

Transferibilidade de marcadores microsatélites de soja para feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.)

SCHIAVON, A.L.¹; SANTOS, M.A.²; SOUZA, R.C.²;
HUNGRIA, M.³

¹Centro Universitário Filadélfia - Unifil; ²Escola
Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Esalq/
USP; ³Embrapa Soja

Os marcadores moleculares microsatélites ou SSRs (simple sequence repeats) são amplamente utilizados em estudos genéticos de humanos, plantas e animais, devido a sua expressão codominante e multialélica, contendo a mais elevada informação de polimorfismo “PIC” (“Polymorphism Information Content”) entre todos os marcadores moleculares (Ferreira & Grattapaglia, 1998). O mapa genético da soja tem um tamanho estimado de 2.523,6 cm, aproximadamente, contendo mais de 1000 marcadores microsatélites distribuídos nos 20 grupos de ligação (Song et al., 2004). Devido ao seu alto polimorfismo e segmentos pequenos, esses marcadores têm sido extremamente empregados em estudos de diversidade e mapeamento genético de características de interesse agrônômico. São ideais para a identificação e discriminação de genótipos e em estudos de genética de populações. Entre muitas espécies esse marcadores se encontram bem relacionados, tornando possível a sua transferência de uma espécie para outra, podendo visualizar o grau de semelhança entre estas (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Muitas transferências de marcadores microsatélites realizadas tiveram resultados positivos, havendo transferibilidade para plantas como leguminosas, citrus, eucalipto, para animais como bovinos, caprinos, suínos, entre outros. O objetivo deste estudo foi verificar a transferibilidade de 13 marcadores microsatélites

de soja em genótipos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). A escolha desses marcadores deve-se ao fato deles terem sido associados com parâmetros relacionados com a fixação biológica de nitrogênio (FBN) em estudos de mapeamento em soja.

O estudo foi iniciado com um conjunto de 42 genótipos de feijão comum, oriundos de programas de melhoramento. Esses materiais apresentam variabilidade quanto a características como cor de flor, cor da semente e outros descritores morfológicos (Tabela 1).

Tabela 1. Características dos genótipos de feijão comum utilizados no estudo de transferibilidade de marcadores microssatélites de soja.

COR DO GRÃO	COR DO HILO	COR DA FLOR ¹	COR DO CAULE ¹
Marrom (carioca)	Branco	Branca / Rosa	Verde / Avermelhado
Marrom (rajado)	Branco	Rosa / Branca	Verde / Avermelhado
Preto	Branco	Roxa / Rosa	Avermelhado / Verde
Vermelho	Branco	Branco	Verde / Avermelhado

¹As informações à frente da barra têm predominância e as que estão opostas à barra ocorrem em apenas algumas cultivares.

As amostras de DNA foram extraídas a partir de duas a três folhas (primeiras folhas trifoliadas) pelo método descrito por Keim et al. (1988). A seguir, cada amostra de DNA genômico total foi amplificada com os 13 pares de *primers* microssatélites, escolhidos a partir do mapa do genoma da soja (Cregan et al., 1999) e que foram associados com os parâmetros de FBN (Santos et al., 2006; Nicolas et al., 2006; Tanya et al., 2005) (Tabela 2). O volume total das reações de PCR (Polymerase Chain Reaction) foi modificado para 10 μ L, contendo: tampão de PCR 1X (2,5 mM Tris-HCL pH 8,3 e 62,5 mM de KCl); 2,5 mM de $MgCl_2$; 125 μ M de cada dNTP; 0,2 μ M de cada oligonucleotídeo (“primer”) (“forward” e “reverse”), uma unidade de *Taq* DNA polimerase e 20 ng de DNA genômico. As amplificações foram realizadas em um termociclador (MJ Research modelo PT – 200), com um programa iniciado com 7 min a 94 °C, seguidos de 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 50 °C e 2 min a 72 °C e finalizando com uma etapa de 7 min a 72 °C para a extensão da fita.

Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (29:1, acrilamida:bis-acrilamida) a 10 %. Os géis foram corados em uma solução de brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) por 7 min e fotografados sob luz UV com câmera digital Kodak DC 120 e o software para PC Kodak Digital Science 1D (Eastman Kodak Company).

Tabela 2. Marcadores microssatélites associados com parâmetros de fixação biológica de nitrogênio em soja e selecionados para teste de transferibilidade em feijão.

Marcador	Tamanho do alelo na cultivar Willians (pb)	Características				
		PAS ^a	MNS ^b	MNF ^c	NN ^d	MNS/NN ^d
Satt 192	252	-	x	-	x	x
Satt 232	250	x	-	-	-	-
Satt 251	212	-	x	-	-	-
Satt 260	229	-	x	-	-	-
Satt 303	220	-	x	-	-	-
Satt 305	210	-	-	-	-	-
Satt 332	247	x	-	-	-	-
Satt 371	248	-	-	-	-	-
Satt 385	310	-	-	x	x	-
Satt 406	171	-	-	-	-	-
Satt 414	306	x	x	x	-	-
Satt 509	238	-	x	-	x	-
Satt 545	207	-	-	x	-	-

^aMPAS - massa da parte aérea seca (mg/pl^{-1}); ^bMNS - massa de nódulos secos (mg/pl^{-1}); ^cMNF - massa de nódulos frescos (mg/pl^{-1}); ^dNN - número de nódulos (nódulos/ pl^{-1}); ^eMNS/NN - massa média de nódulos secos (mg/nod^{-1}).

Na análise dos géis foram considerados os critérios adotados por Kuleung et al. (2004). Assim, foi construído um *score* para os *primers* que amplificaram fragmentos de tamanho esperado de acordo com a intensidade do sinal e a facilidade de avaliação: (1) sinal forte e facilidade de avaliação; (2) sinal fraco e facilidade de avaliação; (3) sinal fraco e difícil avaliação e (4) ausência de sinal. Somente os scores 1 e 2 foram considerados como amplificação positiva. Na análise exploratória, todos os 13 marcadores testados produziram um perfil de bandas nos 42 genótipos de feijão. Padrões distintos de bandas foram observados para a maioria dos *primers* entre os genótipos de feijão. O perfil de

múltiplas bandas não é o esperado para marcadores microsátélites, uma vez que estes são marcadores denominados unilocus e, como os genótipos estudados são gerados por autofecundação, múltiplas bandas representam múltiplos loci e não múltiplos alelos. Este padrão foi observado por Peakall et al. (1998) ao analisarem a transferibilidade de 31 microsátélites de soja para outros gêneros de legumes (*Vigna*, *Kennedia*, *Vicia*, *Trifolium*, *Lupinus* e *Albizia*).

Em uma segunda análise, foram comparados os perfis gerados pelos 13 pares de *primers* em cinco genótipos de feijão: BRS 7762 Supremo (Preto), BRS Timbó (Vermelho), BRS Valente (Preto), CNFC 10733 (Carioca) e CNFC 10753 (carioca), que obtiveram bom desempenho em relação à intensidade de sinal e à facilidade de avaliação, com o perfil destes na cultivar de soja Bossier 133 e Embrapa 20. Também foi avaliada a repetibilidade desses padrões gerados nas reações de amplificação feitas em triplicata. Após completada a segunda etapa, os marcadores Satt 305, Satt 303, Satt 385 e Satt 192 geraram fragmentos com o mesmo tamanho dos fragmentos dos alelos de soja (Fig. 1), havendo a possível transferibilidade destes. Sendo assim, os resultados indicaram relação entre seus genomas, como também foi encontrado no trabalho de Kuleung et al. (2004). Os demais marcadores analisados produziram perfis de bandas consistentes entre os diferentes genótipos de feijão, com bandas próximas, porém não idênticas aos alelos da soja entre apenas 13 marcadores.

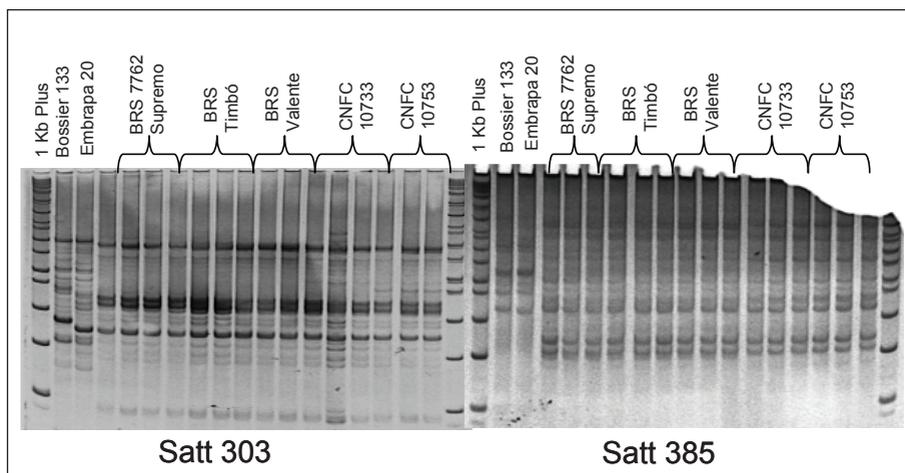


Fig. 1. Padrão eletroforético das amostras de feijão amplificadas com SSR de soja.

Referências

- CREGAN, P. B.; JARVIK, T.; BUSH, A. L.; SHOEMAKER, R. C.; LARK, K. G.; KAHLER, A. L.; KAYA, N.; VAN TOAL, T. T.; LOHNES, D. G.; CHUNG, J.; SPECHT, J. E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, v. 39, p. 1464 - 1491, 1999.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético**. Brasília: Embrapa, 1998. 220 p.
- KEIM, P.; OLSON, T. C.; SHOEMAKER, R. C. A rapid protocol for isolating soybean DNA. **Soybean Genetics Newsletter**, v. 15, p. 150-152, 1988.
- KULEUNG, C.; BAENZIGER, P. S.; DWEIKAT, I. Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale. **Theoretical Applied Genetics**, v. 108, p. 1147-1150, 2004.

NICOLAS, M. F.; HUNGRIA, M.; ARIAS, C. A. A. Identification of quantitative trait loci controlling nodulation and shoot mass in progenies from two Brazilian soybean cultivars. **Field Crops Research**, v. 95, p. 355-366, 2006.

PEAKALL, R.; GILMORE, S.; KEYS, M.; MORGANTE, M.; RAFALKLSKI, A. Cross-Species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSR in plants. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, p. 1275-1287, 1998.

SANTOS, M. A.; NICOLÁS, M. F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 67-75, 2006.

Song, Q. J.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R. C.; LARK, K. G.; CONCIBIDO, V. C.; TANYA P.; SRINIVES, P.; TOOJINDA, T.; NAKHON, P.; VANAVICHIT, A.; LEE, S.H. Identification of SSR markers associated with N₂ fixation components in soybean [*Glycine max* (L.) Merr]. **Korean Journal of Genetics**, v 27, p. 351-359, 2005.