's IN COWPEA

Abstract – Cowpea is an important source of food worldwide and has occupied an important place in the diets of people in many countries as an excellent and inexpensive source of protein, fatty acids, essential amino acids, vitamins and minerals. The objective of this study was to select *primers* for DAF reactions aiming the selection of markers linked to QTL's. Were different concentrations of MgCl₂, *primer* and dNTP. Were evaluated 46 *primers* and with basis in band pattern obtained, 12 *primers* showed polymorphism. The *primers* showed efficient in polymorphism identification in cowpea.

Keywords: *Vigna unguiculata*, DAF, polymorphism.

¹ Bolsista BCT - FACEPE/ BNB/RENORBIO/Embrapa Meio-Norte. Graduanda em Ciências Biológicas na Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI. Av. Duque de Caxias, 5650 - Buenos Aires, Caixa Postal 001, 64006-220 - Teresina, PI. *e-mail: alinetbl@hotmail.com

² Pesquisador da Embrapa Meio-Norte, Av. Duque de Caxias, 5650 - Buenos Aires, Caixa Postal 001, 64006-220 - Teresina, PI., E-mail: kaesel@cpamn.embrapa.br; mmrocha@cpamn.embrapa.br

³ Docente da Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Recife, PE, Brasil, 50732-970; E-mail: celisep@hotmail.com.br; ederson.kido@gmail.com

⁴ Doutorando(a) em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia. Recife, PE, E-mail: lidiane.amorim@gmail.com; vinicius.alberto@gmail.com

Introdução

O gênero *Vigna* pertence à família Fabaceae (Leguminosae), incluindo cerca de 200 espécies, sendo sete cultivadas. O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) destaca-se dentre estas espécies devido à sua capacidade ímpar de adaptação e rusticidade (SANTALLA et al., 1998) e constitui a base alimentar de milhões de pessoas em todo o mundo (FERY, 2002), estando entre as leguminosas comestíveis com maior conteúdo protéico, tendo grande importância social e econômica especialmente para o semi-árido nordestino, como fator fixador de mão-de-obra, gerador de empregos e de matéria-prima, indispensáveis ao progresso do feijão-caupi (FREIRE-FILHO et al., 1999).

Em função da necessidade de obtenção de uma melhor caracterização do germoplasma desta espécie de forma a associar marcadores genéticos às características fenotípicas importantes para o melhoramento vegetal, a técnica que usa marcadores de DNA tipo DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) vem sendo otimizada e utilizada em laboratórios de diversas entidades (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1988).

A construção de um mapa físico, além de permitir a conexão rápida e linearmente organizada entre mapas genéticos, genes e QTL's (Quantitative Trait Loci) com o DNA genômico total, é um componente fundamental dos futuros esforços de seqüenciamento de genomas completos (FERREIRA; GATTAPAGLIA, 2006).

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de selecionar *primers* para serem usados em reações de DAF visando a seleção de marcas que possam estar associadas a QTL's na espécie.

Material e Métodos

Foram extraídas amostras de DNA de indivíduos representantes da população F₆, derivada do cruzamento entre os parentais BR-14 Mulato – imune ao vírus do mosaico severo (CPSMV) e suscetível ao vírus transmitido por pulgão (CABMV) – e IT 85F-2687 – suscetível ao CPSMV e resistente ao CABMV, no laboratório de Genética da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

As reações de PCR foram realizadas no laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte, localizado em Teresina-PI. Para a otimização da reação de amplificação foram testadas duas concentrações de MgCl₂ (2,5 mM e 5,0 mM), duas concentrações de *primer* (3,3 mM e 13,3 mM) e quatro concentrações de dNTP (1,0 mM, 2,0 mM, 3,0 mM e 4,0 mM). Usaram-se os *primers* A19, A14, B18, C19 e Z19 avaliando o seu comportamento em reações com quatro amostras de linhagens F₆ de feijão-caupi.

Foram testados 47 *primers* RAPD: OP A (01, 02, 04, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20), OP B (06, 12, 14, 16, 17, 18, 20), OP C (03, 05, 11, 19), G (01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 09, 10, 11, 12, 13, 15) e OP Z (04, 09, 10, 15, 16, 19), utilizando-se os dois parentais (IT85F-2687 e BR14) e seis genótipos representantes da população F₆ derivada do cruzamento entre os dois parentais (1, 3, 5, 7, 8, 10).

Após a otimização da reação, para as reações de amplificação foram adotados procedimentos similares ao de Benko-Iseppon et al. (2003), como apresentado a seguir: o volume final da reação foi de 15 µl, contendo 15 ng de DNA, 1,0 mM de dNTP, 1U de *Taq* Polimerase (Invitrogen), 3,3 mM de

primer, 5,0mM de MgCl₂, 1,5 µl de tampão 10X e H₂O ultrapura. Essas reações foram realizadas com uma etapa inicial de desnaturação em 2 min a 95° C, seguido por 40 ciclos de 15 s de desnaturação a 95° C, 1 min anelamento a 35° C e 2 min alongamento a 72° C, com o final do alongamento na mesma temperatura por 2 min. O produto da reação foi visualizado em gel de agarose a 1,8% corado com SYBR Safe DNA Gel Stain a 10.000× (Invitrogen) e fotodocumentados sob luz ultravioleta.

Resultados

Os melhores resultados (Figura 1) foram obtidos em reações de amplificação com a concentração de 5,0 mM de MgCl₂, 1,0 mM de dNTP e 3,3 mM de *primer*. Segundo Ferreira e Grattapaglia (1995), a otimização da concentração de magnésio na reação de amplificação é essencial, pois é um dos fatores que influenciam diretamente na reprodutibilidade do ensaio RAPD, porquanto afeta a eficiência da amplificação pela *Taq* polimerase e, consequentemente, a intensidade com a qual os fragmentos aparecem no gel.

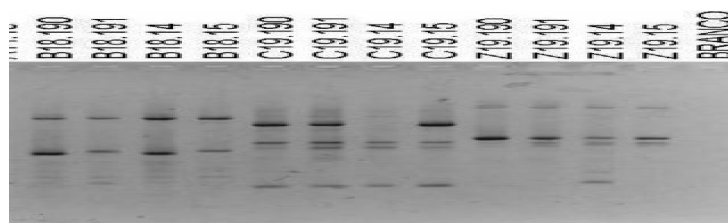


Figura 1. Perfil de gel de DAF usando os primer OP B18, OP C19 e OP Z19 e uma testemunha (branco).

A Tabela 1 apresenta os *primers* selecionados e o respectivo número de bandas polimórficas obtidos, observando-se uma variação de 1 a 4.

Tabela 1. *Primers* RAPD selecionados para serem usados em reações de DAF e respectivos número de bandas polimórficas, monomórficas e total.

<i>Primer</i>	Nº de Bandas Polimórficas	Nº de Bandas Monomórficas	Total de Bandas
A06	1	1	2
A14	2	3	5
A19	4	4	8
A20	2	3	5
B06	1	5	6
B12	1	7	8
B17	1	3	4
B18	2	1	3
B20	4	3	7
C19	2	6	8
Z10	1	10	11
Z15	3	4	7

Os *primers* citados acima se revelaram polimórficos para os genótipos de feijão-caupi avaliados e foram selecionados para serem usados em reações de DAF visando a seleção de marcas que possam estar associadas a QTL's na espécie. Já os *primers* OP A (01, 02, 09, 10, 11, 13, 16, 18), OP

B14, OP C (03, 05, 11), OP G (02, 06, 10, 13) e OP Z19 apresentaram-se monomórficos para a espécie e características estudadas. A Figura 2 mostra o perfil eletroforético de reações de amplificações com *primers* selecionados.

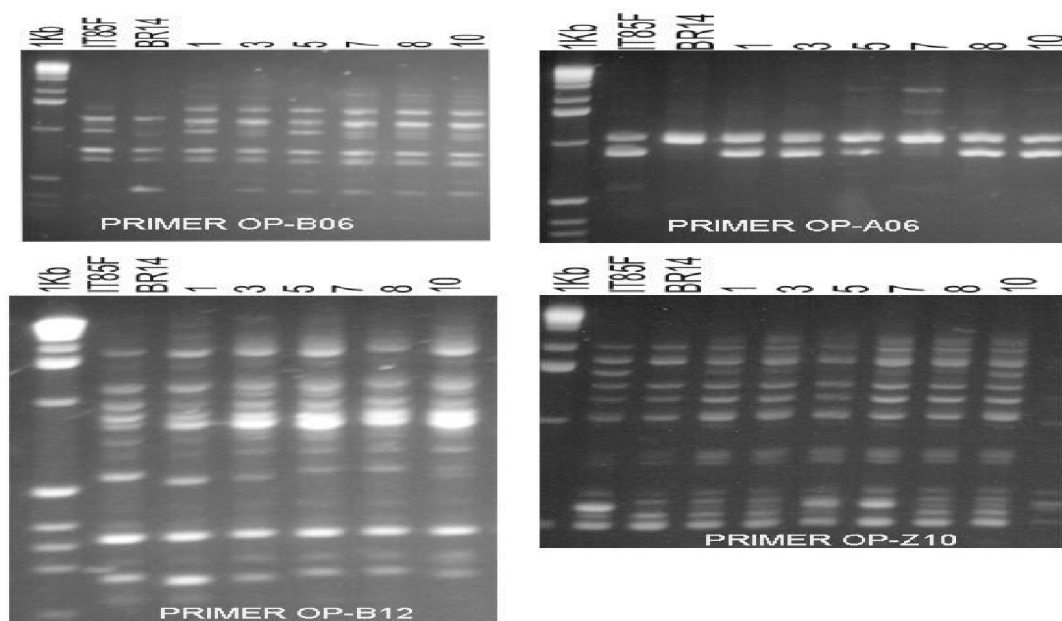


Figura 2. Perfil eletroforético dos *primers* selecionados para ensaios DAF em feijão-caupi.

Conclusão

Os *primers* OP-A (06, 14, 19 e 20), OP-B (06, 12, 17, 18 e 20), OP-C19 e OP-Z (10 e 15) selecionados para os marcadores DAF são eficientes na identificação de polimorfismos abrindo a perspectiva para sua utilização na geração de marcadores moleculares para mapeamento e identificação de QTL'S.

Agradecimentos

À FACEPE pela concessão da bolsa.

Revisores: Comitê Local de Publicação da Embrapa Meio-Norte – CLP (clp@cpamn.embrapa.br). Avenida Duque de Caxias, 5650; Bairro Buenos Aires; 64006-220; Teresina-PI.

Referências

BENKO-ISEPPON, A. M.; WINTER, P.; HÜTTEL, B.; STAGGINUS, C.; MÜHLBAUER, F.; KAHL, G. Markers closely linked to *Fusarium* resistance genes in chickpea show homology to pathogenesis-related genes located on *Arabidopsis* chromosome 5 and 1. **Theoretical and Applied Genetics**, n. 103, p. 379-286, 2003.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA – CERNAGEN, 1998. 220 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Mapeamento físico e clonagem posicional em plantas. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006. p 231-272.

FERY, F. L. New opportunities in Vigna. In: JANICK, J.; WHIPKEY, A. (Ed.). **Trends in new crops and new uses**. Alexandria, VA: ASHS Press, 2002. p. 424-428.

FREIRE-FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, C. A. F. Melhoramento genético do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) na região nordeste. In: QUEIRÓS, M.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro**. Petrolina: EMBRAPA-CPATSA, 1999.

SANTALLA, M.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Genetic diversity in mung bean germoplasma revealed by RAPD markers. **Plant Breeding**, v. 117, p. 473-478, 1998.