

CONSTRUÇÃO DE UM MAPA GENÉTICO PARA O FEIJÃO USANDO MARCADORES SNP E A POPULAÇÃO DE RILs RUDÁ × AND 277

CONSTRUCTION OF A GENETIC MAP FOR THE COMMON BEAN USING SNP MARKERS AND THE RUDÁ × AND 277 RIL POPULATION

Thiago Lívio P. O. Souza^{1*}, Rosana P. Vianello¹, Ana L. Passos², Paula A. M. R. Valdisser³, Everaldo G. Barros⁴, Carlos E. L. Fonseca⁵, Marcial A. Pastor-Corrales⁶, Qijian Song⁶ e Perry B. Cregan⁶

Introdução. A principal população de mapeamento utilizada atualmente para o feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é formada por linhagens endogâmicas recombinantes (*Recombinant Inbred Lines* – RILs) derivadas de cruzamentos entre as variedades BAT 93 (Mesoamericana) e Jalo EEP 558 (Andina), a qual foi descrita inicialmente por Nodari et al. (1993). Esta população tem sido mantida pelo grupo de pesquisa liderado pelo Dr. Paul Gepts (Universidade da Califórnia, Davis, CA, EUA - <http://www.plantsciences.ucdavis.edu/gepts/PVgm.html>), e vem sendo usada na tentativa de se construir um mapa genético integrado para o feijão (Miklas et al., 2006). Várias outras populações de mapeamento também têm sido desenvolvidas e utilizadas em todo o mundo, a exemplo das RILs desenvolvidas pelo CIAT (Cali, Colombia) a partir do cruzamento DOR 346 (Mesoamericana) × G19833 (Andina). No entanto, o tamanho reduzido é uma séria limitação para o uso destas e outras populações atualmente disponíveis para mapeamento em feijão. Isso compromete a acurácia das estimativas de recombinação e, por consequência, a precisão do mapa genético como um todo. Segundo Silva et al. (2007), os tamanhos mínimos populacionais e respectivos níveis de saturação do genoma necessários para o desenvolvimento de mapas genéticos robustos, considerando o uso de populações de RILs, seriam: 200 linhagens/5.0 cM, 300 linhagens/10.0 cM ou 500 linhagens/20 cM. Assim, o grupo de pesquisa do BIOAGRO/UFV (Viçosa, MG) desenvolveu uma população de RILs composta por cerca de 500 linhagens, a partir do cruzamento entre Rudá (Mesoamericana) e AND 277 (Andina) (Sanglard et al., 2013). Esta população tem sido atualmente mantida e distribuída pela Embrapa Arroz e Feijão (Santo Antônio de Goiás, GO). O principal objetivo deste trabalho foi construir um mapa genético robusto para o feijoeiro-comum usando 376 RILs Rudá × AND 277 e 5.398 marcadores SNP (BARBean6K_3 *Illumina BeadChip*).

Material e Métodos. A extração de DNA das RILs Rudá × AND 277 e seus genitores foi realizada a partir de amostras compostas pelo tecido foliar de 10 plantas coletadas em *bulk*, ou seja, foram amostradas 10 plantas por genótipo. Plantas das linhagens e genitores foram semeadas e cultivadas em casa de vegetação. Para a extração de DNA foi utilizado o kit comercial *Invisorb® Spin Plant Mini Kit*, seguindo as orientações do fabricante. A genotipagem dos marcadores foi realizada no *Soybean Genomics and Improvement Lab*, USDA-ARS/BARC-W (Beltsville, MD, EUA), utilizando o BARBean6K_3 *Illumina BeadChip*, constituído por 5.398 SNPs, utilizando a plataforma de genotipagem *Illumina Infinium HD Assay Ultra®*, seguindo as orientações do protocolo estabelecido pelo fabricante. Visando obter previamente a informação acerca de qual grupo de ligação (GL) ou cromossomo cada marcador SNP estaria ligado, as sequências contendo SNPs informativos foram alinhadas contra o genoma de referência do feijão (genótipo G19833), disponível no Phytozome (<http://www.phytozome.net/commonbean.php>), utilizando a ferramenta BlastN do CLC *Genomics Workbench version 5.5*. As análises estatísticas e de mapeamento foram realizadas com o auxílio do programa MapDisto (Lorieux, 2012).

¹ Pesquisador, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO.

² Mestranda em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO.

³ Analista, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO.

⁴ Professor, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF.

⁵ Pesquisador, Embrapa Labex EUA, USDA-ARS/OIRP, Beltsville, MD, EUA.

⁶ Pesquisador, Soybean Genomics and Improvement Lab, USDA-ARS/BARC-W, Beltsville, MD, EUA.

*Autor para correspondência: (62) 3533-2129; thiago.souza@embrapa.br.

Resultados e Discussão. Dos 5.398 marcadores SNP testados, 3.288 (60,9%) foram informativos, uma vez que foram polimórficos na população de mapeamento e apresentaram alta qualidade de chamada dos alelos. A segregação destes marcadores foi aferida pelo teste do Qui-quadrado (χ^2), usando como critério a frequência esperada para uma população de RILs (1AA:1aa; $P < 0,05$). Com isso, 2.062 SNPs (38,2%) foram selecionados para serem mapeados. Estes marcadores foram então alinhados com sucesso contra o genoma de referência do feijão (genótipo G19833). Assim, foram definidos previamente os GLs em que cada marcador estaria ligado. Como esperado, 11 GLs foram formados (LOD = 3,0, $r = 0,3$). Contudo, 22 SNPs não foram agrupados em nenhum GL. O mapa genético final foi então formado por 2.040 SNPs (37,8%), com tamanho total de 1.903,78 cM e distância média entre marcadores de 0,93 cM. A saturação e a distribuição dos marcadores ao longo dos 11 GLs são apresentadas na Tabela 1. O número de marcadores por GL variou de 26 (GL-10) a 336 (GL-05). O tamanho dos GLs variou de 76,95 cM (GL-06) a 350,26 cM (GL-03). A distância média entre marcadores em cada GL variou de 0,30 cM (GL-05) a 7,62 (GL-10). Atualmente, a população de RILs Rudá \times AND 277 está sendo genotipada com marcadores SSR e SCAR previamente mapeados em outras populações. Esta ação visa à integração do mapa genético construído neste trabalho com outros mapas de referência já desenvolvidos para o feijão. Adicionalmente, novos marcadores SNP identificados como polimórficos entre os genitores Rudá e AND 277 via GBS (*Genotyping by Sequencing*) estão sendo integrados ao mapa genético construído para a população Rudá \times AND 277. Considerando que estes genitores são contrastantes para várias características morfo-agronômicas, incluindo a reação a várias doenças (Sanglard et al., 2013), estas RILs também estão sendo amplamente fenotipadas em campo e casa de vegetação para o mapeamento eficiente de genes associados a características de interesse agrônomico e a análise de QTL's. As linhagens que compõem esta população estão sendo mantidas na Embrapa Arroz e Feijão, sendo também periodicamente multiplicadas visando atender a demandas de solicitação de sementes que já estão surgindo de diferentes grupos de pesquisa no Brasil e no exterior. Espera-se que o uso cooperativo destas RILs como uma população de referência possa contribuir sobremaneira para o desenvolvimento de um mapa genético integrado para o feijoeiro-comum, o qual possa ser mais robusto e suficientemente saturado.

Tabela 1. Número e distribuição de marcadores SNP nos grupos de ligação do mapa genético do feijoeiro-comum construído usando a população de RILs Rudá \times AND 277.

Grupo de Ligação	No. de SNPs	Tamanho (cM)	Distância Média (cM)
GL-01	282	135,52	0,48
GL-02	188	157,54	0,84
GL-03	191	350,26	1,83
GL-04	229	284,76	1,24
GL-05	336	101,89	0,30
GL-06	121	76,95	0,64
GL-07	236	111,36	0,47
GL-08	167	146,90	0,88
GL-09	115	257,33	2,24
GL-10	26	198,13	7,62
GL-11	149	83,14	0,56
Total	2.040	1.903,78	0,93

Conclusão. Utilizando 376 RILs da população Rudá \times AND 277 e 5.398 marcadores SNP do BARBean6K_3 *Illumina BeadChip*, foi possível construir um mapa genético robusto para o feijoeiro-comum. O mapa final foi formado por 2.040 SNPs, apresentando tamanho total de 1.903,78 cM e distância média entre marcadores de 0,93 cM.

Referências

LORIEUX, M. MapDisto: fast and efficient computation of genetic linkage maps. **Molecular Breeding**, v. 30, p. 1231-1235, 2012.

MIKLAS, P.N.; KELLY, J.D.; BEEBE, S.E.; BLAIR, M.W. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical to MAS breeding. **Euphytica**, v. 147, p. 105-131, 2006.

NODARI, R.O.; TSAI, S.M.; GUZMAN, P.; GILBERTSON, R.L.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean. III. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. **Genetics**, v. 134, p. 341-350, 1993.

SANGLARD, D.A.; MAFRA, V.S.; RIBEIRO, C.A.G.; SILVA, L.C.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A.; CARNEIRO, J.E.S.; MOTA, A.P.S.; VIANELLO, R.P.; SOUZA, T.L.P.O. Rudá × AND 277 RILs: a potential new core mapping population for common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 56, p. 23-24, 2013.

SILVA, L.C.; CRUZ, C.D.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Simulation of population size and genome saturation level for genetic mapping of recombinant inbred lines (RILs). **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 1101-1108, 2007.