

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 Lívio 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 Requinte, Porto Real e G 2358, genitores utilizados na obtenção de progêniis. Os SSRs que foram polimórficos para os cruzamentos BRS Requinte x Porto Real ou BRS Requinte 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 eletrociclador, com temperaturas de anelamento de 55º. Os produtos de amplificação foram submetidos a 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 Requinte x Porto Real e BRS Requinte 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 QMOL. Dos 20 SSRs testados apenas um, o marcador BM 154, foi polimórfico, e apenas no cruzamento BRS Requinte 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-agronomo, 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-agronomo, doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, marcelo.sfeir@embrapa.br

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

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

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