

ELABORAÇÃO DE UM PAINEL DE DIVERSIDADE PARA FINS DE MAPEAMENTO ASSOCIATIVO EM FEIJÃO COMUM

JÉSSICA F. **MARÇAL**¹; JULIANA M.K.C. **PERSEGUINI**²; GLICIANE M. B. **SILVA**³; SÉRGIO A. M. **CARBONELL**⁴; ALISSON F. **CHIORATTO**⁵; LUCIANA B. **RUBIANO**⁶.

Nº 11117

RESUMO

O feijão comum é uma espécie com centros primários e secundários de diversidade na América do Sul. Devido ao contínuo processo de introdução de novos genótipos, algumas coleções contêm elevado número de acessos, dificultando o propósito da utilização da variabilidade existente nos bancos de germoplasma para fins de conservação e melhoramento genético. Um total de 500 genótipos de feijão comum pertencentes ao Banco de Germoplasma do IAC foram selecionados de acordo com características agrônômicas relevantes para a cultura foram selecionados para realizar a análise da diversidade genética de diferentes tipos de feijão comum a fim de constituir um painel para mapeamento associativo da espécie, sendo que para empreender esta análise marcadores moleculares do tipo microssatélites foram selecionados. No total, 58 microssatélites foram utilizados, sendo 15 genômicos e 43 gênicos (SSR-ESTs). Os 500 acessos foram divididos em 15 grupos distintos pelo programa Structure com forte correspondência com os agrupamentos revelados pelo dendrograma. O painel de diversidade foi obtido pela seleção de cultivares de maior interesse para o programa de melhoramento e pelos acessos mais divergentes, e apresentou 97,5% da diversidade genética observada no conjunto original, indicando que o critério de seleção foi eficiente. Os 180 acessos selecionados serão utilizados para fins de mapeamento associativo e poderão ser aproveitados pelos melhoristas para direcionar novos cruzamentos e gerar cultivares elites que atendam as necessidades de mercado desta cultura.

¹ Aluna de iniciação científica do Instituto Agrônomo (IAC), Caixa Postal 28, 13012-970, Campinas, SP, E-mail: jessica_marcal@yahoo.com.br.

² Co-orientadora: Aluna de doutorado do Programa de Pós-graduação em da UNICAMP, Campinas, SP, E-mail: julianamorini@hotmail.com.

³ Colaborador: Aluna de mestrado do Programa de Pós-graduação em Agricultura Tropical e Subtropical do Instituto Agrônomo (PG/IAC), Caixa Postal 28, 13012-970, Campinas, SP, E-mail: cwind@gmail.com.

⁴ Colaborador: Pesquisador do Instituto Agrônomo (IAC), Centro de Grãos e Fibras, Caixa Postal 28, 13012-970, Campinas, SP, E-mail: carbonel@iac.sp.gov.br.

⁵ Colaborador: Pesquisador do Instituto Agrônomo (IAC), Centro de Grãos e Fibras, Caixa Postal 28, 13012-970, Campinas, SP, E-mail: afchiorato@iac.sp.gov.br.

⁶ Orientadora: Pesquisadora do Instituto Agrônomo (IAC), Centro de P&D Recursos Genéticos Vegetais, Caixa Postal 28, 13012-970, Campinas, SP, E-mail: llasry@iac.sp.gov.br.

*Apoio financeiro: FAPESP, CNPQ.

ABSTRACT

The common bean is a species with primary centers and side of diversity in South America due to the continuous process introduction of new genotypes, some collections contain high number of hits, purpose of hindering the use of variability in banks germplasm for conservation and breeding. A total of 500 bean genotypes belonging to the Germplasm Bank of the IAC were selected based on agronomic characteristics relevant to the culture were selected to perform the analysis of genetic diversity of different bean types to constitute a panel for the associative mapping species, and to undertake this type of molecular marker analysis microsatellites were selected. In total, 58 microsatellites were used, being 15 and 43 genomic gene (SSR-ESTs). The 500 accessions were divided into 15 distinct groups with the program Structure strong correspondence with the groups revealed by the dendrogram. The panel diversity was obtained by selection of cultivars of most interest to the improvement program and the most divergent accessions, and showed 97.5% of genetic diversity observed in the original set, indicating that the criterion of selection was effective. The 180 selected accessions will be used for associative mapping could be used by breeders to target new intersections and generate elite varieties that meet market needs this culture.

INTRODUÇÃO

A variabilidade genética é a maior garantia da estabilidade de produção e da sobrevivência humana, no entanto a evolução da produtividade agrícola tem se baseado, principalmente, na uniformidade genética, aumentando continuamente a vulnerabilidade genética das espécies cultivadas e o risco de perdas por doenças. Neste contexto, se fazem necessários estudos de diversidade a fim de se manter o máximo da variabilidade disponível e de se obter maiores informações sobre os genótipos avaliados, possibilitando maior utilização dos mesmos nos programas de melhoramento, principalmente em casos onde se deseja reunir alelos desejáveis em um único indivíduo (Nass et al. 2001).

Os Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) conservam materiais diversos com elevada variabilidade genética, sendo possível localizar desde variedades melhoradas, até espécies silvestres, que possuem características de interesse econômico e fornecem informações importantes aos melhoristas (Chiorato et al. 2007).

Neste contexto, o presente trabalho teve dois objetivos principais: a) acessar a variabilidade genética contida em 500 acessos do Banco Ativo de Germoplasma do Feijoeiro do IAC; b) selecionar 180 acessos que representem o máximo da diversidade genética existente na coleção que serão utilizados em estudos de mapeamento associativo. Dentre as principais características de interesse agrônomo exploradas nestes acessos estão: fontes de resistência para as principais doenças que atingem a cultura (antracnose, mancha-angular, ferrugem, fusariose, crestamento bacteriano e mosaico-dourado), fontes de tolerância ao estresse hídrico e variações morfológicas quanto ao tamanho e coloração de grãos.

MATERIAL E MÉTODOS

O Banco de Germoplasma de Feijão do IAC possui cerca de 1.800 acessos, dos quais foram selecionados 500 genótipos com características de interesse agrônomo para empreender este estudo. Os genótipos selecionados são compostos por linhagens e cultivares que apresentam alta variabilidade quanto à morfologia dos grãos, fatores bióticos, como resistência a pragas e doenças, e fatores abióticos, como tolerância ao estresse hídrico. O DNA das amostras foi extraído a partir de pó de folhas liofilizadas usando o método de extração do CTAB. Para o estudo de diversidade genética foram utilizados um total de 58 marcadores microssatélites, sendo que destes 43 são SSR-ESTs (Hanai et al. 2007) e 15 são SSRs genômicos, que foram mapeados em feijão comum (Campos et al. 2010, Baroni 2010). Um total de 58 microssatélites foram selecionados, sendo que a genotipagem dos produtos amplificados foram realizados em gel de poliacrilamida 6% e corados com nitrato de prata.

As distâncias genéticas foram calculadas utilizando a distância modificada de Rogers, através do programa TFPGA, versão 1.3. As matrizes de similaridade/distância foram analisadas por UPGMA. Os marcadores SSRs foram analisados pelo número de alelos por loco, pela frequência alélica por loco, pelo conteúdo de polimorfismo (PIC) e pela análise do poder discriminatório (DP).

Com base na estatística bayesiana, o programa Structure (Pritchard et al. 2000) foi utilizado alternativamente para inferir o número de grupos (K).

O procedimento de re-amostragem (*Bootstrap*) foi utilizado para verificar a precisão do número de SSRs polimórficos a serem utilizados para calcular as estimativas das distâncias genéticas entre os pares de genótipos estudados. Esta análise foi realizada pelo programa R (R, www.r-project.org), onde cada conjunto de bandas polimórficas referente ao marcador molecular foi submetido a um processo de 500 amostragens randômicas, com reposição.

RESULTADO E DISCUSSÕES

A diversidade genética entre os 500 genótipos de feijão comum foi estimada utilizando-se 15 marcadores SSR-genômicos e 43 SSR-ESTs, que forneceram um total de 200 locos informativos. O número médio de alelos por loco dos SSR-genômicos foi de 3,73, variando de 2 a 10 alelos, enquanto a média dos SSR-ESTs foi de 3,35, embora tenha variação de 2 a 12 alelos, sendo que os maiores números de alelos observados foram encontrados nos locos SSR-IAC66 e PvM21. Estes valores são superiores aos encontrados por Perseguini et al. (2011). No entanto, os resultados do presente estudo foram semelhantes aos de Hanai et al. (2007), que avaliaram 40 SSR-genômicos e 40 SSR-ESTs em 23 genótipos de feijão comum de origem Mesoamericana e Andina e 2 genótipos de espécies relacionadas. Do total de marcadores, 26 SSR-genômicos e 31 SSR-ESTs apresentaram padrão polimórfico, sendo que foi encontrado de 2 a 7 alelos por loco, com exceção de um loco (PvM21) que também apresentou 12 alelos.

O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,26 a 0,86 para os marcadores genômicos e de 0,17 a 0,86 para os marcadores gênicos, sendo que os locos com valores mais elevados de PIC foram o SSR-IAC66 e o SSR-EST PvM21. Os valores do poder discriminatório (DP) dos marcadores variaram de 0,28 (SSR-IAC24) a 0,87 (SSR-IAC66) para os SSR-genômicos e de 0,21 (PvM68 e PvM98) a 0,90 (PvM21) para os SSR-ESTs. Neste sentido, os elevados valores de PIC e de DP obtidos pelos marcadores SSR-IAC66 e PvM21 revelam grande potencial para acessar a diversidade genética presente entre os acessos.

O gráfico de *box-plot* (Figura 1) revelou que o coeficiente de variação (CV) de 10% foi obtido para um número aproximado de 33 marcadores, demonstrando que o número utilizado de SSRs foi mais do que o suficiente para acessar adequadamente a variabilidade genética contida no conjunto de genótipos avaliado.

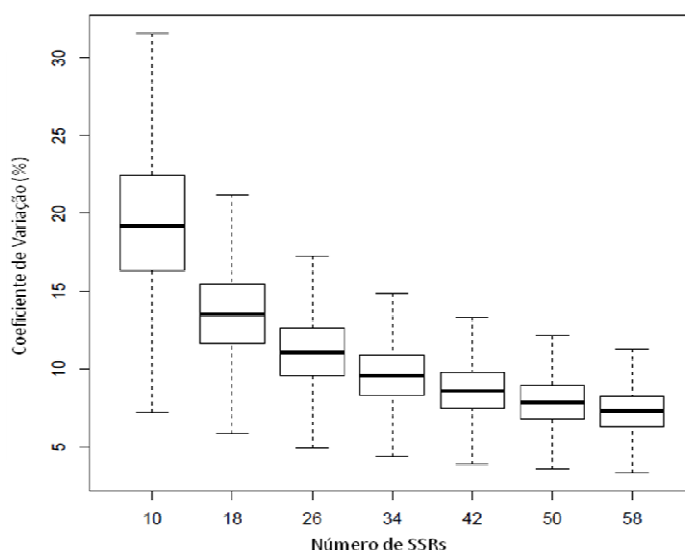


Figura 1. Gráfico de boxplot obtido pela análise *bootstrap* dos dados gerados pela genotipagem dos 500 acessos de feijão com 58 marcadores do tipo microsatélites.

Estudos têm mostrado que a precisão de medições de distância genética é mensurada através de um CV médio de 10% (Perseguini et al. 2011). Neste sentido, é possível presumir que o número de marcadores utilizados para acessar a variabilidade genética do conjunto avaliado no presente estudo foi suficiente para explicar a diversidade genética existente. As distâncias genéticas entre os 500 genótipos de feijão calculada de acordo com a distância modificada de Rogers variaram de 0,13 a 0,88, sendo que foi possível constatar que há uma elevada variabilidade presente nos acessos avaliados. De acordo com as análises do Structure o melhor agrupamento obtido pelo Structure é determinado pela divisão dos 500 genótipos em 15 grupos, sendo que os agrupamentos gerados pelo Structure correspondem com os agrupamentos observados no dendrograma.

Uma painel genético contendo 180 genótipos foi formado dentre os 500 acessos do BAG do feijoeiro do IAC. Neste painel que será utilizado para estudos de mapeamento associativo foram

incluídos 75 acessos de grande importância para o programa de melhoramento genético do IAC, sendo que maioria destes possui grãos do tipo carioca, e foram selecionados outros 105 acessos mais divergentes geneticamente, tomando por base os agrupamentos fornecidas pela análise de UPGMA e pelo Structure, sendo que para a formação do painel foi considerado que este deve ter em sua composição genótipos contrastantes para resistência a antracnose, mancha angular, tolerância ao déficit hídrico e diferentes concentrações de ferro e zinco.

O novo conjunto de acessos, analisado pelos mesmos 58 microssatélites, forneceu um total de 195 alelos, ou seja, a coleção nuclear manteve 97,5% da diversidade genética contida na coleção original de 500 acessos. Assim como na coleção base, o número de alelos presentes no painel associativo variou entre 2 e 10 alelos para os SSR-genômicos e entre 2 e 12 alelos para os SSR-ESTs. No entanto, o valor médio de alelos por loco caiu de 3,73 (SSR-genômicos) e 3,35 (SSR-ESTs) para 3,66 e 3,26, respectivamente. Os maiores valores de PIC e de DP foram de 0,87 e 0,96 para o SSR-IAC66 e de 0,86 e 0,97 para o SSR-EST PvM21 respectivamente, evidenciando a alta capacidade discriminatória dos marcadores, embora todos os outros marcadores também tenham apresentado elevados valores de PIC e de DP.

Os dados genotípicos dos 180 acessos de feijão do BAG do IAC foram utilizados para estimar as distâncias genéticas, através da Distância Modificada de Rogers, e gerar o dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA, cujos coeficientes das distâncias variaram entre 0,13 a 0,88, sendo idênticos aos observados anteriormente entre os 500 acessos. Para melhor entendimento dos agrupamentos foi utilizado o programa Structure, sendo que por meio desta análise os 180 genótipos foram melhor divididos em quatro grupos distintos (Figura 2), sendo que esta divisão foi atribuída a diferença do tamanho de grão de cada tipo de genótipo e a ao programa de melhoramento ao qual pertencem. Tendo em vista que cada instituição de melhoramento tem um objetivo, que se configura em uma pressão de seleção como o caso do IAC, onde os principais objetivos são obter cultivares de maior produtividade e resistência as principais doenças que acometem a cultura do feijoeiro, é esperado que ocorra uma divisão dos genótipos de acordo com a pressão de seleção a que estão sendo submetidos. Esta tendência dos feijões em agrupar-se de acordo com as instituições de melhoramento foi relatada em grupos de genótipos de um mesmo conjunto gênico, como é o caso dos feijões pertencentes ao grupo Carioca (Perseguini et al. 2011).

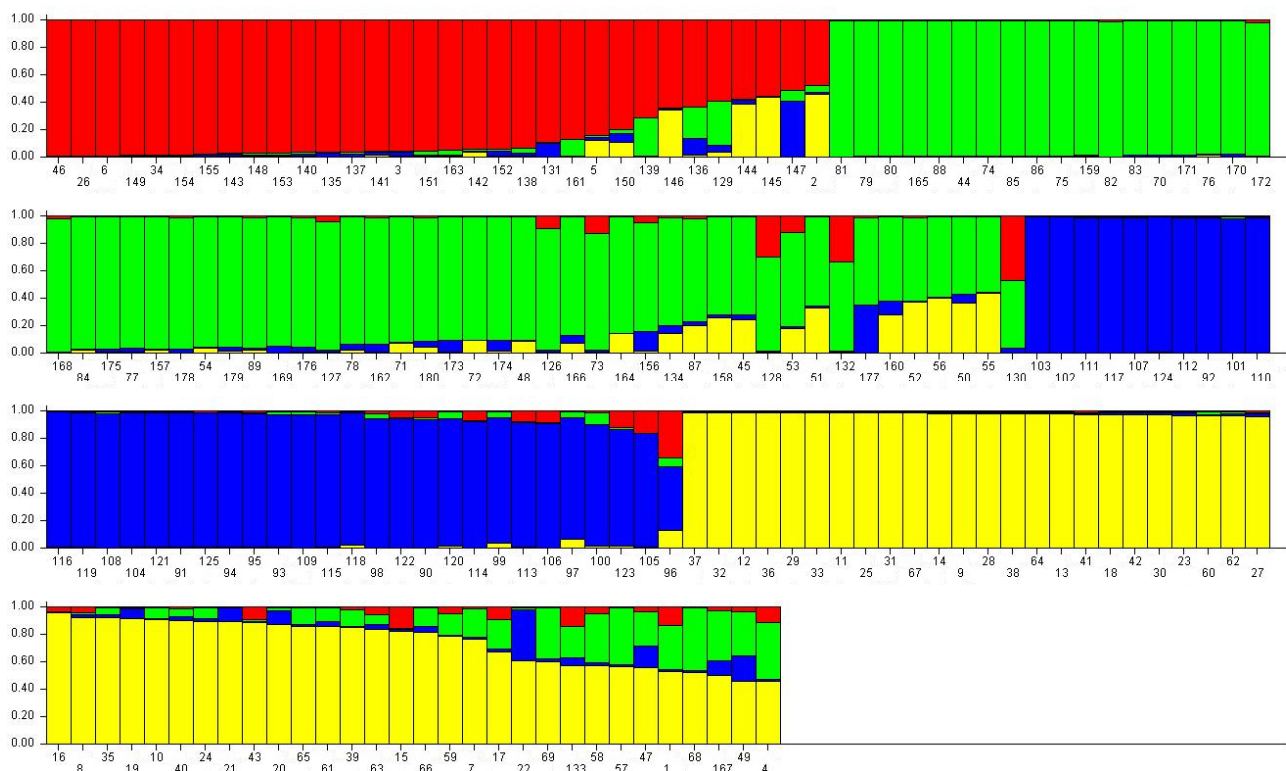


Figura 2. Representação dos 180 genótipos de feijão comum de acordo com a análise bayesiana do programa Structure. Os acessos avaliados foram divididos em 4 grupos (K=4).

CONCLUSÃO

Os 15 marcadores SSR-genômicos e os 43 SSR-ESTs foram suficientes e eficientes para acessar a diversidade genética presente nos 500 acessos de feijão comum do Banco Ativo de Germoplasma do IAC.

Os agrupamentos gerados pela estatística bayesiana do programa Structure foram mais eficientes do que os gerados pelo método UPGMA para acessar a diversidade genética entre os 500 acessos do BAG e dentro do painel de diversidade, além de fornecer maior entendimento da estruturação entre os acessos avaliados.

O agrupamento por UPGMA correlacionado com os agrupamentos do Structure forneceram uma excelente ferramenta de trabalho para os melhoristas, auxiliando no direcionamento de próximos cruzamentos a serem realizados.

O painel de diversidade contendo 180 genótipos representa mais de 97% da variabilidade genética contida no conjunto original de 500 indivíduos e será utilizado para fins de mapeamento associativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baroni RM. (2010) **Mapeamento de locos de resistência à antracnose em feijoeiro**. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia). Instituto Agrônomo – IAC, Campinas, 79p.

Campos T, Oblessuc PR, Sforça DA, Cardoso JMK, Baroni RM, Sousa ACB, Carbonell SAM, Chioratto AF, Rubiano LLB, Souza AP (2010) Inheritance of growth habit detected by genetic linkage analysis using microsatellites in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Molecular Breeding**, DOI 10.1007/s11032-010-9453-x.

Chiorato, A.F.; Carbonell, S.A.M.; Benchimol, L.L.; Chiavegato, M.B.; Dias, L.A.S; Colombo, C.A. Genetic diversity in common bean accessions evaluated by means of morpho-agronomical and RAPD data. **Scientia Agricola**, v.64, n.3, p.256-262, 2007.

Hanai LL, Campos T, Camargo LEA, Benchimol LL, Souza AP, Melotto M, Carbonell SAM, Chioratto AF, Consoli L, Formighieri EF, Siqueira MVBM, Tsai TM, Vieira MLC (2007) Development, characterization and comparative analysis of polymorphism at common bean-SSR loci isolated from genic and genomic sources. **Genome**, v.50, p.266-277.

Nass, L.L.; Valois, A.C.C.; Melo, I.S.; Valadares-Inglis, M.C. (2001) **Recursos Genéticos & Melhoramento – Plantas**. Fundação MT, 1183p.

Perseguini JM KC, Chiorato AF, Zucchi MI, Colombo CA, Carbonell SAM, Mondego JMC, Gazaffi R, Garcia AAF, Campos T, Souza AP, Rubiano LB (2011) Genetic diversity in cultivated carioca common bean based on molecular marker analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v.34, n.1, p.88-102.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, p.945-959.