

## **DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE GENOTIPAGEM MOLECULAR PARA DETERMINAÇÃO DA IDENTIDADE GENÉTICA DE CULTIVARES DE FEIJOEIRO COMUM (*Phaseolus vulgaris*)**

**CARDOSO, Paola Crystina Bergamini<sup>i</sup>; GARCIA, Robertha Augusta Vasconcelos<sup>ii</sup>;  
 DE FARIA, Luis Cláudio<sup>iii</sup>; DEL PELOSO, Maria José<sup>iii</sup>; BRONDANI, Cláudio<sup>iv</sup>;  
 BRONDANI, Rosana Pereira Vianelo<sup>v</sup>**

Palavras-chave: Microssatélites; Cultivares; Rastreabilidade.

### **1. Introdução**

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das mais importantes leguminosas cultivadas em todo o mundo, sendo que o Brasil está entre os maiores produtores, sendo responsável por 13% da produção mundial. O feijão representa uma importante fonte protéica na dieta humana, principalmente nos países em desenvolvimento.

Existe uma constante demanda por cultivares mais produtivas, com melhor qualidade de grão, resistência às principais doenças e adaptadas às condições de cultivo brasileiras. Nesse sentido, o programa de melhoramento do feijoeiro comum da Embrapa Arroz e Feijão têm desenvolvido e lançado no mercado mais de 20 novas cultivares nos últimos 16 anos.

Os marcadores microssatélites são recomendados a nível internacional para fins de utilização em investigação forense. A partir da análise com esses marcadores é possível gerar perfis genéticos baseados no polimorfismo de unidades repetidas gerando subsídio para a determinação de estimativas de vínculo e identidade genética. A informação de identidade genética derivada dos marcadores SSRs pode ser utilizada para gerar descritores complementares aos botânico-agronômicos para fins de registro e proteção intelectual.

O objetivo desse trabalho foi desenvolver um sistema de genotipagem multiloco semi-automatizado baseado em marcadores microssatélites e determinar a identidade genética de um grupo de cultivares de feijoeiro comum.

### **2. Metodologia**

Os sistemas de genotipagem foram desenvolvidos a partir de um grupo de 62 SSRs (Blair, et al 2003) selecionados com base em PIC superior a 70%, distribuição no genoma e padrão específico de amplificação. Os sistemas de amplificação simultânea de um conjunto de marcadores SSR foram ajustados visando maximizar o número de locos co-amplificados em uma mesma reação de PCR.

Foram caracterizadas 48 cultivares, em bulks de quatro indivíduos, de feijoeiro comum pertencentes aos grupos: preto, carioca, mulatinho, rosinha, vermelho, roxo, manteigão mulato, branco, dark red kidney e cranberry utilizando 30 marcadores microssatélites fluorescentes (6-Fam, Hex e Ned) com os quais foram montados e otimizados sete sistemas multiplex.

A determinação dos alelos foi realizada utilizando o analisador de DNA ABI 3100 Genetic Analyzer e o programa GeneMapper. Foi construído um banco de

dados com as informações genóticas geradas. As estimativas genéticas foram obtidas através dos programas POWER MARKER (Liu & Muse, 2005), GDA (Lewis & Zaykin, 2001), FSTAT (Goudet, 2001), NTSYS (Rohlf, 1989) e IDENTITY (Horst & Kristina, 1999).

### 3. Resultados e Discussão

Os marcadores SSR marcados com a mesma fluorescência e faixas de amplificação alélica distintas foram agrupados em um mesmo sistema multiplex. Para os 30 SSRs utilizados, foi possível montar 7 conjuntos multiplex, sendo um com 6 marcadores e dois com 5 marcadores cada e quatro com 4 marcadores. Dentro de um mesmo painel, os marcadores SSR com a mesma temperatura de anelamento foram co-amplificados em uma mesma reação de PCR.

Com base na caracterização das 48 cultivares, o número de alelos variou de 2 a 15, com média de 5,5 alelos por loco. O PIC variou de 0,13 a 0,87, com valor médio de 0,48. A diversidade gênica para o grupo carioca foi de 0,40, para o grupo preto foi de 0,43 e para o grupo roxo de 0,13. A cultivar que apresentou maior número de alelos privados e diferenciou-se das demais foi a SUG 33, pertencente ao grupo Cranberry. As estimativas de ( $F_{st}$ ) que determinam a estruturação entre os grupos preto, carioca e roxo devido ao efeito de subdivisão foi de 0,1. A elevada endogamia deve-se ao sistema autógamo de cruzamento (Tabela 1).

A distância genética média obtida com o coeficiente de Rogers modificado por Wright estimada para as cultivares foi de 0,62 (Figura 1) e para os grupos foi de 0,70. Entre os locos avaliados, não se encontrou nenhuma evidência de ligação. Dos 30 marcadores, cinco com PIC superior a 0,8, foram capazes de discriminar todas as 48 cultivares analisadas. A estimativa de Probabilidade de Identidade (PI) combinada foi de  $3.72 \times 10^{-15}$ , indicando um elevado poder de discriminação do conjunto de locos.

Dentre as 48 cultivares analisadas, 20 apresentaram heterogeneidade para no mínimo dois locos. A cultivar com maior número de locos heterogêneos foi a FT Bio Nobre com nove locos. O loco PV113 apresentou o maior número de cultivares heterogêneas. Estes bulks heterogêneos estão sendo abertos para determinar se houve mistura de genótipos ou se ainda há heteroziguidade dentro da cultivar.

### 4. Conclusão

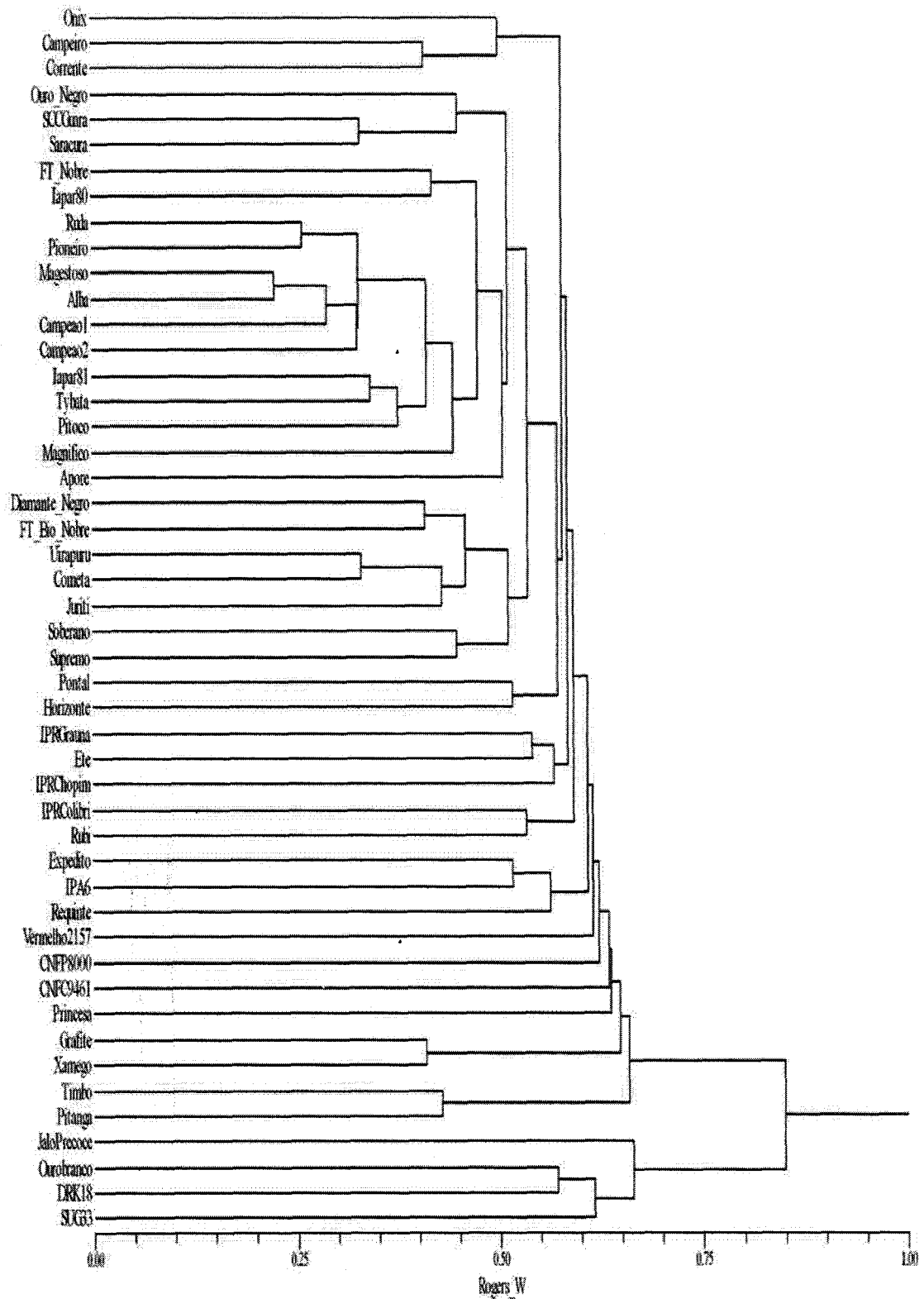
Esse estudo estabelece um sistema de genotipagem inédito para feijão comum baseado em uma tecnologia de elevado poder de discriminação individual para testes de DHE.

A partir das análises está sendo gerado um bando de dados contendo os perfis genéticos e frequências alélicas de marcadores SSRs para cultivares de feijão comum.

O banco de dados irá possibilitar que estudos de determinação de pureza de sementes e análises de procedência questionada, para fins de fiscalização da comercialização da semente, sejam conduzidos como apoio às atividades de rotina do programa de melhoramento da Embrapa Arroz e Feijão.

**Tabela 1.** Estimativas dos parâmetros genéticos dos 30 marcadores SSRs com base na análise das 48 cultivares. Fa: Frequência alélica máxima, A: Número de alelos, Gd: Diversidade genética, Ho: Heterozigosidade observada, PIC: Conteúdo de informação de polimorfismo e Fst: Diversidade genética entre populações.

SSR	Fa	A	Gd	Ho	PIC	Fst
BM068	0,875	2,000	0,227	0,000	0,215	0,134
BM114	0,438	6,000	0,726	0,063	0,691	0,095
BM138	0,865	3,000	0,242	0,063	0,226	-0,006
BM140	0,906	3,000	0,174	0,021	0,167	0,716
BM143	0,479	9,000	0,713	0,125	0,685	0,157
BM149	0,823	2,000	0,304	0,021	0,280	-0,018
BM154	0,208	12,000	0,860	0,104	0,845	0,014
BM155	0,896	2,000	0,190	0,000	0,178	-0,070
BM164	0,917	4,000	0,157	0,042	0,153	-0,035
BM165	0,458	5,000	0,640	0,063	0,570	0,439
BM175	0,865	5,000	0,248	0,021	0,242	-0,072
BM181	0,771	3,000	0,386	0,042	0,361	0,045
BM183	0,688	5,000	0,502	0,125	0,478	0,227
BM185	0,344	7,000	0,733	0,146	0,689	0,068
BM187	0,365	6,000	0,776	0,042	0,746	0,113
BM200	0,250	12,000	0,832	0,000	0,812	0,095
BM201	0,542	5,000	0,658	0,125	0,628	0,048
BM202	0,469	3,000	0,637	0,104	0,569	0,060
BM211	0,354	9,000	0,786	0,063	0,759	0,116
BM212	0,854	3,000	0,260	0,042	0,244	-0,001
PV005	0,271	7,000	0,824	0,125	0,800	0,053
PV012	0,792	2,000	0,348	0,000	0,316	-0,085
PV025	0,198	10,000	0,878	0,146	0,866	0,058
PV035	0,604	5,000	0,575	0,063	0,530	0,022
PV053	0,823	3,000	0,305	0,021	0,282	-0,079
PV087	0,740	8,000	0,440	0,021	0,425	0,095
PV113	0,552	6,000	0,652	0,167	0,624	0,015
PV163	0,354	15,000	0,827	0,063	0,814	0,125
PV168	0,885	2,000	0,209	0,021	0,198	-0,092
PV251	0,927	2,000	0,137	0,021	0,132	-0,070
<b>Média</b>	<b>0,617</b>	<b>5,533</b>	<b>0,508</b>	<b>0,062</b>	<b>0,484</b>	<b>0,100</b>



**Figura 1.** Dendrograma construído a partir dos dados genéticos dos 30 marcadores SSRs para as 48 cultivares de feijão comum.

## 5. Referências Bibliográficas

BLAIR, M. W., F. PEDRAZA, H. F. BUENDIA, E. GAITÁN SOLÍS, S. E. BEEBE, P. GEPTS & J. TOHME. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and applied genetics**. 107 : 1362-1374.2003.

GOUDET J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices Version 2.9.3. Distributed by the author. **Institut d'Ecologie, Bâtiment de Biologie, Université de Lausanne, Switzerland**.2001.

HORST, W. W. & M. KRISTINA. Identity 1.0. Centre for Applied Genetics. **University of Agricultural Sciences Vienna**.1999.

K. LIU AND S. V. MUSE. Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. **Bioinformatics** 21(9): 2128-2129. 2005.

LEWIS, P. O & D. ZAYKIN. **Genetic Data Analysis**: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c).2001.

ROHLF, F.J. NTSYS-Pc:Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. **Exeter Publishers, New York**. 1989.

**Fonte de Financiamento** - Capes, Embrapa/CNPAP.

---

<sup>i</sup> Aluna de mestrado. Instituto de Ciências Biológicas. UFG. Embrapa/CNPAP. paola@cnpaf.embrapa.br

<sup>ii</sup> Aluna de doutorado. Escola de Agronomia. UFG

<sup>iii</sup> Pesquisadores. Embrapa/CNPAP

<sup>iv</sup> Co-orientador. ICB/UFG. Embrapa/CNPAP

<sup>v</sup> Orientadora. ICB/UFG. Embrapa/CNPAP