

# ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DOS ACESSOS COMPONENTES DA COLEÇÃO NUCLEAR DE FEIJÃO DA EMBRAPA ATRAVÉS DE MARCADORES SSR

JORGE FREITAS CIESLAK<sup>1</sup>, TEREZA CRISTINA DE OLIVEIRA BORBA<sup>2</sup>, LEONARDO CUNHA MELO<sup>2</sup>, JAISON PEREIRA DE OLIVEIRA<sup>2</sup>, MARIA JOSÉ DEL PELOSO<sup>2</sup>, JOAQUIM GERALDO CÁPRIO DA COSTA<sup>2</sup>

**INTRODUÇÃO:** O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura amplamente difundida no Brasil e se caracteriza por ser uma cultura de pequena e média propriedade (ANUÁRIO ABRASEM, 2003). O plantio do feijão no Brasil é dividido em três safras, a safra “das águas” (representando 41% da produção) e a safra “da seca” (36% da produção), ambas comuns a todo o país, e a safra “de inverno”, auxiliada por irrigação, e conduzida no Oeste da Bahia e nos estados do Centro-Oeste e Sudeste do país (23% da produção). Além da ampla distribuição de lavouras pelo país, outro fator que dificulta a adequada condução da cadeia produtiva do feijão é a preferência pelo tipo do grão consumido, a qual varia conforme a região. Porém, apesar dos hábitos culturais, existe uma preferência por parte do consumidor brasileiro pelo grão do tipo carioca (75%), seguido pelo grão do tipo preto (21%), e com outros tipos de grão representando somente 4% do mercado. Entretanto, apesar da importância da cultura no país, existe uma grande dificuldade na recomendação de novas cultivares, pois a cadeia produtiva do feijão envolve um grande número de pequenos produtores, uma grande diversidade de ambientes e hábitos culturais que influenciam o mercado, além disto o baixo uso de sementes melhoradas (10% da produção total) não gera retorno econômico satisfatório. Dessa forma, para o desenvolvimento de novas cultivares é muito importante a seleção de genótipos que mantenham sua competitividade independente do local ou época de semeadura. Características de interesse como qualidade dos grãos, plantas de porte ereto com alta inserção das vagens e resistência aos principais fatores bióticos e abióticos vem orientado os programas de melhoramento da Embrapa. Diante desse cenário, a exploração da diversidade preservada em bancos ativo de germoplasma surge como uma alternativa aos programas de melhoramento. Porém, grande parte dos bancos de germoplasma enfrenta problemas relacionados ao tamanho e a dificuldade para sua organização. Algumas coleções se tornaram muito extensas, obstruindo seus propósitos de conservação e utilização da diversidade genética. Daí a necessidade de se estabelecer coleções nucleares (CN), uma CN consiste de um limitado conjunto de acessos representando grande parte da diversidade presente na coleção original (VAN HINTHUM, 1999). Entre as ferramentas disponíveis para a caracterização de acessos de germoplasma encontram-se os marcadores moleculares. Diversas classes estão disponíveis, porém os marcadores do tipo SSR (*Simple Sequence Repeats*) são considerados ideais à caracterização molecular de recursos genéticos por serem co-dominantes, multialélicos, altamente polimórficos e informativos (POWELL et al., 1995; BRONDANI et al., 2007). O Objetivo deste trabalho foi caracterizar acessos componentes da Coleção Nuclear de Feijão através de marcadores SSR fluorescentes.

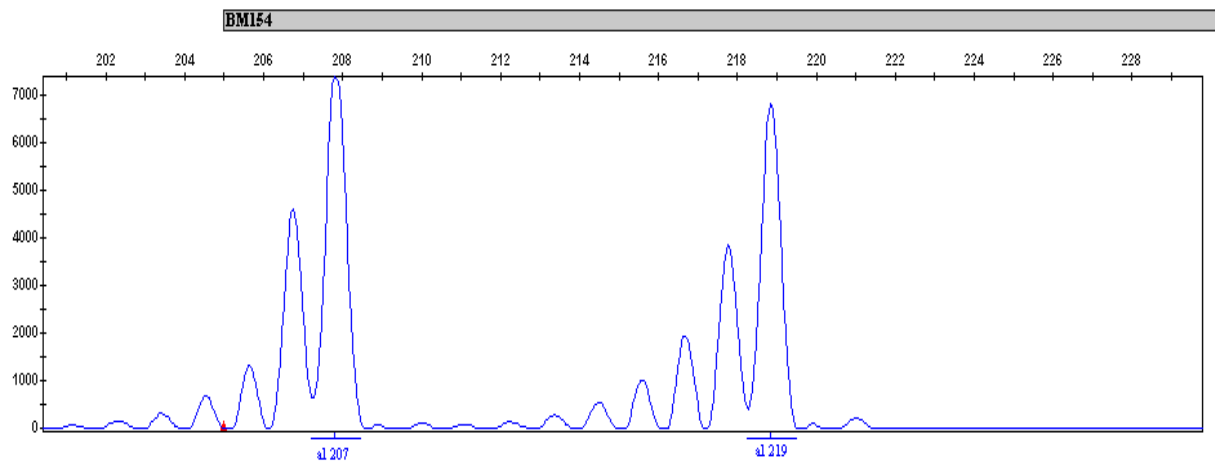
**MATERIAL E MÉTODOS:** Foram analisados 72 acessos componentes da Coleção Nuclear de Feijão da Embrapa (CONFE) através de 21 marcadores SSR fluorescentes já publicados na literatura. O DNA genômico foi obtido através da metodologia descrita por Doyle e Doyle (1987) e adaptado por Gratapaglia et al. (1992). Cada acesso foi representado por vinte plantas divididas em quatro bulks de cinco plantas. A concentração do DNA foi estimada através de eletroforese em gel de Agarose 1% por comparação visual com DNA-padrão do fago lambda (50, 100, 200 e 400 ng), posteriormente ajustada para 3ng µl<sup>-1</sup>. Os produtos de PCR foram analisados em analisador automáticos de DNA, modelo ABI 3100 (Applied Biosystems) e os alelos identificados através do programa GeneMapper™ 3.5

<sup>1</sup> Estudante de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. Goiânia Goiás

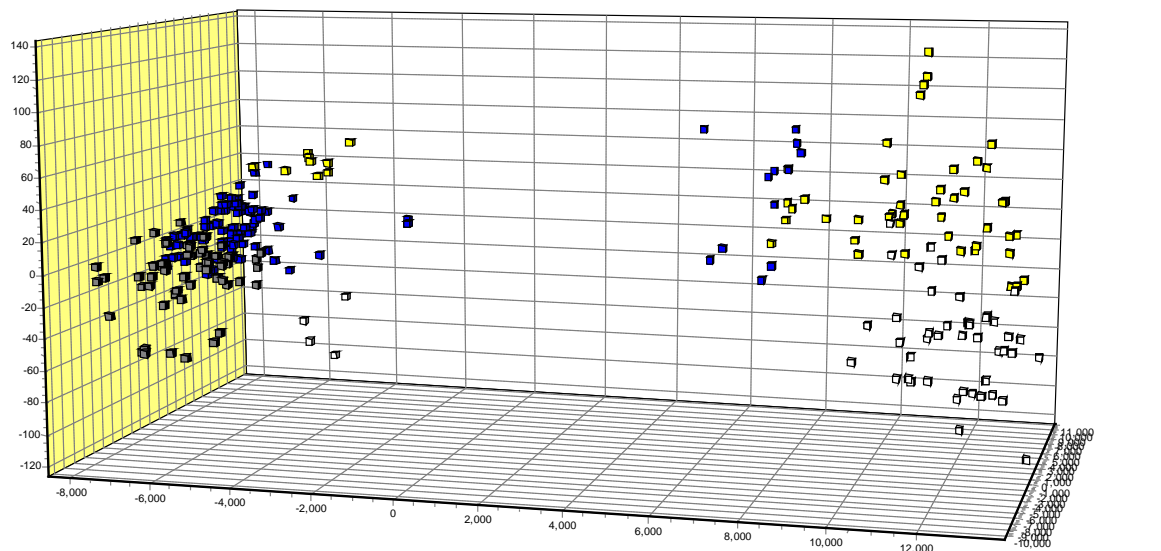
<sup>2</sup> Pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão. Santo Antônio de Goiás, GO

(Applied Biosystems) O programa GDA (*Genetic Data Analysis*) forneceu o número de alelos exclusivos, o número de alelos por marcador e valores de PIC (*Polymorphism Information Content*). O programa Identity foi utilizado para o cálculo da probabilidade de identidade (PI) e o número de pares de genótipos idênticos, a matriz distância genética (distância de Rogers modificada por Wright) foi obtida pelo programa NTSys. O programa FSTAT forneceu a matriz de frequência alélica. A presença de estruturação foi verificada utilizando-se a análise fatorial de correspondência (AFC), obtida pelo programa Genetix, e pelo modelo bayesiano implementado no programa INSTRUCT. O número real de grupos geneticamente homogêneo foi determinado conforme proposto por Evanno et al. (2005).

**RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Um total de 189 alelos foi identificado, com média de nove alelos por marcador, e variou de dois (PV12) a 29 (BM154). O valor médio de PIC foi 0.69, variando de 0.43 (BM149) a 0.93 (BM154). A distância genética média de Rogers modificada por Wright foi de 0.72. Entre os alelos, 21% (41) foram classificados como privados, ou seja, identificados somente em um único acesso. O acesso Pombinho Crioulo se destacou, pois apresentou quatro alelos privados (BM138, PV35, BM189 e BM210). A probabilidade de identidade (PI) combinada foi de  $2.24 \times 10^{-20}$ , isso representa a probabilidade de se encontrar, ao acaso, dois indivíduos com o mesmo genótipo para determinado conjunto de marcadores. Foi encontrado um par de genótipos idênticos entre os bulks componentes dos acessos Gurgutuba Branco e Gurgutuba Vermelho. Entre os 72 acessos, aproximadamente 29% apresentaram ao menos um marcador heterogêneo, ou seja, apresentaram mais de um alelo por marcador. Entre os acessos que apresentaram heterogeneidade, destacou-se o acesso Americano (Figura 1), este acesso apresentou perfil heterogêneo para 38% dos marcadores analisados. A presença de heterogeneidade pode ser explicada pela ocorrência de mistura de linha puras, presença de heterozigosidade residual ou pela ocorrência de polinização cruzada com outro acesso, ou até mesmo pela combinação dos fatores. Segundo o modelo bayesiano, foi encontrado um k igual a dois, ou seja, entre os 72 acessos analisados houve uma formação de dois grupos, confirmada através da AFC (Figura 2). A subdivisão dos acessos baseou-se em sua origem, ou seja, origem Mesoamericana ou Andina. A origem foi determinada através do tamanho das sementes, sementes grandes e muito grandes (no gráfico, em amarelo e branco) possuem origem Mesoamericana e sementes pequenas e médias (no gráfico, em cinza e azul), Andina.



**Figura 1.** Perfil de amplificação do marcador BM154 para o acesso Americano.



**Figura 2.** Análise fatorial de correspondência mostrando a estruturação populacional em relação ao tamanho de sementes dos acessos analisados.

**CONCLUSÃO:** A utilização de marcadores microssatélites permitiu a determinação da relação genética entre os acessos, podendo inferir também sobre a variabilidade genética existente dentro de cada acesso, aspecto este relevante como etapa inicial da avaliação de uma coleção nuclear.

## REFERÊNCIAS

ANUÁRIO ABRASEM 2003. Associação Brasileira de Sementes e Mudanças. Brasília, 2003. 164p.

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D. Manual Prático para o Desenvolvimento de Marcadores Microssatélites em Plantas. Embrapa. Informação Tecnológica, Brasília, DF, 2007.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. Focus. V. 12, P 13-15, 1987.

EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J. Detecting the Numero F Cluster of Individuals Using the Software Structure: A Simulation Study. Molecular Ecology 14: 2611-2620. 2005 DOI: 10.1111/J.1365-294X.2005.02553.X.

GRATTAPAGLIA, D.; O'MALEY, D. M.; SEDEROFF, R. R. Multiple Applications of Rapdmarkers to Genetic Analysis of *Eucalyptus Sp.* In: Proceedings of Iufro International Conference "Breeding Tropical Trees", Cali, Resumos, P. 132-137, 1992.

POWELL, W.; OROZCO-CASTILLO, C.; CHALMERS, K.J.; PROVAN, J.; WAUGH, R. Polymerase Chain Reaction-Based Assays for the Characterization of Plant Genetic Resources. Electrophoresis. V.16, N.1, P.1726-1730, 1995.

VAN HINTHUM, T. The General Methodology for Creating a Core Collection. In: JOHNSON, R.C.; HODGKIN, T. (ED.). Core Collections for Today and Tomorrow. Rome: IPGRI, 1999. P.10-17.