



## DIVERSIDADE GENÉTICA POR MARCADORES MICROSSATÉLITES DE FEIJÃO PRETO CULTIVADO NO ESPÍRITO SANTO

**Matheus Alves Silva, Marina Santos Carvalho, Cíntia Machado de Oliveira  
Moulin Carias, Sheila Cristina Prucoli Posse, Adésio Ferreira, Marcia Flores da  
Silva Ferreira**

Universidade Federal do Espírito Santo – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias/Departamento de Agronomia, Alto Universitário S/N – CX Postal 16, CEP: 29.500.000 – Alegre – ES, Brasil, alvesmatheuss21@gmail.com, marinasantosufes@gmail.com, ciintia@yahoo.com.br, sheilaposse@incaper.es.gov.br, adesioferreira@gmail.com, mfloressf@gmail.com

**Resumo** – O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das espécies mais cultivadas do gênero, possuindo grande importância econômica e social. Estudos quanto à diversidade genética na cultura, pode agregar importantes informações para discriminação de genótipos promissores ao melhoramento genético. Assim, nesse trabalho objetivou-se avaliar a diversidade genética de 33 genótipos de feijão preto cultivados no Estado do Espírito Santo, sendo 30 crioulos e três comerciais. Para isso, nove marcadores moleculares microssatélites, no qual quatro genômicos e cinco derivados de regiões expressas de EST foram analisados. No geral, os *loci* foram moderadamente informativos apresentando média de 0,381. O número de alelos por loco variou de dois a seis para ambas as classificações de SSR, e um excesso de homozigotos foi observado. Foram obtidos cinco grupos através do dendrograma, no qual em dois alocaram-se tanto genótipos crioulos quanto comerciais. O genótipo G22 se mostrou mais divergente. Esses resultados indicam variabilidade entre os materiais estudados.

**Palavras-chave:** Variabilidade, *Phaseolus vulgaris* L., melhoramento, SSR

**Área do Conhecimento:** Engenharia Agrônoma

### Introdução

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.,  $2n = 22$ ) é uma das espécies mais importantes do gênero *Phaseolus* (ALMEIDA; PEDROSA-HARAND, 2013). Anualmente, o Brasil produz 3,5 milhões de toneladas de feijão em média, e pela projeção no consumo pela população sugere que até 2020 ocorra aumento de 1,22% ao ano (MAPA, 2016).

No Estado do Espírito Santo a cultura está presente em quase toda a sua extensão, cultivada principalmente por agricultores que praticam a agricultura familiar (FONSECA et al., 2007). Os genótipos são adaptados às condições locais, sendo selecionados ao longo de várias gerações. Pelo fato de serem empregadas variedades locais, torna-se necessário caracterizar genótipos existentes, através do estudo da diversidade genética.

Para avaliar a diversidade genética, os marcadores moleculares, os microssatélites constituem uma ferramenta confiável, por apresentarem alto nível de polimorfismo e por serem amplamente distribuídos por todo o genoma (BHARGAVA; FUENTES, 2010). Este marcador tem permitido a discriminação de cultivares e linhagens de feijoeiro estreitamente relacionados, fornecendo uma ferramenta confiável e eficiente para a caracterização de germoplasma, conservação e gestão (BENCHIMOL et al., 2007; PERSEGUINI et al., 2011).

Assim, nesse trabalho, tem-se o objetivo de avaliar a diversidade genética de genótipos de feijoeiro cultivados no Estado do Espírito Santo através de marcadores moleculares microssatélites.

### Metodologia

Através de coleta em propriedades rurais e feiras públicas e da coleção de trabalho do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), foram obtidas sementes de feijão preto de 33 genótipos, dentre os quais 30 crioulos e três comerciais (Tabela 1).



Tabela 1- Identificação, genótipo e tipo das sementes de feijoeiro.

Identificação	Genótipo	Local de coleta	Tipo
G1	FP-01	Vitória	Crioulo
G2	Vagem Riscada 01	Acaraí	Crioulo
G3	Vagem Riscada 02	Muniz Freire	Crioulo
G4	Vagem Riscada 03	Muniz Freire	Crioulo
G5	FP-02	Alegre	Crioulo
G6	FP-03	Alegre	Crioulo
G7	FP-04	Alegre	Crioulo
G8	FP-05	Alegre	Crioulo
G9	FP-05	Alegre	Crioulo
G10	Oito e Nove	Guaçuí	Crioulo
G11	FP-06	CT	Crioulo
G12	Vagem Riscada 04	Guaçuí	Crioulo
G13	FP-07	Domingos Martins	Crioulo
G14	FP-08	Guaçuí	Crioulo
G15	FP-09	Venda Nova	Crioulo
G16	Preto Gigante	Domingos Martins	Crioulo
G17	FP-10	Domingos Martins	Crioulo
G18	FP-11	Alegre	Crioulo
G19	Preto Determinado	CT	Crioulo
G20	Preto AF	CT	Crioulo
G21	Biquinho de Ouro	CT	Crioulo
G22	Vagem Riscada 05	Alegre	Crioulo
G23	FP-11	Alegre	Crioulo
G24	FP-12	Alegre	Crioulo
G25	FP-13	Alegre	Crioulo
G26	FP-14	Alegre	Crioulo
G27	FP-15	Alegre	Crioulo
G28	FP-16	Alegre	Crioulo
G29	CNFP 15304	CT	Comercial
G30	FP-17	Alegre	Crioulo
G31	CNFP 15310	CT	Comercial
G32	CNFP 15290	CT	Comercial
G33	Vagem Riscada 06	Alegre	Crioulo

CT = Coleção de Trabalho do Incaper.

As análises com marcadores moleculares microssatélites, foram realizadas no Laboratório de Genética e Melhoramento Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo. As sementes de cada genótipo foram submetidas à germinação em substrato, visando à obtenção de tecidos foliares para a extração de DNA genômico. A extração do DNA foi feita conforme o método CTAB (Brometo de cetil-trimetil amônio) (DOYLE; DOYLE, 1990). As concentrações e integridade do DNA foram estimados com o uso de espectrofotômetro *Nanodrop™ 2000* (Thermo Scientific).

Foram selecionados 39 *primers* microssatélites em 10 genótipos previamente. A partir disso, foram selecionados nove microssatélites para a análise nos 33 indivíduos. Dos nove *loci* microssatélites, quatro foram genômicos (GAITÁN-SOLÍS et al., 2002; BENCHIMOL et al., 2007) e cinco foram derivados de regiões expressas de EST (HANAI et al., 2007; GARCIA et al., 2011) (Tabela 2).

Tabela 2- Marcadores microssatélites utilizados.

Primer	Sequência 5'-3'	Temperatura de anelamento	Referência
Genômico			
SSR-IAC04	F: GGGGGTGGGATGAATGGA R: CAATCGGACCTGAACAATGAAA	Touch dow: 60°-56	Benchimol et al. (2007)
SSR-IAC10	F: AGGAACTAAAAGCCGAAGTGG R: GCCTCCGCCGATCAACTA	Touch dow: 60°-56	Benchimol et al. (2007)
SSR-IAC22	F: TGCAAACCAAACAAACA R: GGGAAATGCAGGCTTAGAA	60°C	Benchimol et al. (2007)
BM213	F: AACCTAAGCTTCACGCATTTG R: GAGAGATTGACGACGGTTT	60°C	Gaitán-Solís et al. (2002)
SSR-EST			
PvM02	F: CGCCATTTGGATTGGATT R: AGGCGTGGAAGTGGAGTG	60°C	Hanai et al. (2007)
PvM03	F: CCGCCTTCTTCTTCTTCTTC R: CGGCGAGTCATCTTTTCC	62°C	Hanai et al. (2007)
PVEST030	F: GAGGAAACCAGAAATGCTTGAC R: GTTTTATGACAAAGATTTTGCTGC	62°C	Garcia et al. (2011)
PVEST017	F: TTCTCCTTCTCCTTCTCCTCCT R: CGGAATACCCTTTCACCTTCTTG	Touch dow: 60°-56	Garcia et al. (2011)
PVEST008	F: ATGATGAGGAAATATTGGTGGC R: GTGAAGGGGAAGAGAAAAGTT	60°C	Garcia et al. (2011)

As reações de PCR foram feitas com um volume final de 15 ul contendo 50 ng de DNA genômico, 1X de tampão, 0,15uM de *primer*, 1,5 mM de MgCL<sub>2</sub>, 0,15U de Taq DNA polimerase e 0,25 mM de DNTP. As amplificações ocorreram em termociclador sob as seguintes condições: 94°C por 4 min; 30 ciclos de 94°C por 0,45 min, temperatura de anelamento (Tabela 2) por 1 min, 72°C por 1 min; e 72°C por 8 min. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em géis de poliácridamida 10% e corados com GelRed (1,33X).

O tamanho dos alelos foi estimado por comparação visual com um marcador de peso molecular de 100pb. Os dados obtidos foram submetidos a análises descritivas dos *loci* individuais em todos os indivíduos obtendo: o número de alelos por loco (N), heterozigosidade esperada (H<sub>e</sub>), heterozigosidade observada (H<sub>o</sub>), índice de fixação (f) e conteúdo de informação polimórfica (PIC). Essas análises foram realizadas utilizando-se o programa Genes (CRUZ, 2013). A partir da matriz de distância entre os genótipos, foi obtido o agrupamento através da ligação média entre grupos (UPGMA), pelo programa computacional R (TEAM, 2017).

## Resultados

A partir dos dados de microsatélite, foram realizadas análises descritivas de cada loco (Tabela 3).

Tabela 3- Descrição dos *loci* de microsatélites avaliados nos genótipos de feijoeiro.

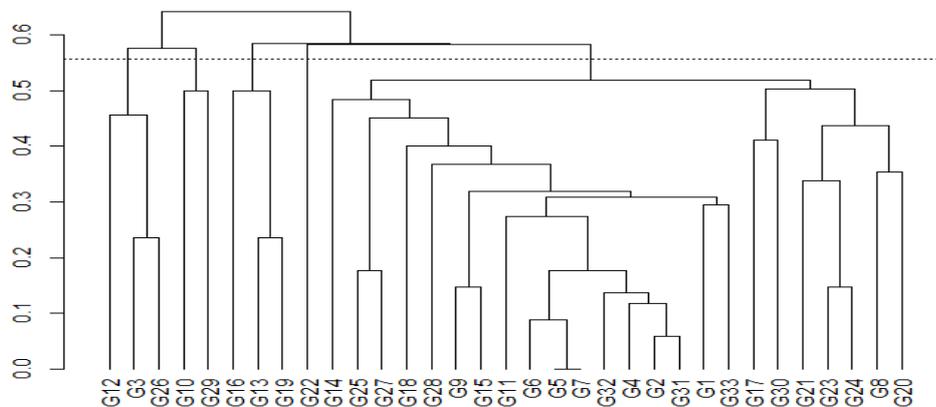
Primer	N	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	f	PIC
SSR-IAC04	3	0,439	0	1,000	0,366
PVEST008	2	0,062	0	1,000	0,061
PvM03	6	0,504	0	1,000	0,481
SSR-IAC10	6	0,615	0,219	0,644	0,546
PVEST017	4	0,277	0	1,000	0,262
PvM02	5	0,538	0,032	0,940	0,498
BM213	3	0,353	0	1,000	0,319
PVEST030	3	0,628	0	1,000	0,555
SSR-IAC22	2	0,437	0	1,000	0,342
Média	3,778	0,428	0,028	0,935	0,381

N = Número de alelos por loco; H<sub>e</sub> = Heterozigosidade esperada; H<sub>o</sub> = Heterozigosidade observada; f = Índice de fixação; PIC = Conteúdo de Informação Polimórfica.

O número de alelos por loco variou de dois (PVEST008 e SSR-IAC22) a seis (PvM03 e SSR-IAC10), com média 3,778. A heterozigosidade esperada apresentou valores de 0,062 (PVEST008) a 0,628 (PVEST030), com média 0,428. A heterozigosidade observada foi verificada em dois locos, sendo 0,032 (PvM02) e 0,219 (SSR-IAC10). O índice de fixação (f) teve média próxima a 1 (0,935). O Conteúdo de Informação Polimórfica variou de 0,061 (PVEST008) a 0,555 (PVEST030) com média 0,381 (Tabela 3).

Pela análise de agrupamento verifica-se a formação de cinco grupos a partir do ponto de corte (Figura 1).

Figura 1- Dendrograma obtido através da ligação média entre grupos (UPGMA) dos 33 genótipos de feijoeiro, através de marcadores microsatélites.



Um grupo foi composto por três genótipos crioulos (G3, G12 e G26). Um outro grupo foi composto por dois genótipos, sendo um crioulo (G10) e um comercial (G29). O genótipo G22 não se agrupou. Os demais genótipos compoam um grande grupo, sendo 24 crioulos e dois comerciais (G31 e G32) (Figura 1).

## Discussão

O número de alelos foi baixo em alguns *loci*, os valores foram similares tanto para os SSR genômicos, quanto para SSR-EST, no qual em ambos ocorreu variação de dois a seis alelos. Hanai et al. (2007) comparando *loci* SSR genômicos e SSR-EST, também observaram um mínimo de dois alelos, assim como o encontrado nesse trabalho, em ambos SSR, no entanto o número máximo foi maior, sendo 7 para SSR genômico e 12 para SSR-EST. Vale ressaltar que o número de genótipos e de marcadores que os autores utilizaram foi superior ao desse trabalho, o que pode ter colaborado para a maior variação.

A heterozigosidade observada, exceto para SSR-IAC10 e PvM02, foi atribuída com valor zero. Já no índice de fixação, apenas os dois marcadores citados apresentaram valores abaixo de um (Tabela 3). De forma geral, a partir desses dois parâmetros evidencia-se que a maior parte dos *loci* avaliados se encontram em homozigose, indicando excesso de homozigotos. A homozigose é ocorrente em genótipos de feijoeiro, visto que a espécie é preferencialmente autógama (LONDERO et al., 2009), apresentando autofecundação igual ou superior a 95%.

De acordo com Botstein et al. (1980) em estudos genéticos o PIC indica a qualidade do marcador molecular. Segundo a classificação apresentada por esses autores, valores abaixo de 0,25 são pouco informativos, de 0,25 a 0,5 medianamente informativos e superiores a 0,5 muito informativos. No presente trabalho, um, seis e três marcadores se enquadraram como pouco, medianamente e muito informativos, respectivamente.

Dois grupos tiveram em sua composição tanto genótipos crioulos quanto comerciais. O fato dos genótipos crioulos ficarem alocados em grupos divergentes revela variabilidade destes materiais para a seleção, entretanto com proximidade a genótipos comerciais. Assim, esses genótipos crioulos podem já possuir características de interesse, uma vez que os comerciais já passaram por algum processo de melhoramento genético.

Um grupo foi composto por apenas um genótipo crioulo, no qual não mostrou similar aos demais. Esse genótipo pode ser indicado à seleção, uma vez que em programas de melhoramento, a busca por materiais genéticos mais divergentes é relatada (STÄHELIN et al., 2011).

## Conclusão

Os marcadores moleculares microssatélites foram eficientes para avaliação da diversidade de feijão preto. Os genótipos de feijoeiro apresentaram diversidade genética. O genótipo G22 foi o mais divergente.

## Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq, Capes e Fapes pelo auxílio financeiro.

## Referências

ALMEIDA, C.; PEDROSA-HARAND, A. High macro-collinearity between lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and the common bean (*P. vulgaris* L.) as revealed by comparative cytogenetic mapping. **Theoretical and applied genetics**, v. 126, n. 7, p. 1909-1916, 2013.

BENCHIMOL, L. L.; CAMPOS, T.; CARBONELL, S. A. M.; COLOMBO, C. A.; CHIORATTO, A. F.; FORMIGHIERI, E. F.; GOUVÊA, L. R. L.; SOUZA, A. P. Structure of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties of Mesoamerican and Andean origins using new developed microsatellite markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, n. 8, p. 1747-1762, 2007.

BHARGAVA, A.; FUENTES, F. F. Mutational dynamics of microsatellites. **Molecular Biotechnology**, v. 44, p. 250-266, 2010.

BOTSTEIN D; WHITE RL; SKOLMICK H. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, 32: 314-331, 1980.



CRUZ, C. D. Programa Genes - Aplicativo Computacional em Genética e Estatística. Viçosa, MG, 2013. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm>> Acesso em: 02 jun. 2017.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

FONSECA, J. R.; MARQUES, E. M. G.; VIEIRA, E. H. N.; DA SILVA, H. T. Algumas características do germoplasma de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) coletado no Espírito Santo. **Revista Ceres**, v. 54, n. 314, p. 358, 2007.

GAITÁN-SOLIS, E.; DUQUE, M.C.; EDWARDS, K. J; TOHME, J. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* spp.. **Crop Science**. 42:6 2128-2136, 2002.

GARCIA, R. A. V.; RANGEL, P. N.; BRONDANI, C.; MARTINS, W. S.; MELO, L. C.; CARNEIRO, M. S.; BORBA, T. C. O.; BRONDANI, R. P. V. The characterization of a new set of EST-derived simple sequence repeat (SSR) markers as a resource for the genetic analysis of *Phaseolus vulgaris*. **BMC genetics**, v. 12, n. 1, p. 41, 2011.

HANAI, L. R.; CAMPOS, T.; CAMARGO, L. E. A.; BENCHIMOL, L. L.; SOUZA, A. P.; MELOTTO, M.; CARBONELL, S. A. M.; CHIORATTO, A. F.; CONSOLI, L.; FORMIGHIERI, E. F.; SIQUEIRA, M. V. B. M.; TSAI, S. M.; VIEIRA, M. L. C. Development, characterization, and comparative analysis of polymorphism at common bean SSR *loci* isolated from genic and genomic sources. **Genome**, v. 50, n. 3, p. 266-277, 2007.

LONDERO, P. M.; RIBEIRO, N. D.; CERUTTI, T.; MAZIERO, S. M.; ROSA, D. P.; ROSA, S. S. Efeito materno na expressão dos teores de aminoácidos sulfurados em grãos de feijão. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, 2009.

MAPA (Ministério da Agricultura Agropecuária e Abastecimento). Feijão. 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao>>. Acesso em: 03 set. 2017.

PERSEGUINI, J. M. K. C.; CHIORATO, A. F.; ZUCCHI, M. I.; COLOMBO, C. A.; CARBONELL, S. A. M.; MONDEGO, J. M. C.; GAZAFF, R.; GARCIA, A. A. F.; CAMPOS T, SOUZA, A. P.; RUBIANO, L.; B. Genetic diversity in cultivated carioca common bean based on molecular marker analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, p. 88-102, 2011.

STÄHELIN, D.; VALENTINI, G.; ANDRADE, L. R. B.; VERÍSSIMO, M. A. A.; BERTOLDO, J. G.; GUIDOLIN, A. F.; COIMBRA, J. L. M. Screening multivariado entre acessos e cultivares de feijão do grupo preto para utilização em blocos de cruzamento. **Biotemas**, v. 24, n. 1, p. 95-103, 2011.

TEAM, R. C. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2017. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 02 jun. 2017.