

Diversidade genética entre cultivares de feijão carioca da Embrapa estimada com base em marcadores microssatélites

Ana Paula Simplício Mota¹, Rosana Pereira Vianello^{2*}, Carlos Eduardo Araújo Batista³, Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes⁴, Thiago Lívio Pessoa Oliveira Souza⁵

Resumo

A caracterização genética de cultivares de feijoeiro comum utilizadas como genitores é uma importante aliada para os melhoristas na avaliação precisa do nível de variabilidade genética contida nos ensaios, bem como na determinação da identidade genética dos materiais genéticos, podendo ser útil também para fins de desenvolvimento de novas linhagens elite. O objetivo desse estudo foi analisar a diversidade genética, por meio de 121 marcadores microssatélites, entre oito cultivares de feijão carioca desenvolvidas e lançadas no Brasil pela Embrapa, são elas: BRS Notável, BRS Estilo, BRS Ametista, BRS Pontal, BRS Horizonte, BRS Cometa, Pérola e Cometa. A opção pela análise com SSRs fluorescentes foi devido ao seu elevado multialelismo, co-dominância, fácil acesso e genotipagem semi-automatizada. Este conjunto de marcadores detectou ao todo 247 alelos e os valores da diversidade genética variaram de 22 a 85%, com média de 46%. Apenas 12,64% dos locos analisados detectaram genitores em heterozigose, indicando que a base genética dos mesmos é homogênea. A partir dos resultados obtidos comprova-se que o número de SSRs analisados foi adequado e que a informatividade genética de cada loco também deve ser considerada para detectar com precisão a diversidade genética entre as cultivares.

Introdução

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma importante espécie leguminosa, sendo muito utilizada mundialmente para o consumo humano, sobretudo por ser uma boa fonte de proteínas, fibras, minerais e vitaminas (Montoya, 2010). No Brasil, é a quarta cultura de grãos mais produzida. Em 2011, a área total cultivada foi de 2,024 milhões de hectares e a produtividade média foi de, aproximadamente, 1.350 kg/ha (FEIJÃO, 2013).

Apesar do Brasil estar entre os países principais produtores de feijão, assumindo o papel de maior produtor mundial durante muitos anos, a produtividade média nacional ainda é considerada baixa. Alguns fatores explicam esta situação, como a alta incidência de doenças e pragas, baixa utilização de sementes certificadas, cultivo em condições climáticas adversas e de deficiências nutricionais. Além da melhoria de práticas culturais, uma alternativa viável do ponto de vista econômico e ambiental encontrada por pesquisadores é o desenvolvimento de cultivares superiores, mais resistentes a estresses bióticos e abióticos, mais produtivas e com melhor qualidade de grãos, além de adaptadas à colheita mecanizada.

Segundo Souza et al. (2013), o programa de melhoramento da Embrapa Arroz e Feijão enfatiza o melhoramento de cultivares de feijão carioca, pois esse tipo comercial representa 70% do consumo de grãos no país, devido à sua maior aceitação no mercado. Estratégias como cruzamentos múltiplos, transgenia, seleção recorrente e seleção assistida por marcadores moleculares têm sido utilizadas para maximizar os ganhos genéticos para as diferentes características alvo do programa.

Nos programas de melhoramento do feijoeiro, os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados como ferramenta para auxiliar o planejamento de cruzamentos e a escolha de genitores, bem como a caracterização da identidade genética de cultivares, uma vez que possibilitam uma análise genética mais aprofundada dos genótipos através de estudos de diversidade genética (Faleiro, 2011).

O objetivo desse estudo foi estimar a diversidade genética, por meio de 121 marcadores microssatélites, de oito cultivares de feijão carioca desenvolvidas e lançadas no Brasil pela Embrapa, são elas: BRS Notável, BRS Estilo, BRS Ametista, BRS Pontal, BRS Horizonte, BRS Cometa, Pérola e Cometa.

¹ Graduanda do curso de Agronomia – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO. Estagiária - Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO. E-mail: anapaula_pjb@hotmail.com

² Pesquisadora - Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO. E-mail: rosana.vianello@embrapa.br

³ Pós-doutorando - Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO. E-mail: carlos.batista@colaborador.embrapa.br

⁴ Professor Adjunto - Instituto Federal Goiano (IFG), Urutaí, GO. E-mail: ivan.menezes@ifgoiano.edu.br

⁵ Pesquisador - Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO. E-mail: thiago.souza@embrapa.br

* Autor para correspondência

Material e Métodos

Foram analisadas oito cultivares de feijão do grupo comercial carioca desenvolvidas e lançadas pela Embrapa e parceiros, selecionadas com base no seu alto potencial produtivo, características morfo-agronômicas favoráveis, reação às principais doenças que acometem a cultura do feijão e sua aceitação comercial (Tabela 1).

Plantas destas cultivares foram conduzidas em casa de vegetação e o material foliar foi coletado de folhas trifolioladas, sendo uma planta para cada cultivar. Após a coleta, as amostras foliares foram mantidas sob refrigeração e transportadas até o Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão, onde foram estocados em freezer a -20 °C até o momento da extração do DNA genômico.

O protocolo utilizado para a extração de DNA foi o descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998) e Brondani et al., (2007). Neste método, o isolamento de DNA total das plantas é realizado utilizando-se o detergente catiônico CTAB. A quantificação do DNA extraído foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose (1%) e documentado por fotografia sob luz UV usando um transluminador e o programa computacional QuantityOne. Após o processo de quantificação do DNA, a concentração de cada amostra foi ajustada para 5ng/μL por diluição com água mili-Q.

Para a realização do trabalho foram utilizados 56 sistemas de genotipagem multiloco semi-automatizada (multiplex), contendo 121 locos microssatélites fluorescentes (FAM, NED e HEX), com elevado conteúdo informativo. As amplificações foram realizadas em termociclador. Estas incluíram uma etapa inicial de desnaturação da fita de DNA molde a 95°C por 15 minutos, seguida por 40 ciclos de 94°C por 30 segundos e um minuto e meio com temperatura de anelamento de 56°C. Ao final de cada ciclo ocorreu uma extensão final de 72°C por mais 10 minutos.

Os fragmentos amplificados foram separados via eletroforese capilar conduzida na plataforma ABI 3100 GeneticAnalyzer (AppliedBiosystems) utilizando o filtro “D” para a detecção das fluoresceínas, de um modo totalmente automatizado. Os dados foram processados usando o programa Foundation Data Collection 2.0 (AppliedBiosystems), sendo analisados com o auxílio do programa GeneMapper 3.5 (AppliedBiosystems). Os dados genotípicos foram anotados separadamente para cada indivíduo em uma planilha de dados no formato Excel, para fins de análise.

O número de alelos por loco, a diversidade genética e a heterozigosidade observada foram calculadas utilizando o programa PowerMarker (Liu; Muse, 2005). A distância genética foi estimada utilizando o método proposto por Rogers, modificada por Wright e a construção do dendrograma baseada no método de agrupamento UPGMA, ambos com o auxílio do programa do programa Ntsys-pc (Rohlf, 2000).

Tabela 1. Cultivares de feijoeiro comum do grupo comercial carioca desenvolvidas pela Embrapa e parceiros e suas principais características morfo-agronômicas

Cultivar	Genealogia	Origem da linhagem/Local cruzamentos	Resistência à doenças	Ano de registro no MAPA	Produtividade máxima em VCU (Kg/ha)
Rudá	CARIOCA / RIO TIBAGI	CIAT	AN ² , MC ⁵	1992	3.512
BRS Estilo	EMP 250 /4/ A 769 /// A 429 / XAN 252 // V 8025 /PINTO VI 114	CIAT	MC	2009	4.011
BRS Cometa	A 769 /4/ EMP 250 /// A429 / XAN 252 // C 8025 / G4449 /// WAF 2 A55/GN 31 / XAN 170	CIAT	CBC ³ , FER ⁴ , MC	2006	2.749
Pérola	CARIOCA // MEXICO168 / BAT76	Embrapa Arroz e Feijão	MC, FO ⁶	1994	3.903
BRS Horizonte	EMP250 /4/ A 769 /// A 429 / XAN 252 // PINTO VI 114	CIAT	AN, FER, MC	2004	2.771
BRS Notável	A 769 /4/ A 774 /// A 429 / XAN 252 //V 8025 / G 4449 /// WAF 2 / A55 //GN 31 /XAN 170	CIAT ¹	AN, CBC, FER, MC, FO	2011	4.472

BRS Ametista	PR9115957 / LR720982CP	Embrapa Arroz e Feijão	AN, CBC, FER, MC, FO	2011	4.176
BRS Pontal	BZ3836 // FEB 166 / AN 910523	Embrapa Arroz e Feijão	AN, CBC, FER, MC	2004	4.271

¹CIAT – Centro Internacional de Agricultura Tropical, ²Antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*); ³Crestamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*); ⁴Ferrugem (*Uromyces appendiculatus*); ⁵Mosaico comum (VMCF: vírus do mosaico comum do feijoeiro); e ⁶Murcha de fusário (*Fusarium oxysporum*)

Resultados e Discussão

Dos 121 marcadores analisados nas oito cultivares que compuseram o experimento, 87 foram polimórficos (72%). Foram identificados 247 alelos, com média de 2,44 alelos por loco polimórfico, variando de dois alelos para os locos BM157, BM114, BM165, BM201, BM211, BM151, BM205, PV123, PV81, PV162, PV218, PVESTBR293, PV83, PVESTBR272, PVESTBR336, PV55, PVESTBR23, PVESTBR75, PVESTBR26, PVESTBR186, BM160, PVESTBR114, PVESTBR88, PVESTBR198, PVESTBR08, PVESTBR99, PVESTBR01, PVESTBR83, PV235, PVESTBR361, PVESTBR202, PVESTBR10, PVESTBR226, BMD03, BMD40 a sete para o loco PVESTBR72.

A diversidade genética média para o total de locos foi de 46%, variando entre 85% para o loco PVESTBR72 e 22% para os locos BM157, BM114, BM211, BM151, PVESTBR293, PVESTBR336, PV55, PVESTBR23, PVESTBR26, BM160, PVESTBR099, PVESTBR202, PVESTBR10, BMD36, PV193, PV87, PVESTBR267, PVESTBR90, BMY06 e PVESTBR257. Os resultados corroboram estimativas previamente obtidas para um conjunto de cultivares de feijão do grupo comercial carioca (47%), conforme relatado por Perseguini et al. (2011).

De modo geral, verificou-se uma elevada heterogeneidade das cultivares estudadas, conforme indicado pelo $H_E = 0,462$, constatando assim a baixa homogeneidade dos locos microssatélites avaliados entre as cultivares. Apenas 11 entre os 87 marcadores polimórficos detectaram genótipos em heterozigose, o que pode ser devido à mistura de plantas homocigotas para diferentes alelos na mesma cultivar (Borba, 2005). As distâncias genéticas obtidas entre as cultivares são apresentadas na Tabela 2. A menor distância foi obtida entre BRS Ametista e BRS Notável (25%), sendo que a maior observada foi entre BRS Horizonte e BRS Estilo (76%), apesar de possuírem genealogias similares. Os resultados de distância genética fornecem um indicativo do potencial em se obter combinações alélicas diferenciadas, além de auxiliar na determinação da identidade genética das cultivares. A análise de agrupamento determinou a formação de dois grupos: o primeiro grupo foi composto por um subgrupo contendo as cultivares BRS Notável e BRS Ametista e outro unitário com a BRS Horizonte; e o segundo grupo foi formado por um subgrupo com Rudá, Pérola e BRS Estilo e um unitário com a BRS Pontal (Figura 1).

De acordo com os resultados descritos, é possível concluir que os genótipos analisados apresentaram um perfil genético distinto entre si, indicando que o conjunto de locos microssatélites utilizados foi eficiente para a discriminação dos cultivares de feijão carioca da Embrapa. Apesar de todas as cultivares pertencerem ao tipo carioca, constata-se que são divergentes entre si e que a variabilidade genética necessária aos programas de melhoramento está sendo mantida.

Tabela 2. Matriz de distâncias genéticas entre cultivares de feijão carioca da Embrapa estimadas com base na análise de 87 locos microssatélites polimórficos.

	Rudá	BRS Estilo	BRS Cometa	Pérola	BRS Horizonte	BRS Notável	BRS Ametista	BRS Pontal
Rudá	0							
BRS Estilo	0,711	0						
BRS Cometa	0,669	0,735	0					
Pérola	0,62	0,69	0,761	0				
BRS Horizonte	0,693	0,769	0,715	0,765	0			
BRS Notável	0,678	0,715	0,69	0,715	0,719	0		
BRS Ametista	0,684	0,735	0,686	0,773	0,723	0,251	0	
BRS Pontal	0,678	0,758	0,723	0,791	0,742	0,731	0,731	0

^aDistâncias genéticas obtidas a partir da medida de Rogers-Wright.

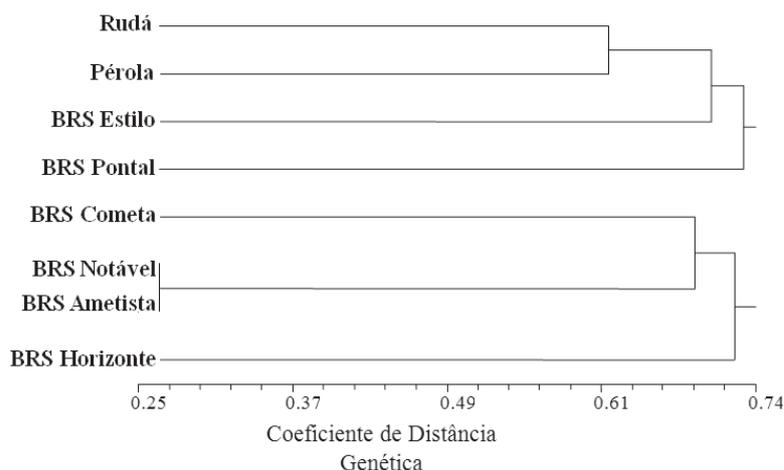


Figura 1. Dendrograma obtido a partir dos dados da matriz de distâncias genéticas entre cultivares de feijão carioca da Embrapa (Tabela 1), utilizando o método UPGMA.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Embrapa Arroz e Feijão e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo apoio.

Referências

- Borba TCOB (2005) Análise por marcadores SSR dos grupos de genótipos melhorados e introduzidos da coleção nuclear brasileira do arroz. Dissertação de mestrado: Programa de Genética e Melhoramento de Plantas (UFG).
- Brondani RPV, Brondani C, Grattapaglia D (2007) Manual prático para o desenvolvimento de marcadores microssatélites em plantas. Embrapa Informação Tecnológica, Goiânia, 111p.
- Faleiro FG, Andrade SEM, Reis Junior FB (2011) Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária. Embrapa Cerrados, Brasília, 730p.
- FEIJÃO - Dados de Conjuntura da Produção de Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e Caupi [*Vigna unguiculata* (L.) no Brasil (1985 - 2011). Acessado em maio de 2013. Disponível em <<http://www.cnpf.embrapa.br/>>.
- Ferreira ME, Grattapaglia, D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa Cenargem, Brasília, 220p.
- Liu K, Muse SV (2005) PowerMarker. Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* 21:2128-2129.
- Montoya CA, Lallés JP, Beeb, S (2010) Phaseolin diversity as a possible strategy to improve the nutritional value of common beans. *Food Research International* 43: 443-449.
- Perseguini JM KC, Chioratto AF, Zucchi MIZ (2011). Genetic diversity in cultivated carioca common beans based on molecular marker analysis. *Genetics and Molecular Biology Field Crops Research* 88:102.
- Rohlf FJ (2000) NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 2.1. New York: Exeter Software 98p.
- Souza TLPO, Pereira HSP, Faria, LC (2013) Cultivares de feijão comum da Embrapa e parceiros disponíveis para 2013. Embrapa Arroz e Feijão (Comunicado Técnico, 211).