

NOTAS CIENTÍFICAS

Caracterização da diversidade genética em feijão por meio de marcadores RAPD⁽¹⁾

Marília Caixeta Franco⁽²⁾, Sérgio Túlio Alves Cassini⁽³⁾,
Valter Rodrigues Oliveira⁽⁴⁾ e Siu Mui Tsai⁽²⁾

Resumo – Marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) foram usados para avaliar a diversidade genética entre 19 cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Dos cento e oito locos de RAPD obtidos de 15 *primers* decâmeros, 70 foram polimórficos. Para estimar a distância genética foi usado o coeficiente de similaridade de Jaccard e as análises de agrupamento foram feitas pelos métodos UPGMA e Tocher. As análises de agrupamento confirmaram a ampla diversidade genética existente entre germoplasmas tropicais de feijão, separando as cultivares em dois grupos principais, correspondendo aos centros de domesticação Andino (genótipos de sementes médias e grandes) e Mesoamericano (genótipos de sementes pequenas). No grupo Andino, a diversidade genética relativa foi maior do que no Mesoamericano.

Termos para indexação: *Phaseolus vulgaris*, marcadores genéticos, distância genética.

Characterization of the genetic diversity of common beans by RAPD markers

Abstract – RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers were used to evaluate the genetic diversity among 19 common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. Amplifications using 15 decamers primers revealed 108 RAPD *loci*, 70 of which were polymorphic. The relative genetic distance was estimated using the complement of Jaccard's coefficient and grouping analyses were derived from UPGMA and Tocher. These two grouping analyses confirmed the broad genetic diversity among the common bean tropical germplasm, which was divided into two main groups. These groups correspond to the Andean (genotypes with medium and large size seeds) and Mesoamerican (genotypes with small seeds) domestication centers. The relative genetic diversity was greater among the Andean cultivars than that of the Mesoamerican cultivars.

Index terms: *Phaseolus vulgaris*, genetic markers, genetic distances.

⁽¹⁾ Aceito para publicação em 27 de abril de 2000.

Extraído da tese de doutorado, apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG

⁽²⁾ Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Seção de Biologia Celular e Molecular, Caixa Postal 96, CEP 13400-970 Piracicaba, SP. E-mail: mcfranco@cena.usp.br, tsai@cena.usp.br

⁽³⁾ UFV, Dep. de Microbiologia, Av. PH Rolfs, s/n, CEP 36571-000 Viçosa, MG. E-mail: scassini@npd.ufes.br

⁽⁴⁾ Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Centro Tecnológico do Centro-Oeste, Caixa Postal 295, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG. E-mail: vroliva@hotmail.com

O feijão (*Phaseolus vulgaris*) é uma das principais fontes de proteínas para cerca de 500 milhões de pessoas na América Latina e África (Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1992). Evidências indicam que o feijão comum foi domesticado independentemente em dois centros primários, América Central e México e sul dos Andes, e em um centro secundário ao norte dos Andes (Gepts & Debouck, 1991). Múltipla domesticação nos dois centros primários levou à formação de dois conjuntos gênicos principais, um Mesoamericano e um Andino, dentro dos quais, forças evolutivas têm resultado em significantes mudanças morfológicas, fisiológicas e genéticas (Gepts & Debouck, 1991; Singh, 1992). Os programas de melhoramento não exploram a variabilidade, relativa a características agronômicas, que pode ser obtida com a transferência de genes entre esses conjuntos gênicos (Singh, 1992).

Variabilidade genética é a base para o melhoramento. O conhecimento da diversidade genética entre germoplasmas, elite e adaptados, pode melhorar a eficiência na identificação de combinações parentais que gerem populações segregantes com máxima variabilidade genética para a seleção. Caracteres fenotípicos, tradicionalmente usados para estimar a diversidade genética, são de importância limitada, uma vez que são geralmente influenciados pelo ambiente e estágio de desenvolvimento da planta, e porque, em algumas espécies, adequado nível de polimorfismo fenotípico não está disponível (Tatineni et al., 1996). Por sua vez, marcadores de DNA são independentes das condições ambientais e mostram alto nível de polimorfismo, além de muito abundantes e com herança mendeliana, possibilitando uma descrição mais detalhada da estrutura genética de populações (Williams et al., 1990).

Polimorfismos de DNA amplificado ao acaso (RAPD), assim como outros marcadores de DNA, como RFLP (polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição) e AFLP (polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados) têm sido utilizados para medir a diversidade genética entre e dentro de espécies de microrganismos e plantas, incluindo o feijoeiro (Berkum et al., 1996; Tohme et al., 1996; Vasconcelos et al., 1996). Marcadores RAPD, pela sua simplicidade técnica e capacidade em detectar diferenças entre genótipos relacionados, são mais utilizados.

O objetivo deste estudo foi determinar a diversidade entre genótipos de feijoeiro, representativos dos centros primários de origem andina e mesoamericana, com base em marcadores RAPD, e verificar se o agrupamento gerado a partir dos dados moleculares confirma a origem dos acessos.

Foram usadas, neste estudo, dezenove cultivares de feijão do banco de germoplasma da Universidade Federal de Viçosa. Nove genótipos representam o conjunto gênico Andino (1. Goiano Precoce; 2. California Dark Red Kidney; 3. Jalo EEP 558; 4. WAF-15; 5. WAF-7; 6. Antioquia 8; 7. Mineiro Precoce; 8. Batatinha; 9. Midas) e dez, o conjunto gênico Mesoamericano (10. Ouro Negro; 11. BAT 304; 12. DOR 241; 13. RAB 94; 14. Ouro; 15. FT 84835; 16. Diamante Negro; 17. IAPAR 14; 18. IAC-UNA; 19. BAT 93), com diferentes cores de semente e hábitos de crescimento. O DNA genômico total foi extraído de acordo com o método de Doyle & Doyle (1990). A concentração e a pureza desses DNA foram determinadas em espectrofotômetro.

As amplificações foram feitas com oligonucleotídeos decâmeros de sequência aleatória (*primers*) da Operon Technologies, Biodynamics and Genosys

Biotechnologies. As reações de amplificação, em um volume final de 25 μ L, continham: 25 ng de DNA genômico; 10 mM Tris-HCl (pH 8,3); 50 mM KCl; 100 μ M de cada um dos dNTPs; 1,4 mM de $MgCl_2$; 5 pmoles de *primer* e uma unidade de *Taq* DNA polimerase. Controles foram feitos pela substituição do DNA genômico por água.

As amplificações foram realizadas em termociclador (Perkin-Elmer, modelo 2400). Cada reação consistiu de três ciclos de 94°C por 1 minuto, 35°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, seguindo-se 34 ciclos de 94°C por 10 segundos, 40°C por 20 segundos e 72°C por 2 minutos, e, finalmente, uma extensão a 72°C por 5 minutos, conforme descrito por Young & Kelly (1996). A eletroforese foi conduzida a 3,125 V/cm por 4 horas. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 1,4% contendo 10 mg/mL de brometo de etídio diluído em tampão TAE (40 mM Tris-Base; 1mM EDTA, pH 8,0). O marcador DNA Ladder - 500 pb, GIBCO-BRL, foi utilizado como padrão de peso molecular, para determinação do peso molecular dos respectivos fragmentos de DNA amplificados, os quais foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados.

Cinquenta e um *primers* foram inicialmente avaliados usando-se duas cultivares, Mineiro Precoce e BAT 304, oriundas de diferentes *pools* gênicos e morfologicamente contrastantes. Destes, foram selecionados 15 (seqüência 5'-3' - B6 - GTGACATGCC, B7 - AGATGCAGCC, B9 - ATGGCTCAGC, OPA1 - CAGGCCCTTC, OPAP4 - CTCTTGGGCT, OPAP7 - ACCACCCGCT, OPAP8 - ACCCCCACAC, OPG4 - AGCGTGTCTG, OPG8 - TCACGTCCAC, OPG18 - GGCTCATGTG, OPG19 - GTCAGGGCAA, OPO19 - GGTGCACGTT, OPW16 - CAGCCTACCA, 111 - AGTAGACGGG, 112 - GCTTGTGAAC), por apresentarem polimorfismo e padrão de bandas adequados para a análise da diversidade genética entre as demais cultivares.

Com base na presença (1) ou ausência (0) de cada fragmento específico de DNA amplificado, gerado por 15 *primers* em cada genótipo, foi obtida uma matriz de dados binários. Os dados 1/0 dessa matriz foram usados para estimar o coeficiente de similaridade de Jaccard (Rohlf, 1992). Apenas bandas com grande intensidade foram consideradas. Com base na matriz de similaridade, e empregando-se o método UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic averages), as cultivares foram agrupadas segundo o programa computacional NTSYS versão 1.70 (Rohlf, 1992). Os valores da matriz de similaridade foram submetidos à subtração de 1, para gerar a matriz de distâncias genéticas, cujos valores foram usados para o agrupamento das cultivares pelo método de otimização de Tocher, que mantém a distância média intragrupo inferior à distância intergrupo (Cruz & Regazzi, 1994).

Os 15 *primers* geraram um total de 108 bandas RAPD, com uma amplitude de variação entre 5 e 13 bandas por *primer* (média de 7,2). O tamanho dos fragmentos de DNA amplificados variou de 300 a 4.000 pb. Do total de locos, 70 (64,8%) foram polimórficos.

A análise de agrupamento pelo método UPGMA, que foi idêntica a análise pelo método de Tocher (Figura 1), manteve a separação das cultivares em dois grandes grupos principais: um, composto por nove cultivares de origem andina (grupo Andino), e outro, pelas 10 cultivares de origem mesoamericana (grupo

Mesoamericano). As cultivares do grupo Andino possuem sementes grandes e médias, e as mesoamericanas, sementes pequenas. Vasconcelos et al. (1996) têm mostrado que marcadores RAPD têm sido eficientes em separar acessos de feijão Andinos de Mesoamericanos. Nenhum sinal claro de introgressão ou hibridação entre esses conjuntos gênicos foi observado neste trabalho (Figura 1).

A aplicabilidade de marcadores RAPD em estabelecer a relação genética de germoplasmas de feijão, mesmo entre os estreitamente relacionadas (mesmo *pool* gênico) é mais uma vez comprovada neste estudo. Os resultados obtidos aqui evidenciaram uma menor diversidade genética dentro dos grupos gênicos Andino e Mesoamericano, e a existência de alto nível de polimorfismo genético entre os grupos. A identificação de cultivares com máxima diversidade genética deve otimizar a escolha de genitores para cruzamentos, pois maior segregação deverá ocorrer a partir do cruzamento entre os mais divergentes. Entretanto, a existência de diversidade genética detectada por marcadores de DNA não é garantia de alta correlação com o desempenho do híbrido e de variabilidade em populações segregantes (Bernardo, 1992). A identificação de genitores menos divergentes, por sua vez, pode ser de grande valia em um programa de melhoramento de retrocruzamentos em que se deseje recuperar as características do parental recorrente tão rápido quanto possível.

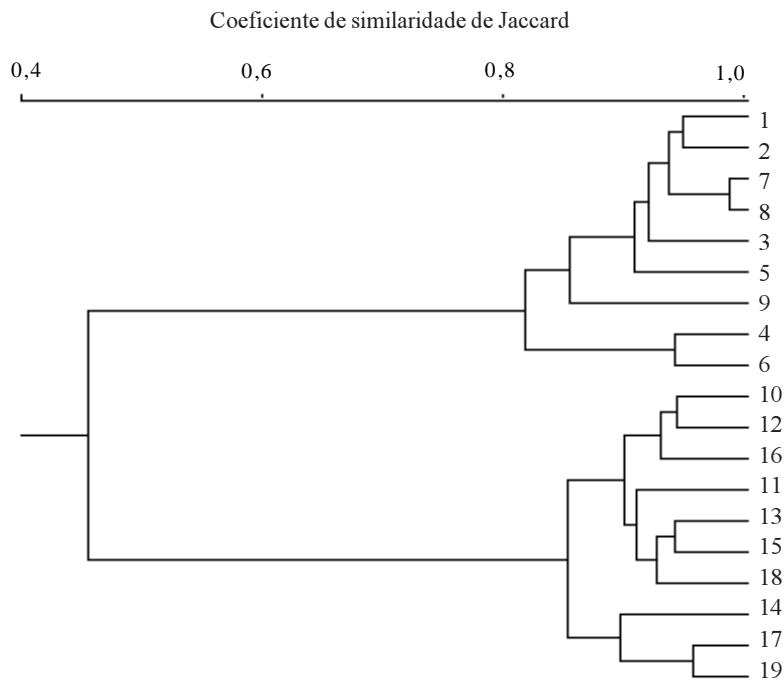


Figura 1. Agrupamento pelo método UPGMA com base no coeficiente de similaridade de Jaccard das cultivares de feijão Goiano Precoce (1), California Dark Red Kidney (2), Jalo EEP 558 (3), WAF-15 (4), WAF-7 (5), Antioquia 8 (6), Mineiro Precoce (7), Batatinha (8), Midas (9), Ouro Negro (10), BAT 304 (11), DOR 241 (12), RAB 94 (13), Ouro (14), FT 84835 (15), Diamante Negro (16), IAPAR 14 (17), IAC-UNA (18), BAT 93 (19).

Referências

- BERKUM, P. van; BEYNE, D.; EARDLY, B. D. Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 46, p. 240-244, 1996.
- BERNARDO, R. Relationship between single-cross performance and molecular marker heterozygosity. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 83, p. 628-634, 1992.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (Cali, Colômbia). **Trends in CIAT commodities**. Cali, 1992. 272 p. (Working Document, 111).
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa : Imprensa Universitária, 1994. 390 p.
- DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Ithaca, v. 12, p. 13-18, 1990.
- GEPTS, P.; DEBOUCK, D. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: SCHOONHOVEN, A. van; VOYSEST, O. (Ed.). **Common beans: research for crop improvement**. Wallingford : CAB/CIAT, 1991. p. 7-53.
- ROHLF, J. F. **NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 1.70**. New York : Applied Biostatistics, 1992. Não paginado.
- SINGH, S. P. Common bean improvement in the Tropics. JANICK, J. (Ed.). **Plant breeding reviews**. New York : J. Wiley, 1992. p. 199-269.
- TATINENI, V.; CANTRELL, R. G.; DAVIS, D. D. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. **Crop Science**, Madison, v. 36, p. 186-192, 1996.
- TOHME, J.; GONZALEZ, D. O.; BEEBE, S.; DUQUE, M. C. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. **Crop Science**, Madison, v. 36, p. 1375-1384, 1996.
- VASCONCELOS, M., J. V.; BARROS E., G.; MOREIRA, M.,A.; VIEIRA, C. Genetic diversity of the common bean *Phaseolus vulgaris* L. determined by DNA-based molecular markers. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.19, p. 447-451, 1996.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TIGHEY, S., V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- YOUNG, R. A.; KELLY, J. D. RAPD marker flanking the are gene for anthracnose resistance in common bean. **American Society for Horticultural Science Journal**, Alexandria, v. 121, p. 37-41, 1996.