

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO TOLERANTES ÀS CONDIÇÕES DE SECA E ALTA TEMPERATURA

LETICIA DA SILVEIRA PINHEIRO^{1,2}, ROSANA PEREIRA VIANELLO BRONDANI¹, MARIA JOSÉ DEL PELOSO¹, CLAUDIO BRONDANI¹

INTRODUÇÃO: O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) é o mais importante legume cultivado para o consumo exclusivamente humano. A produção mundial atualmente excede 23 milhões de toneladas sendo que 7 milhões são produzidos somente na América Latina (Broughton et al., 2002) onde tem-se observado um incremento anual na produtividade em torno de 3% ao ano nas últimas décadas, indicando também um aumento do consumo *per capita* (em média 11 kg por pessoa por ano). No Brasil, cerca de um 1/3 da produção do feijão é cultivada em pequenas propriedades (menos de 10 ha) e as duas regiões de maior consumo do feijão são o Nordeste (18,5 kg *per capita* por ano) e o Sudeste (CIAT, 2002). A seca e as altas temperaturas são alguns dos principais problemas para o cultivo do feijão, sobretudo nos estados do Nordeste do Brasil, e chegam a comprometer a produção em mais de 1,5 milhões de ha do cultivo (Teran and Singh, 2002). O déficit hídrico pode resultar na perda total da cultura, prejudicando principalmente o pequeno agricultor, que geralmente não conta com sistema de irrigação. Diversas variedades de feijão já foram identificadas como tolerantes à seca (Teran and Singh, 2002). A utilização destes genótipos nos programas de melhoramento genético do feijoeiro comum é fundamental para o desenvolvimento de cultivares mais tolerantes à seca. A análise genômica por meio de marcadores moleculares é uma poderosa ferramenta de auxílio a estes programas, permitindo inicialmente uma caracterização detalhada da variabilidade genética dos genótipos tolerantes a seca, e posteriormente, serem utilizados na obtenção de mapas moleculares para identificação de locos relacionados a tolerância a seca, através da análise de QTLs (Quantitative Trait Loci). Este trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética de um conjunto de indivíduos de feijão comum tolerantes à de seca e altas temperaturas por meio de marcadores moleculares do tipo microsatélites.

MATERIAL E MÉTODOS: Foram analisados 76 genótipos de feijão comum resistentes à seca e a altas temperaturas, selecionados pelo programa de melhoramento da Embrapa Arroz e Feijão, provenientes de diversos países e representativos de 9 tipos comerciais de grão. O DNA foi isolado de acordo com Brondani et al. (1998). A quantificação do DNA genômico foi feita em géis de agarose 1%, corados com brometo de etídio. Para a análise molecular foi utilizado um conjunto de 23 marcadores SSRs disponibilizados na literatura e selecionados

¹ Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia, Brasil.

² Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil.

com base em um padrão de amplificação específico e de fácil interpretação. As reações de amplificação foram conduzidas em um volume final de 15 µL. Os reagentes e quantidades utilizadas para cada reação foram 1,5 µL de tampão de reação (10x, acrescido de 15 mM de MgCl₂), 1,3 µL de dNTP (2,5 mM de cada), 0,2 µL de Taq Polimerase (5 unidades/ µL), 2,15 µL de cada primer SSR contendo as sequências *forward* e *reverse* (0,9 µM), 3 µL de DNA (3 ng/ul) e água milliQ estéril para 15 µL. As reações de amplificação de PCR foram conduzidas em termociclador PT-100 Thermal Controller (MJ Research) com a seguinte programação: um pré-ciclo de 92°C por 5 minutos, em seguida 30 ciclos de 92°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, e um passo final de 72°C por 5 minutos. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida 6%, corados com nitrato de prata. Os dados da genotipagem que correspondem à determinação do tamanho dos alelos em pares de base para cada loco foram obtidos através da análise visual para o qual gerou-se uma planilha de dados no programa Excel. Os parâmetros de caracterização molecular dos locos SSRs foram estimados utilizando os programas GDA e FSTAT. A análise de diversidade genética foi efetuada utilizando o programa NTSYS considerando os 76 genótipos, e 6 análises adicionais de diversidade envolvendo genótipos pertencentes a grupos de tipo de grão com no mínimo 2 genótipos. O programa Identity foi utilizado para a obtenção dos valores de Probabilidade de Identidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: Dos 23 locos SSR genotipados nos 76 indivíduos, 14 foram selecionados por detectar variabilidade alélica e apresentarem produtos de amplificação com boa qualidade. A probabilidade de identidade combinada para os 14 marcadores SSRs foi de 4.09×10^{-10} , a qual corresponde à probabilidade de serem identificados dois genótipos idênticos devido ao acaso. Foram identificados um total de 120 alelos, tendo sido encontrado o máximo de 18 alelos para o loco PV12 e mínimo de 3 alelos para o loco BM159, com uma média de 8,6 alelos por marcador. Esta estimativa é superior as relatadas por Gaitán-Sólis et al. (2002), com uma média de 6 alelos/loco analisando 21 genótipos de feijão, e Masi et al. (2003), que encontrou uma média de 4,3 alelos/loco analisando 264 variedades tradicionais de feijão utilizando 30 SSRs (Masi et al., 2003). Dentre os marcadores que detectaram maior número de alelos por loco, destacaram-se os marcadores PV05, PV12, BM200 e BM211, com média de 15,5 alelos por loco. Os SSRs que detectaram menor número de alelos/loco foram PV11, PV13, BM159 e BM142, com 3,75 alelos/loco. As estimativas de PIC (Polymorphism Information Content) variaram de 0,05 para o loco BM142 a 0,89 para o loco BM211, com uma média de 0,5. Os maiores valores de PIC, acima de 0,85, foram detectados para os locos PV05, PV12, PV25 e BM211, e devido a estes altos valores, podem ser utilizados para estudos de caracterização molecular do germoplasma de feijão. Foram identificados 29 alelos privados, e os SSRs que mais detectaram foram o marcador PV12, com 4 alelos, e o marcador BM200, com 8 alelos. A partir da matriz de distância genética estimou-se, para o grupo de 76 genótipos, uma distância gênica média, obtida com o

coeficiente Rogers, modificado por Wright (Rogers-W) de 0,63 e um índice cofenético (r) de 0,68. Com os dendrogramas dos grupos de genótipos agrupados pelo tipo de grão, observou-se que os grupos de grão Branco e Carioca apresentaram os maiores índices de distância gênica média, com 0,90 e 0,92, respectivamente. A maior distância genética média encontrada entre os genótipos destes dois grupos indica que a variabilidade genética existente pode ser explorada através da seleção dos genótipos geneticamente divergentes como genitores, dentro destes grupos de grão, para o programa de melhoramento genético do feijoeiro para tolerância a seca.

CONCLUSÕES: A determinação da diversidade genética entre os genótipos de feijão obtida com marcadores SSRs está tornando possível o estabelecimento de novas estratégias para a seleção e identificação de genitores para o programa de melhoramento genético do feijoeiro, através da escolha dos genótipos mais divergentes, para a ampliação da sua base genética, e geração de linhagens com maior possibilidade de se obter maiores ganhos com a seleção para as características de tolerância à seca e à alta temperatura. A caracterização molecular possibilitou identificar e indicar grupos de marcadores SSRs com maiores valores de PIC que serão úteis em outros estudos de análise genômica de feijão. A partir das informações de análise genômica em genótipos de feijão por meio de marcadores SSR, está sendo montado um banco de dados baseado no número e frequência de alelos, o qual será estratégico para consolidar esta metodologia como importante apoio no gerenciamento da variabilidade genética disponível aos programas de melhoramento genético desta cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BROUGHTON, W.J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P., VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus spp.*) – model food legumes. **Plant and Soil** 252:55-128, 2003.
- CIAT_Centro Internacional de Agricultura Tropical 2002. **Common bean improvement**. Cali, <http://www.ciat.cgiar.org/beans/index.htm> .16 maio, 2002).
- GAITÁN-SOLÍS, E.; DUQUE, M. C.; EDWARDS, K. J.; TOHME, J. Microsatellite Repeats in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, Characterization, and Cross-Species Amplification in *Phaseolus* sp. **Crop Science** 42:2128-2136, 2002.
- MASI, P.; SPAGNOLETTI ZEULI, P. L.; DONINI, P. Development and analysis of multiples microsatellite markers sets in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Molecular Breeding** 11:303-313, 2003.
- SINGH, S. P. Broadening the Genetic Base of Common Bean Cultivars: A Review. **Crop Science** 41:1659-1675, 2001.
- TÉRAN, H.; SINGH, S. P. Comparison of Sources and Lines Selected for Drought Resistance in Common Bean. **Crop Science** 42:64-70, 2002.