

Validação de Marcadores Associados à Resistência à Murcha de *Fusarium* em Feijão

Juliana de Souza Rodrigues¹, Mário Henrique Rodrigues Mendes Torres², Helton Santos Pereira³, Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza³, Leonardo Cunha Melo³, Claudio Brondani⁴ e Rosana Pereira Vianello⁵

¹ Bióloga, mestranda em Ciências Biológicas, estagiária da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO

² Biólogo, doutorando em Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO

³ Engenheiro-agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutor em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO

⁵ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO

Resumo - O Brasil está entre os maiores países produtores de feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), com produção anual estimada em 2,5 milhões de toneladas de grãos. Apesar do elevado potencial produtivo apresentado pelas cultivares de feijão, a produtividade média atual ainda está muito aquém do esperado, o que se deve a uma série de fatores bióticos e abióticos. Dentre as doenças do feijão, a murcha de *Fusarium*, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum*, é de grande importância pela sua ampla ocorrência e severidade dos danos causados. Nesse cenário, a obtenção de cultivares resistentes é a principal alternativa para o controle da doença. Em um estudo conduzido na Embrapa Arroz e Feijão, em Santo Antônio de Goiás, GO, utilizando uma população de mapeamento (CNFP 10794 x BRS Horizonte) para resistência à murcha de *Fusarium*, genotipada com 52.388 marcadores moleculares, foram identificados diversos QTLs associados à resistência baseada na estratégia Statistical Machine Learning (SML). O objetivo deste trabalho é validar os marcadores moleculares identificados como associados à resistência à murcha de *Fusarium* através da amplificação de locos específicos, sequenciamento genômico e confirmação do polimorfismo genético em um grupo de genótipos contrastantes para a resistência/suscetibilidade à esta doença. A metodologia consistiu, inicialmente, na identificação das associações mais significativas e definição dos locos alvos para o desenvolvimento dos marcadores moleculares. A partir dessa informação um conjunto de oito SNPs associados à resistência à murcha de *Fusarium* foram selecionados e posicionados nos cromossomos 1, 2, 4 e 5. A segunda etapa consistiu em um trabalho de bioinformática de alinhamento dos SNPs no genoma de feijão utilizando a plataforma Phytozome, seguida pela identificação e desenho dos pares de oligonucleotídeos flanqueando os SNPs alvos, utilizando o programa Primer3Plus na interface web. Um conjunto de oito pares de oligonucleotídeos foram sintetizados e submetidos à análise molecular utilizando os genótipos CNFP 10794 e BRS Horizonte. Todos os marcadores foram ajustados quanto às condições de amplificação utilizando a reação da polimerase (PCR) com ciclos e temperaturas de anelamento variados. As reações de PCR foram ajustadas individualmente para cada marcador, onde se buscou reduzir ao mínimo a concentração final de oligos utilizados, com a finalidade de eliminar qualquer contaminante na etapa de sequenciamento. Sucessivas amplificações, com variadas concentrações de DNAs e oligos foram realizadas e, ao final, foram definidas as concentrações de DNA para 30 ng/reação e a de oligos para 0,25 µM/reação. Posteriormente os produtos amplificados foram submetidos à reação de sequenciamento em equipamento ABI 3500, seguido também pelo ajuste das concentrações para obter produtos sequenciados com maior resolução e qualidade de detecção de bases. Dentre os oito amplicons desenvolvidos próximos aos QTLs associados à resistência à murcha de *Fusarium*, sete revelaram um padrão desejado de amplificação e qualidade do produto sequenciado. Com a finalização da etapa de ajuste dos oligos, os mesmos serão avaliados em conjunto, utilizando maior número de genótipos resistentes/tolerantes à doença, o que possibilitará inferir sobre o potencial de conversão dos mesmos em ferramentas para serem inseridas na rotina de seleção assistida por marcadores. O desenvolvimento e a validação de marcadores moleculares que cosegurem a alelos favoráveis de resistência é importante para auxiliar na seleção de genótipos/linhagens visando o desenvolvimento de cultivares superiores pelo programa de melhoramento genético do feijoeiro da Embrapa.