

## Diversidade Genética de Famílias de Seleção Recorrente Para Resistência ao Mosaico Dourado em Feijão Preto

Tuanna Nogueira de Resende<sup>1</sup>, Leonardo Cunha Melo<sup>2</sup>, Letícia Mirian Mendes<sup>1</sup>, Thiago Lívio Pessoa Oliveira Souza<sup>2</sup>, Luice Gomes Bueno<sup>3</sup>, Carlos Eduardo de Araujo Batista<sup>3</sup>, Helton Santos Pereira<sup>2</sup>, Adriane Wendland<sup>2</sup>, Luís Cláudio de Faria<sup>2</sup>

### Resumo

O Brasil é o maior produtor com 2.856,7 mil toneladas na safra 2012/2013 e também tem o maior mercado consumidor de feijão do mundo. A cultura do feijão sofre com o ataque de inúmeros patógenos. Dentre estes, o vírus do mosaico dourado do feijoeiro (VMDF), doença transmitida pela mosca branca, pode causar perdas de até 100% da produção, especialmente na safra da seca. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética entre os genitores e as famílias selecionadas no ciclo 2 (C<sub>2</sub>) utilizando marcadores microssatélites. A população inicial foi formada por sete genitores (Pinto 114, A775, A429, IAPAR 57, LM 21306-0, Ônix, e RGLC). Posteriormente 27 famílias C<sub>2</sub>S<sub>1,4</sub> foram selecionadas quanto à reação ao VMDF por meio de seleção recorrente. Para avaliar a diversidade genética na população base e famílias foram usados 12 marcadores SSR. O programa Power Marker foi utilizado para estimação da diversidade genética. O dendrograma foi gerado a partir da matriz de distância genética de Rogers-W, utilizando o método de agrupamento das médias não ponderadas (UPGMA). As análises utilizando os 12 locos microssatélites detectou um total de 70 alelos entre os sete genitores e as 27 famílias C<sub>2</sub>S<sub>1,4</sub>, com média de 5,83 alelos por loco. As maiores frequências alélicas foram detectadas nos locos BM202 (0,705), BM187 (0,661) e PV13 (0,656). A diversidade gênica observada na população foi considerada alta, indicando que após dois ciclos de seleção essa população continua a apresentar variabilidade genética. Os índices de heterozigosidade observados variaram de 0,059 a 0,455, com média de 0,160. Os valores estimados de PIC, variaram de 0,399 (BM202) a 0,727 (BM189). A partir dos dados da matriz de distâncias genéticas de Rogers-W, obteve-se um dendrograma, no qual é possível visualizar a dissimilaridade genética entre as 27 famílias selecionadas e os genitores. Conclui-se que mesmo após dois ciclos de seleção recorrente, a população base continua apresentando um adequado nível de variabilidade genética, o que permitirá a obtenção de ganhos com seleção.

### Introdução

A cultura do feijoeiro comum está entre as culturas de maior importância para o Brasil, com produção média anual de 3,5 milhões de toneladas (MAPA, 2013). Mas a produtividade da cultura é afetada por doenças que causam prejuízos ao produtor. Doenças causadas por vírus representam um dos grandes fatores associados às perdas no Brasil. Dentre as doenças que limitam a produção de feijão no país causando perdas de até 100% na produtividade, está o mosaico dourado do feijoeiro, cuja incidência tem sido constatada nos principais regiões produtoras, como é o caso dos estados do Paraná (região norte), São Paulo, Minas e Goiás, além do Distrito Federal (Melo et al. 2005). Devido à complexidade do controle genético para a resistência ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (VMDF), o uso de métodos de melhoramento indicados para características quantitativas, ou seja, aquelas controladas por vários genes, tem sido indicado uma vez possibilita o acúmulo de diferentes alelos de resistência ao longo dos sucessivos ciclos de seleção. Entre estes métodos esta a seleção recorrente (Ramalho et al., 2001), a qual permite um aumento gradativo da frequência de alelos favoráveis durante repetidos ciclos de seleção, avaliação e recombinação (Geraldi, 2005).

O uso de marcadores de DNA pode auxiliar os programas de melhoramento genético da cultura do feijoeiro-comum no que se refere à seleção de genótipos superiores. Devido à atual popularidade e agilidade da técnica de PCR, sua codominância e alta frequência no genoma, os marcadores microssatélites têm sido muito utilizados como ferramenta em estudos de diversidade genética. No caso de um programa de seleção recorrente, estes marcadores são muito úteis na estimação da variação da diversidade alélica desencadeada pelos sucessivos ciclos de seleção, além da estruturação genética das populações formadas a cada ciclo.

<sup>1</sup> Aluna de Graduação do Curso de Agronomia, Universidade Federal do Goiás – UFG, e-mail: tnresende@hotmail.com

<sup>2</sup> Pesquisador, Dep. Melhoramento de Feijão, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio do Goiás, GO, e-mail: leonardo.melo@embrapa.br

<sup>3</sup> Bolsista de Pós-Doutorado, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio do Goiás, GO, e-mail: batistace@gmail.com

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética, utilizando marcadores microssatélites, entre os genitores e as famílias selecionadas como tolerantes ao VMDF o ciclo 2 (C2) de seleção recorrente visando a formação da população  $C_3S_0$  no programa para tolerância ao mosaico dourado em feijão tipo preto conduzido na Embrapa Arroz e Feijão.

### Material e Métodos

A população inicial ( $C_0S_0$ ) foi formada por meio de cruzamentos cônicos entre os genitores Pinto114, A775, AA429, IAPAR57, LM21306-0, Ônix (LM30630) e RGLC (Redlands Greenleaf C), todos identificados previamente, em ensaios de campo, como resistentes ao VMDF. Esta população foi avançada, avaliada e submetida à seleção quanto à reação ao VMDF por várias gerações. Ao longo deste programa de seleção recorrente, foram obtidas e selecionadas como tolerantes 27 famílias  $C_2S_{1-4}$  para recombinação e formação da população base no terceiro ciclo (C3). Estas famílias foram então avaliadas quanto à diversidade genética usando marcadores microssatélites determinando-se o nível de diversidade alélica e estrutura genética da população base. Para a análise genética das famílias  $C_2S_{1-4}$  foram utilizados 12 marcadores microssatélites fluorescentes: BM187, BM189, BM210, PV272, PV87, BM154, BM185, BM201, BM 202, PV5, PV25, PV13 (Fam, Hex, Ned), previamente escolhidos, com base em seu alto conteúdo informativo. A extração de DNA foi realizada a partir de amostras obtidas de bulks de folhas de 10 plantas por genótipo, no caso das famílias, ou sementes, no caso dos genitores. O método de extração de DNA utilizado foi o baseado em lise alcalina, conforme descrito por Xin et al. (2003). O DNA extraído foi quantificado com o auxílio do equipamento Thermo Scientific NanoDrop 2000®.

Posteriormente o DNA foi amplificado via PCR. O volume final das reações foi de 5,0  $\mu$ L, sendo utilizado um Kit comercial de reagentes para amplificação adquirido na *Qiagen*®, além dos primers marcados com fluorescência. As reações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), empregando-se o seguinte programa: desnaturação inicial de 15 minutos a 94° C, 40 ciclos de 30 segundos a 94° C, 1 minuto e 30 segundos a 56° C, 1 minuto e 30 segundos a 72° C; com extensão final de 10 minutos a 72° C e finalização a 10° C para manter as amostras refrigeradas. Os produtos de amplificação foram inicialmente homogeneizados utilizando 0,5  $\mu$ L de cada produto de reação em um volume final de 10  $\mu$ L contendo os reagentes formamida e o marcador interno Rox Liz (alaranjado). Posteriormente as amostras foram analisadas em analisador de fragmentos automático ABI3100 (Applied Biosystems), sendo então submetidas à genotipagem, a qual foi realizada com o auxílio do programa GeneMapper.

O programa de Power Marker foi utilizado para estimação da diversidade genética: número de alelos por loco, frequência alélica, diversidade gênica, heterozigosidade e PIC (Liu; Muse, 2005). O programa NTSYS (Rohlf, 2000) foi usado para estimar a distância genética proposta por Rogers-W (Wright, 1978) e em seguida foi utilizado para construção dendrograma, utilizando o método UPGMA.

### Resultados e Discussão

As análises utilizando os 12 locos de microssatélites detectou uma total de 70 alelos entre os sete genitores e as 27 famílias  $C_2S_{1-4}$  avaliadas, com média de 5,83 alelos por loco. O loco com maior número de alelos foi o BM154 (oito alelos) e com menor número foram identificados os locos BM185, BM201 e BM202 (quatro alelos) cada (Tabela 1).

As maiores frequência alélicas foram detectadas nos locos BM202 (0,705), BM187 (0,661) e PV13 (0,656). Este resultado indica uma possibilidade de fixação destes alelos na população base ao longo dos sucessivos ciclos de seleção, caso novos eventos de recombinação não ocorram, pela utilização de famílias divergentes para esses locos nas futuras etapas de recombinação. A diversidade genética considerando todos os genótipos variou entre 0,450 a 0,762, com média de 0,613. Os valores estimados de PIC, ou conteúdo de informação polimórfica, variaram de 0,399 (BM202) a 0,727 (BM189). O valor médio de 0,568. Estas estimativas indicam que, mesmo após dois ciclos de seleção recorrente, a população base continua apresentando um adequado nível de variabilidade genética, o que permitirá a obtenção de ganhos com seleção.

Os índices de heterozigosidade observados variaram de 0,059 a 0,455, com média de 0,160. Também houve um loco com ausência de heterozigotos (BM201). Por se tratarem de linhagens, no caso dos genitores, e famílias  $C_2S_{1-4}$ , baixos índices ou mesmo ausência de heterozigosidade são realmente esperados para a

maioria dos locos nos genótipos avaliados neste estudo. A heterozigidade residual ainda detectada em alguns locos, como no caso dos marcadores BM189 (0,455), BM187 e PV87 (0,206); e BM210, PV272, BM154 (0,182), pode ser explicada o fato das famílias terem sido obtidas usando avanço de gerações em bulk dentro de famílias e pela amostragem de 10 plantas por família na constituição das amostras para análise molecular. Com isso, parte das plantas selecionadas dentro de uma mesma família pode ser homozigota para um dos alelos de um determinado loco, sendo outra parte também homozigota para outro alelo do mesmo loco, e ainda assim este loco poderia apresentar uma alta estimativa para o índice de heterozigidade.

Tabela 1 - Resumo da análise descritiva de 12 marcadores SSR utilizados no estudo de divergência genética de sete genitores e das 27 famílias  $C_2S_{1:4}$  selecionadas no programa de seleção recorrente para tolerância ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro.

Marcador	Nº Alelos	Maior frequência alélica	Índice de Diversidade Gênica	Ho	PIC
<b>BM187</b>	6	0,661	0,525	0,206	0,491
<b>BM189</b>	7	0,363	0,762	0,455	0,727
<b>BM210</b>	5	0,590	0,587	0,182	0,540
<b>PV272</b>	7	0,424	0,728	0,182	0,690
<b>PV87</b>	6	0,441	0,706	0,206	0,662
<b>BM154</b>	8	0,409	0,746	0,182	0,712
<b>BM185</b>	4	0,617	0,563	0,059	0,518
<b>BM201</b>	4	0,515	0,608	0,000	0,537
<b>BM202</b>	4	0,705	0,450	0,147	0,399
<b>PV5</b>	7	0,647	0,523	0,059	0,474
<b>PV25</b>	6	0,469	0,629	0,152	0,561
<b>PV13</b>	6	0,656	0,536	0,094	0,506
<b>Média</b>	<b>5,83</b>	<b>0,541</b>	<b>0,613</b>	<b>0,160</b>	<b>0,568</b>

A partir dos dados da matriz de distância genética de Rogers-W obteve-se um dendrograma (Figura 1) para facilitar a visualização da dissimilaridade genética entre as 27 famílias e os genitores. De maneira geral, nota-se que a maioria dos genitores possui maior distância genética entre si do que em relação ao conjunto de famílias, e do que entre as famílias. Segundo Reis et al. (2011), este tipo de resultado pode ser esperado em programas de seleção recorrente, uma vez que ocorrerá alteração na constituição e na variabilidade genética das famílias em relação aos pais em virtude do método de melhoramento e da pressão de seleção utilizada, reduzindo a variabilidade genética inicial encontrada nos genitores.

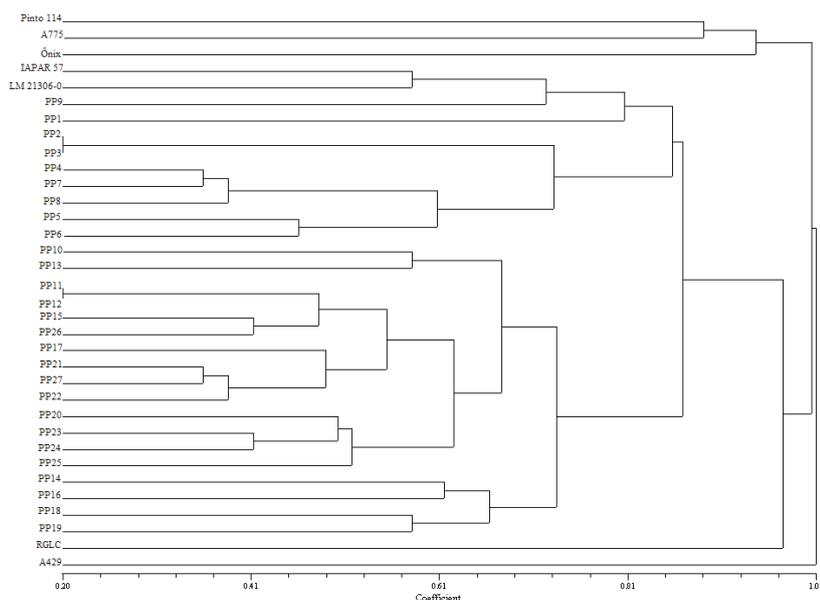


Figura 1-Dendrograma obtido a partir da matriz de distância genética de Rogers-W, utilizando o método UPGMA, entre os sete genitores e as 27 famílias  $C_2S_{1:4}$  selecionadas no programa de seleção recorrente para tolerância ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro.

### Agradecimentos

Os autores são gratos à Universidade Federal do Goiás (UFG) e à Embrapa Arroz e Feijão pela oportunidade de realização do presente trabalho, e ao CNPq pelo apoio financeiro por meio do fomento a projetos e bolsas de iniciação científica e de produtividade.

### Referências

- Geraldi, I.O. Selección recurrente en el mejoramiento de plantas. In Guimarães EP (ed) **Selección recurrente em arroz**. CIAT, Cali, p. 3-11.
- Liu, K.; Muse, S.V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis, 2005. **Bioinformatics Applications Note**, vol. 21: n9: 2128-2129.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao>. Acesso em 24/05/2013.
- Melo, L.C.; Del Peloso, M.J.; Faria, J.C.; Yokoyama, M.; Rosaria, L.; Brondani, R.V.; Brondani, C.; Faria, L.C.; Controle Genético da Reação do Feijoeiro Comum ao vírus do Mosaico Dourado, **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n.15, 2005, 16p. 976.
- Ramalho, M. A. P.; Abreu, A.F.B.; Santos, J.B. Melhoramento de espécies autógamas. In: NASS, L. L. et al. (Ed.). **Recursos Genéticos e Melhoramento: Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT,2001. p. 201-230.
- Reis, R. V et al., 2011. Diversidade genética em seleção recorrente de maracujazeiro amarelo detectada por marcadores microssatélites. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.46, n.1, p.51-57.
- Rohlf, F. J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1**. Exeter Software, New York. 2000. 98p.
- Wright, S. **Evolution and the genetics of populations: variability within and among natural populations**. Chicago: University of Chicago Press, 1978. v.4, 580p.
- Xin, Z.; Velten, J.P.; Oliver, M.J.; Burke, J.J. High-Throughput DNA Extration Method Suitable for PCR. **Biotechniques**, 2003. 34: 820-826.