

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS MICROSSATÉLITES A PARTIR DE UMA BIBLIOTECA ENRIQUECIDA PARA A VARIEDADE CAL-143 DE FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.)

FERNANDO S. NOBRE¹; LUCIANA L. BENCHIMOL²; JULIANA M. K. CARDOSO³

Nº 0800009

RESUMO

O feijão comum é uma cultura importante economicamente e por isso, é fundamental que sejam aprimoradas novas ferramentas moleculares visando assessorar o melhoramento genético da espécie. Desde 2002, grupos nacionais e internacionais vêm se dedicando ao desenvolvimento de microssatélites para feijão, entretanto, o número de marcadores disponíveis ainda é baixo. Os microssatélites são abundantes e uniformemente distribuídos pelo genoma de plantas, originando marcadores multialélicos, codominantes e com alta heterozigosidade. O presente projeto visa o desenvolvimento de novos microssatélites em feijão comum, a partir de uma biblioteca enriquecida desenvolvida para a variedade CAL-143, onde foram obtidos 672 clones. Até o momento 192 clones foram seqüenciados, dos quais, 37 apresentaram regiões com microssatélites. Dos 53 microssatélites encontrados até o momento, 66,0% apresentam repetições simples, sendo 37,7% dinucleotídeos, 22,6% trinucleotídeos e 5,6% tetracucleotídeos. Outros 34,0% apresentam repetições compostas, sendo 83,3% dinucleotídeos e 16,6% trinucleotídeos, apresentando tanto repetições compostas perfeitas como imperfeitas. A obtenção de microssatélites adicionais em feijão é aplicável à saturação de mapas genéticos, possibilitando a identificação de locos controladores de características de interesse agrônomo e a seleção assistida por marcadores.

ABSTRACT

Common bean is an economically important crop and hence, it is essential that new molecular tools can be developed and applied in breeding programs. Since 2002, national and international groups have been devoted to microsatellites development and characterization in beans; however, the number of available markers is still low. Microsatellites are frequent and uniformly distributed in plant genomes. They are codominant and detain high heterozygosity. This project aimed the development of new microsatellites in common beans, from CAL-143 enriched library. Until now 672 clones were obtained and 192 were sequenced, of which, 37 clones showed microsatellite regions. Of the 53 microsatellites

1. Bolsista PIBIC; Graduação em Ciências Biológicas, UNIARARAS, Araras-SP: suzigannobre@yahoo.com.br;
2. Orientadora; Pesquisadora Científica do Centro de P & D em Recursos Genéticos Vegetais-IAC, Campinas-SP
3. Colaboradora; Mestrado na Pós-graduação de Agricultura Tropical e Subtropical- IAC, Campinas-SP

found, 66.0% showed to be of simple motif. From these, 37.7% were dinucleotides, 22.6% trinucleotides and 5.6% tetranucleotides. Other 34.0% showed compound motifs (perfect and imperfect), 83.3% being dinucleotides and 16.6% trinucleotides. The use of additional microsatellite markers in beans is applicable to genetic diversity studies, mapping and markers assisted selection.

INTRODUÇÃO

ASPECTO ECONÔMICO E GENÉTICO DO FEIJÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L) é a mais importante leguminosa em grão para o consumo humano direto. Compreende cerca de 50% de todo o grão consumido mundialmente. Em muitos países, como o Brasil, o feijão é a principal fonte de proteínas (Broughton et al., 2003). É um organismo diplóide verdadeiro ($2n=2x=22$) e possui um pequeno genoma estimado entre 450 e 650 Mb (Bennett e Leitch, 1995). Essas características facilitam a detecção de marcadores moleculares distribuídos uniformemente por todos os cromossomos, o que proporciona um aumento na detecção dos locos associados às características qualitativas e quantitativas (QTLs), pois é possível obter-se mapas genéticos altamente saturados.

MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES

Marcadores moleculares têm sido usados em muitas culturas. O avanço do melhoramento genético é assessorado pelo desenvolvimento de novos marcadores, que constituem ferramentas para a execução de programas de seleção assistida, por exemplo. Um importante pré-requisito para o uso de recursos genéticos é o amplo conhecimento da extensão e distribuição da variabilidade genética das espécies cultivada e de seus parentes selvagens. Uma das técnicas mais indicadas para estudar polimorfismos entre seqüências de DNA é através dos microssatélites ou SSR ("Simple Sequence Repeats", Tautz, 1989). O conteúdo genético informativo de um loco SSR é bastante alto, por se tratar de seqüências de alta taxa evolutiva. A sua natureza multialélica e codominante permite o estabelecimento da genotipagem de indivíduos dentro de populações ou entre genótipos relacionados, por isso, marcadores microssatélites têm sido usados para identificação individual, análise de diversidade (Powell et al., 1996) e estudos de evolução e de estrutura de populações de espécies relacionadas. Na cultura do feijoeiro já existem estudos relatando a geração e análise de microssatélites a partir de ESTs de feijão comum (Hanai et al. 2007). Como ainda o número de microssatélites disponíveis é relativamente baixo não existe um mapa saturado

com grande número de microssatélites, sendo, até então, necessário recorrer a outros marcadores. O projeto de identificação de novos marcadores microssatélites a partir de mais uma Biblioteca Enriquecida para a variedade CAL-143 de feijão comum representa um esforço adicional na geração e disponibilização de maior número de microssatélites frente à urgência de aplicação desta ferramenta para o mapeamento de características de interesse como genes associados à resistência à antracnose e mancha angular em feijão.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

A variedade CAL-143 foi escolhida para construção de uma biblioteca genômica enriquecida com microssatélites. O material tem sementes rajadas de vermelho (fundo bege) tipo Calima, origem Andina, é suscetível à antracnose e resistente à mancha angular (algumas raças).

BIBLIOTECA ENRIQUECIDA

O protocolo utilizado foi o descrito por Billotte et al. (1999). Para a construção desta biblioteca desenvolvida, o DNA de um único genótipo de CAL-143 foi extraído pelo método CTAB (Hoisington et al. 1994). O DNA foi digerido com a enzima RsaI. Após a digestão, dois adaptadores foram utilizados e ligados com a enzima T4 DNA ligase.

A ligação dos adaptadores, a reação de pré-amplificação contendo o “primer” Rsa21 foi realizada e sondas biotiniladas foram adicionadas. Em seguida, efetuou-se a desnaturação e hibridização do “primer” marcado com biotina ao DNA. Os fragmentos de interesse marcados são selecionados com uso de esferas magnéticas com estreptavidina (Kit da Promega, “Streptavidine MagneSphere Paramagnetic Particles”), as quais ligadas à biotina com repetições (CT)₈ e (GT)₈ retêm os fragmentos de interesse por complementaridade. Os fragmentos selecionados foram amplificados com o “primer” Rsa21, depois clonados em vetor pGEM-T (Promega). Bactérias XL1-Blue são transformadas com estes vetores e as colônias transformadas foram detectadas em placas contendo Xgal/IPTG. Em seguida, é realizada a amplificação dos insertos clonados para a identificação dos clones transformados contendo os fragmentos de interesse. O DNA plasmidial de cada clone foi extraído, amplificado, purificado e seqüenciado em seqüenciador automático (ABI377, Applied Biosystems).

ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS GERADAS

O programa *Microsat*, foi utilizado inicialmente para analisar as seqüências e encontrar os adaptadores e os possíveis sítios de enzima *Rsa*I. Uma vez editadas, as seqüências serão alinhadas para remoção de redundâncias através dos programas *Phed/CAP3* tal como descrito em Benchimol et al. (2007). Somente serão consideradas para desenvolvimento de microssatélites as repetições simples e/ou compostas que possuírem número igual ou superior a quatro unidades repetidas, a fim de se garantir que estas regiões possam revelar polimorfismo quando amplificadas a partir do genoma de diferentes genótipos de feijão. Os oligonucleotídeos complementares as seqüências flanqueadoras dos microssatélites serão desenhados pelo programa *Primer Select*, vs.5.0 (DNASTar, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sete transformações foram realizadas até que se obtivesse um número satisfatório de colônias para repicá-las em microplacas com 96 clones cada. Os insertos clonados foram amplificados e observados em gel de agarose para a identificação dos clones transformados contendo os fragmentos de interesse (**FIGURA 1**). Até o momento, foram obtidas seis novas microplacas com 576 clones enriquecidos com estes fragmentos selecionados de um total de 672 clones gerados.

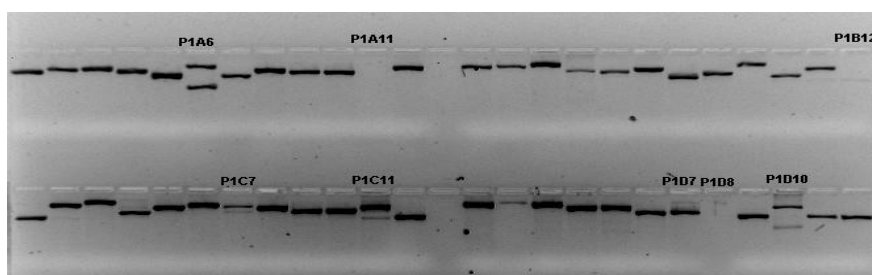


FIGURA 1. Gel de agarose com identificação dos materiais descartados por apresentarem mais de um inserto (P1A6; P1C7; P1C11; P1D10) ou por não terem amplificado (P1A11; P1B12; P1D8).

Até o presente momento, 192 clones foram seqüenciados e suas seqüências foram analisadas pelo programa *Microsat* (Billotte et al., 1999) para analisar as seqüências e encontrar clones que apresentaram regiões com microssatélites (**FIGURA 2**).

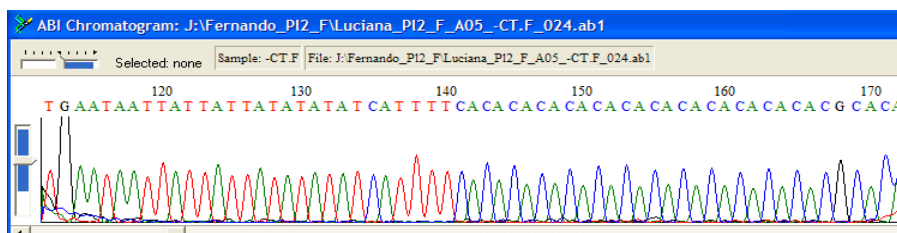


FIGURA 2. Presença de microsatélite (CA)13 em seqüência gerada.

Das seqüências geradas, 37 clones apresentaram regiões com microsatélites. Dos 53 microsatélites encontrados (**FIGURA 3**), (66,0%) apresentam repetições simples, sendo (37,7%) dinucleotídeos, (22,6%) trinucleotídeos e (5,6%) tetranucleotídeos. Outros (34,0%) apresentam repetições compostas, sendo (83,3%) dinucleotídeos e (16,6%) trinucleotídeos, apresentando tanto repetições compostas perfeitas como imperfeitas (**FIGURA 4**). As outras seqüências ou não apresentavam um perfil adequado para análise, ou não possuíram regiões que apresentassem microsatélites.

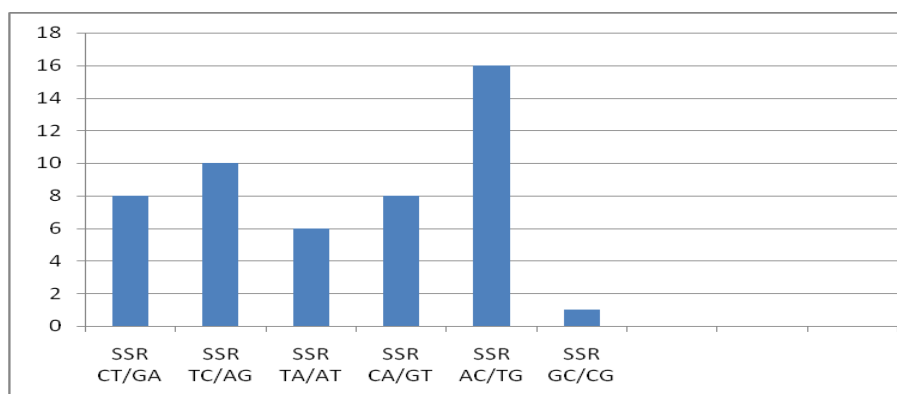


FIGURA 3. Frequência e tipos das repetições de microsatélites (SSRs) encontrados.

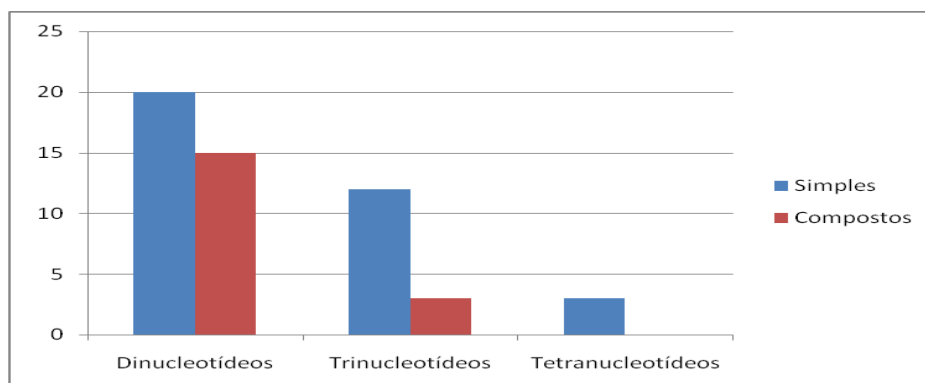


FIGURA 4. Relação dos motivos de SSRs encontrados.

CONCLUSÃO

A geração de um mapa saturado com microssatélites em uma população totalmente desenvolvida pelo Programa de Melhoramento do IAC com genitores contrastantes certamente será um passo importante e promoverá o Instituto Agronômico no âmbito de trabalhos com marcadores moleculares. O trabalho atual tem como meta possibilitar a obtenção de novos marcadores microssatélites para aplicação na saturação do mapa de feijão comum que vem sendo elaborado pelo nosso grupo de pesquisa bem como facilitar a localização de genes associados com a resistência à antracnose e mancha angular (proc. FAPESP 2005/53819-0). A construção de um mapa genético a partir de uma população de interesse poderá viabilizar a aplicação da seleção assistida por marcadores junto ao Programa de Melhoramento do Feijoeiro do IAC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Benchimol, LL; Campos, T; Carbonell, SAM; Colombo, CA; Chioratto, AF; Formighieri, EF & Souza, AP (2007). Structure of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties of Mesoamerican and Andean origins using new developed microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54: 1747-1762.
- Bennett MD, Leitch IJ (1995). Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Ann. Bot. (London)*, 76: 113-176.
- Bennett MD, Leitch IJ (1995) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Ann. Bot. (London)*, 76: 113-176
- Broughton WJ, Hernández G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legume. *Plant soil* 252: 55-128.
- Graham PH, Vance CP (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol* 131: 872-877.
- Hanai, L.L.; Campos, T.; Camargo, LEA, Benchimol, L.L.; Souza, AP; Melotto, M; Carbonell, SAM; Chioratto, AF; Consoli, L; Formighieri, EF; Siqueira, MVBM; Tsai TM & Vieira, MLC (2007).“Development, characterization and comparative analysis of polymorphism at common bean-SSR loci isolated from genic and genomic sources” *Genome*, 50: 266-277.
- Hoisington D., M. Khairallah & D. González-de-León (1994). Laboratory Protocols: CIMMYT *Applied Molecular Genetics Laboratory*. Second Edition. Mexico, D.F.: CIMMYT.
- Powell, W.; Machray, G.C.; Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant. Sci.*, 1:215-222.
- Tautz, D. (1989). Hipervariability of simple sequences of a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17:6463-6471.