

Aplicação de tecnologias genômicas baseadas em marcadores microssatélites para discriminação de cultivares e análise de pureza genética em feijoeiro comum

Rosana Pereira Vianello Brondani
Claudio Brondani

A cada ano, a Embrapa Arroz e Feijão lança novas cultivares comerciais do feijoeiro, para os diferentes tipos de grão comercial, com vistas a atender ao consumo nacional. A demanda constante por cultivares mais produtivas, com melhor qualidade de grãos e com resistência às principais doenças, tem dado foco ao programa de melhoramento do feijoeiro da Embrapa Arroz e Feijão, para o desenvolvimento, avaliação e indicação de novas cultivares, melhoradas e adaptadas às diferentes condições edafoclimáticas das regiões produtoras, resultando no lançamento de 20 novas cultivares de feijoeiro comum, nos últimos 16 anos (Cultivares..., 2006).

Todas as cultivares, para fins de registro e comercialização, são cadastradas através do Registro Nacional de Cultivares (RNC), instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), onde são avaliadas quanto ao seu desempenho agrônomo e valor comercial para o mercado, através do chamado teste de Valor de Cultivo e Uso (VCU). Posteriormente, para serem registradas, as novas cultivares necessitam passar pelo teste de Distinguíbilidade, Homogeneidade e Estabilidade (DHE). Comum aos testes de VCU e DHE, existe a necessidade de caracterização da cultivar para fins de proteção, em que diversas características agrônomicas, como suas propriedades de uso em atividades agrícolas, industriais, comerciais e de consumo são utilizadas para avaliar o seu desempenho (Brasil, 2006b). Para o registro, é necessário assegurar que a nova cultivar seja diferente das demais disponíveis e apresente homogeneidade e estabilidade na expressão de suas características (Embrapa,

2006). Uma vez protegidas, é vedada, por meio da Lei de Proteção de Cultivares, a comercialização das variedades por terceiros não autorizados, assim como seu material de reprodução ou multiplicação comercial em todo o território brasileiro pelo prazo de 15 anos, contados a partir da data de concessão do Certificado Provisório (Brasil, 2006a).

Atualmente, as avaliações das futuras cultivares de feijão são feitas com base em descritores morfológicos avaliados em mais de um ambiente, estando, portanto, sujeitas à limitações, uma vez que a maioria das características em análise, como produtividade, são de herança genética quantitativa e, portanto, influenciadas pelas variações ambientais e pela interação genótipo x ambiente. Adicionalmente, em espécies autógamas de base genética estreita, como é o caso do feijoeiro comum, a distinguibilidade, requisito indispensável para registro de uma nova cultivar, é restrita e pode ser de difícil determinação. Por outro lado, a utilização de técnicas moleculares possibilitam acessar a variabilidade diretamente pelo DNA, permitindo a geração de descritores estáveis, que não são influenciados pelo ambiente nem pelo estágio de desenvolvimento da planta são consideradas adequadas e estratégicas para fins de determinação de identidade genética. Atualmente, existe uma sinalização positiva para a utilização de marcadores moleculares na caracterização molecular de cultivares, seguindo recomendações da Associação Internacional para Testes de Sementes (ISTA), cujas normas são adotadas pela União Internacional para Proteção de Obtenções Vegetais (UPOV), de acordo com Schuster et al. (2004).

¹ Bióloga, Doutora em Biologia Molecular Vegetal, Embrapa Arroz e Feijão, Rod. GO 462, Km 12, 75375-000 Santo Antônio de Goiás-GO
rosanavb@cpaf.embrapa.br

² Engenheiro Agrônomo, Doutor em Genética Molecular, Embrapa Arroz e Feijão brondani@cpaf.embrapa.br

Das classes de marcadores moleculares utilizadas, os marcadores microssatélites, que consistem de unidades repetidas de DNA que podem variar de uma a seis bases de comprimento, destacam-se dos demais por serem abundantes e uniformemente distribuídos por todo genoma (Litt & Luty, 1989), apresentarem um elevado multialelismo, herança do tipo co-dominante e a facilidade da reação automatizada via técnica de PCR. O polimorfismo de microssatélites é resultante do número de unidades repetidas presente em cada loco analisado via PCR, que pode ser prontamente acessado através do uso de iniciadores específicos (*primers*) complementares às seqüências de DNA que flanqueiam as repetições, conferindo maior especificidade e poder de reprodutibilidade à técnica. O fato de o DNA repetitivo de um loco microssatélite evoluir mais rapidamente que o DNA que o flanqueia resulta em conseqüências imediatas: a) há um alto polimorfismo no loco SSR, porém suficientemente estável para ser utilizado em análise genética, e b) a taxa de mutação age em relação à variação no número de unidades repetidas e, por conseguinte, fornece diferentes tamanhos de fragmentos em um loco amplificado pela reação de PCR, os quais são facilmente identificáveis via eletroforese em géis de agarose ou de poliacrilamida de alta resolução (Weber & Way, 1989). Essas variantes de múltiplos comprimentos podem ser identificadas até mesmo em espécies pouco polimórficas, resultantes de uma base genética estreita, como o feijoeiro comum.

Um grande número de marcadores microssatélites já foi desenvolvido e disponibilizado para análise genética de feijoeiro comum (ver revisão em Grisi, 2006). Entretanto, esforços ainda necessitam ser destinados na tentativa de eleger e recomendar os marcadores com maior poder discriminatório e que apresentem padrões de amplificação consistentes e reproduzíveis entre laboratórios. Esses marcadores, uma vez identificados e validados, podem ser analisados através da detecção simultânea de mais de um loco microssatélite, denominada de multiloco ou multiplex. A análise desses sistemas pode ser conduzida em gel de alta resolução em poliacrilamida, ou através de sistemas semi-automatizados de detecção, como o seqüenciador automático de DNA. O sistema de detecção, baseado em géis de poliacrilamida, ainda continua sendo uma alternativa viável pelo baixo custo da eletroforese e revelação dos géis (Figura 1). Para cultivares comerciais de espécies que naturalmente exibem um menor grau de variabilidade genética, em função do seu hábito reprodutivo ou do método de melhoramento ao qual foi submetidas a detecção, via gel de poliacrilamida, é adequada e recomendada. Entretanto, para espécies alógamas e que exibem um elevado polimorfismo por loco gênico, os métodos de detecção semi-automatizados são mais apropriados, pois asseguram uma maior precisão à análise genética onde uma ampla variabilidade alélica é

esperada. Dentre as vantagens apresentadas pelo emprego da tecnologia semi-automatizada, destacam-se a possibilidade de analisar simultaneamente um maior número de locos microssatélites, a redução do tempo necessário para genotipar um grande número de indivíduos, a obtenção de dados mais precisos, resultantes da adição de um marcador de massa molecular interno para cada amostra genotipada, e uma maior agilidade no processamento dos dados gerados, assim como a transferência direta destes dados para determinação de parâmetros genéticos por softwares específicos (Brondani, 2001).

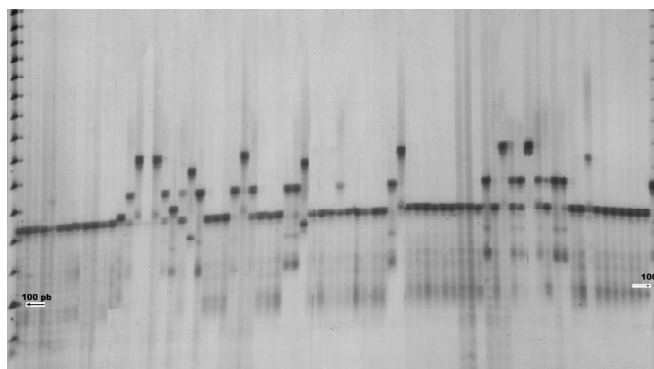


Fig. 1. Variação alélica de um loco microssatélite visualizada em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata. A primeira e última colunas representam o DNA-padrão, Ladder 10 pares de base (Invitrogen).

O ajuste de um sistema de amplificação multiplex deve ser bastante criterioso, para possibilitar o desenvolvimento de um sistema que gere padrões de produtos amplificados claramente distinguíveis entre os locos e indivíduos, que tenha um padrão de amplificação consistente e que não seja variável quando realizados procedimentos com pequenas modificações, como as encontradas entre diferentes laboratórios.

A escolha da melhor combinação de *primers* para ser utilizada em sistema de amplificação e detecção simultânea deve ser feita com base no ajuste individual das condições de amplificação para cada loco microssatélite. Para a montagem dos sistemas multiplex, devem ser considerados, para cada marcador microssatélite, a especificidade do produto amplificado, a temperatura de anelamento ideal para a amplificação específica do loco, a intensidade do produto amplificado e a faixa de amplificação, em pares de base, do loco. Marcadores que amplificam fragmentos de DNA de tamanhos próximos devem ser marcados com fluorescências diferentes, quando inseridos em um mesmo sistema de genotipagem multiplex, para o caso da detecção ser realizada em seqüenciador de DNA. Se a detecção for realizada em géis de poliacrilamida, tais marcadores não devem compor um mesmo multiplex. Contrariamente, marcadores

microsatélites que amplificam produtos de tamanhos que diferem em, no mínimo, 50 pares de base, podem ser marcados com a mesma fluorescência e, consequentemente, analisados em um mesmo sistema multiplex, tendo em vista que os produtos amplificados não se sobrepõem. Deste modo, a capacidade multiplex de um sistema pode ser aumentada. Para a análise genética em feijoeiro comum, sistemas de genotipagem automatizados foram desenvolvidos por Masi et al. (2003), no qual 30 microsatélites combinados em sete sistemas multiplex mostraram-se eficientes para detectar polimorfismo entre três variedades tradicionais de feijoeiro comum. Contudo, este sistema ainda necessita ser avaliado quanto ao poder de discriminação entre cultivares comerciais, que normalmente possuem um nível de polimorfismo consideravelmente inferior às variedades tradicionais (Grise et al. 2007).

Uma vez montados os sistemas multiplex, eles poderão ser utilizados para uma série de estudos de análise genética para feijoeiro comum com aplicações práticas e de interesse pelos programas de melhoramento genético, com ênfase na identificação do perfil molecular de cada cultivar ou linhagem, e que poderão ser implementados como importantes descritores complementares ao requerimento de proteção de nova cultivar e seus derivados. Em adição ao estabelecimento de um sistema de identificação genética para feijoeiro comum, que poderá vir a ser uma ferramenta inovadora e complementar para testes de DHE no processo de proteção de cultivares, os perfis moleculares e estimativas de frequências alélicas gerados irão constituir um importante banco de dados. A partir do banco gerado, uma ampla variedade de informações podem ser geradas e empregadas para fins de proteção, registro e rastreamento das amostras de interesse e seus produtos, como o monitoramento para fins de certificação de pureza genética e garantia aos obtentores das cultivares dos direitos de comercialização das sementes e seus derivados.

A Embrapa Arroz e Feijão está atuando na condução de ações de pesquisa voltadas para o desenvolvimento e implementação de práticas de genotipagem molecular que possibilitem consolidar estratégias mais eficientes de proteção de cultivares e seus derivados. Novos sistemas de genotipagem utilizando análise multiplex e detecção semi-automatizada encontram-se em fase avançada de desenvolvimento, integrando locos microsatélites com elevado conteúdo informativo e poder de discriminação (Figura 2). Posteriormente, grupos de pesquisa com experiência comprovada em genotipagem molecular irão atuar na validação e consolidação dos sistemas de genotipagem para análise genética em feijoeiro comum, de modo que possam ser prontamente acessados e adotados pela comunidade científica mundial.

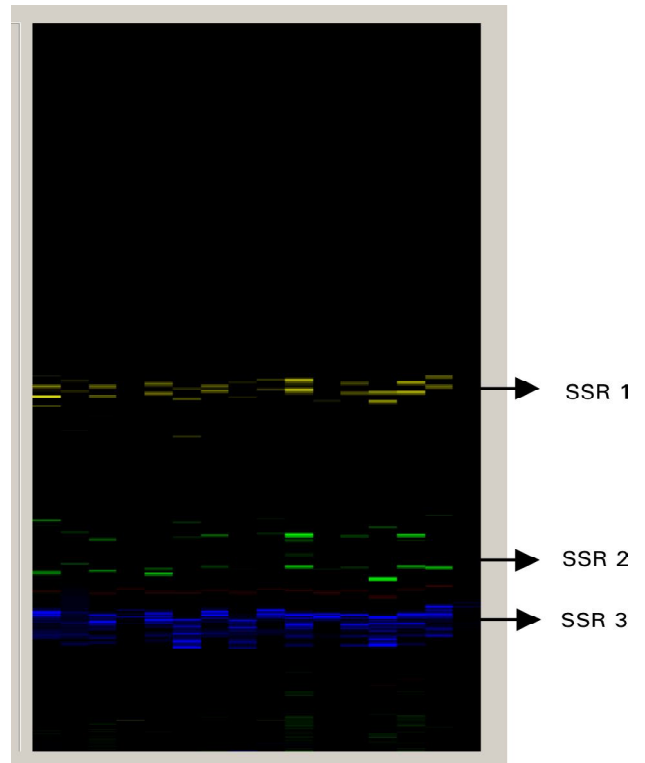


Fig. 2. Perfil molecular de marcadores microsatélites visualizado pela análise semi-automatizada em um grupo de acessos de variedades tradicionais de feijoeiro comum. Eletroforese de um sistema multiplex composto por três marcadores microsatélites (SSR 1, SSR 2 e SSR 3) marcados com as fluorescências NED (amarelo), HEX (verde) e FAM-6 (azul), respectivamente.

Referências Bibliográficas

BRASIL. Lei n. 9.456, de 25 de abril de 1997. Institui a Lei de Proteção de Cultivares, e dá outras providências.

Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 28 abr. 1997. Disponível em: <<http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/5237.html>>. Acesso em: 20 dez. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Registro nacional de cultivares – RNC**: informe técnico. Brasília, DF, nov. 2000. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/MENU_LATERAL/AGRICULTURA_PECUARIA/ESTUDOS_PUBLICACOES/MUDAS_SEMENTES/RNC_INFORME_US.PDF>. Acesso em 20 dez. 2006.

BRONDANI, R. P. V. **Desenvolvimento, caracterização e mapeamento de marcadores microsatélites no Gênero Eucalyptus**. 2001. 113 p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

CULTIVARES de feijão. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/feijao/index.htm>>. Acesso em: 20 dez. 2006.

EMBRAPA. **O desenvolvimento dos testes de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade – “dhe”, na Embrapa.** Disponível em: < <http://www22.sede.embrapa.br/uc/dpd/dhe.htm> > . Acesso em: 29 dez. 2006.

GRISI, M. C. de M. **Mapeamento genético de locos microssatélites em feijoeiro comum na população BAT93 x Jalo EEP558.** 2006. 111 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 44, n. 3, p. 398-401, Mar. 1989.

MASI, P.; ZEULI, P. L. S.; DONINI, P. Development and analysis of multiplex microsatellite markers sets in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 11, n. 4, p. 303-313, May 2003.

SCHUSTER, I. ; QUEIROZ, V. T.; TEIXEIRA, A. I.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Determinação da pureza varietal de sementes de soja com auxílio de marcadores moleculares microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 3, p. 247-253, mar. 2004.

WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the Polymerase Chain Reaction. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 44, n. 3, p. 388-396, Mar. 1989.

Comunicado Técnico, 132



Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Arroz e Feijão
Rodovia GO 462 Km 12 Zona Rural
Caixa Postal 179
75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO
Fone: (62) 3533 2123
Fax: (62) 3533 2100
E-mail: sac@cnpaf.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2006): 1.000 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: *Carlos Agustín Rava*
Secretário-Executivo: *Luiz Roberto R. da Silva*

Expediente

Supervisor editorial: *Marina A. Souza de Oliveira*
Revisão de texto: *Vera Maria T. Silva*
Normalização bibliográfica: *Ana Lúcia D. de Faria*
Editoração eletrônica: *Fabiano Severino*