

Validação de marcadores microssatélites associados a teores de ferro e de zinco em feijão-comum, em populações de melhoramento

Poliana Regina Carloni Di Prado¹, Thiago Livio Pessoa Oliveira de Souza², Luana Alves Rodrigues³, Marcelo Sfeir de Aguiar⁴, Leonardo Cunha Melo⁵*, Patrícia Guimarães Santos Melo⁶*, Helton Santos Pereira⁷**

A deficiência de ferro e de zinco afeta milhões de pessoas no mundo, principalmente nos países subdesenvolvidos, acarretando graves problemas de saúde pública. Uma das alternativas mais viáveis para combater essa deficiência é a biofortificação, que consiste no aumento dos teores desses minerais via melhoramento genético, sem alterar o sabor dos alimentos e sem custos adicionais aos consumidores. A seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) é uma ferramenta que visa facilitar o processo de melhoramento de plantas. Um dos motivos da baixa eficiência da SAM nos programas de melhoramento nas empresas públicas é o pequeno número de marcadores validados. O objetivo deste trabalho foi validar marcadores moleculares microssatélites (SSR), previamente identificados como ligados a QTLs para teores de ferro e de zinco, em populações de melhoramento, obtidas a partir do cruzamento de linhagens elite para esses caracteres. Inicialmente foram identificados 43 marcadores na literatura e foi possível identificar as sequências dos *primers* de 20, que foram sintetizados. Os 20 SSRs foram testados inicialmente nas linhagens BRS Requite, Porto Real e G 2358, genitores utilizados na obtenção de progênies. Os SSRs que foram polimórficos para os cruzamentos BRS Requite x Porto Real ou BRS Requite x G 2358, foram testados em 58 linhagens F_{4:5} obtidas de cada um destes cruzamentos. Essas linhagens foram avaliadas em campo em um látice 11x11 triplo na safra de inverno/2014 em Santo Antônio de Goiás, GO e os grãos colhidos foram submetidos à análises de teores de ferro e de zinco. Foram coletadas amostras de folhas jovens de dez plantas, para compor um "bulk" de cada um dos genitores e das 116 linhagens para extração do DNA, com base no protocolo CTAB. Em seguida, as reações de amplificação dos marcadores foram conduzidas em termociclador, com temperaturas de anelamento de 55°. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (6%), por cerca de duas horas, e corados com nitrato de prata a 1%. Os SSRs que foram polimórficos entre os cruzamentos BRS Requite x Porto Real e BRS Requite x G 2358 foram selecionados para serem utilizados nas reações de amplificação das linhagens do respectivo cruzamento. Os *primers* selecionados foram marcados com fluorescências (6-FAM™). Os produtos com as reações de amplificação foram separados via eletroforese capilar, conduzida na plataforma ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e genotipados com o auxílio do programa GeneMapper v.3.5 (Applied Biosystems). Inicialmente, os dados genotípicos foram submetidos ao teste de Qui-Quadrado ($\alpha = 5\%$), para verificação da segregação mendeliana. Os dados fenotípicos foram submetidos à análises de variância e foi estimada a herdabilidade. Quando confirmada a segregação, conforme padrão esperado, os dados obtidos da avaliação fenotípica para teores de ferro e de zinco e avaliação molecular das linhagens foram submetidos à análise de associação por marca simples. Os procedimentos estatísticos foram realizados com auxílio do programa QGMOL. Dos 20 SSRs testados apenas um, o marcador BM 154, foi polimórfico, e apenas no cruzamento BRS Requite x Porto Real. Esse marcador também apresentou segregação mendeliana. Existe variabilidade genética entre as linhagens dessa população, evidenciada na análise de variância e confirmada pelas estimativas de herdabilidade (55,8% para teores de ferro e 41,9% para teores de zinco). As médias das linhagens variaram de 50,0 mg kg⁻¹ a 81,5 mg kg⁻¹ para teor de ferro e de 32,3 mg kg⁻¹ a 49,1 mg kg⁻¹ para teor de zinco. A análise de associação por marca simples mostrou que o marcador BM 154 não está associado aos teores de ferro e de zinco. Os coeficientes de determinação foram muito baixos, (0,01 para teores de ferro e 0,03 para teores de zinco), mostrando que o marcador explicou muito pouco da variação fenotípica observada. Os marcadores avaliados, disponíveis na literatura como associados aos teores de ferro e de zinco, apresentaram baixo polimorfismo entre linhagens com altos teores desses minerais e não explicaram a variação fenotípica existente, sendo, portanto, inadequados para utilização em populações de melhoramento, obtidas entre genitores com altas médias.

¹ Bióloga, estudante de doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade Federal de Goiás, estagiária da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, polianacarloni@gmail.com

² Engenheiro-agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, thiago.souza@embrapa.br

³ Bióloga, doutora em Agronomia, analista da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, luana.rodrigues@embrapa.br

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, marcelo.sfeir@embrapa.br

⁵ Engenheiro-agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, leonardo.melo@embrapa.br *Coordenador

⁶ Engenheira-agrônoma, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, professora associada da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, pgsantos@gmail.com *Coordenadora

⁷ Engenheiro-agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, helton.pereira@embrapa.br **Orientador