

**Análise da Variabilidade Genética de
Cultivares de Feijoeiro Comum com
Marcadores ISSR**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 221

Análise da Variabilidade Genética de Cultivares de Feijoeiro Comum com Marcadores ISSR

Gláucia Salles Cortopassi Buso
Ana Yamaguishi Ciampi
Leonardo Cunha Melo
Zilneide Pedrosa de Souza Amaral
Andréa Mazzucato

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Presidente: *Miguel Borges*

Secretária-Executiva: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Diva Maria de Alencar Dusi*
Luiz Adriano Maia Cordeiro
José Roberto de Alencar Moreira
Regina Maria Dechechi G. Carneiro
Samuel Rezende Paiva

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*
Margot Alves Nunes Dode

Supervisor editorial: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Rosameres Rocha Galvão*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2008):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

A 532 Análise da variabilidade genética de cultivares de feijoeiro comum com marcadores ISSR. / Gláucia Salles Cortopassi Buso... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.
- p. - (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 221).

1. Phaseolus vulgaris. 2. Feijão. 3. Variabilidade genética. I. Buso, Gláucia Salles Cortopassi. II. Série.

635.652 – CDD 21

Embrapa, 2008

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	8
Resultados e Discussão	9
Conclusões	11
Referências	11

Análise da Variabilidade Genética de Cultivares de Feijoeiro Comum Com Marcadores ISSR

Gláucia Salles Cortopassi Buso¹

Ana Yamaguishi Ciampi¹

Leonardo Cunha Melo²

Zilneide Pedrosa de Souza Amaral¹

Andréa Mazzucato³

Resumo

O feijão é um alimento importante, principalmente em países em desenvolvimento, onde é utilizado como fonte primária de proteínas, ferro e carboidratos. A média de produtividade de grãos no Brasil, no entanto, é baixa, em virtude, principalmente, da complexidade e diversidade dos sistemas e épocas de cultivo e, também, da estreita variabilidade genética das cultivares comerciais em uso. Uma das alternativas para incrementar esta produtividade é a melhor utilização dos recursos genéticos existentes, como fonte de introdução de variabilidade genética nos programas de melhoramento. O conhecimento da extensão e distribuição da variabilidade genética das espécies cultivadas é uma condição básica para incrementar a utilização do germoplasma nesses programas. Para esta finalidade, marcadores moleculares fornecem a melhor estimativa da diversidade genética, pois são independentes de efeitos ambientais. A técnica de marcadores ISSR (Inter simple sequence repeats) envolve a amplificação de DNA por PCR e são supostamente, marcadores nucleares neutros e dominantes, reproduzíveis e não requerem conhecimento prévio da seqüência genômica. A utilização de ISSRs tem sido uma forma rápida, simples e barata para acessar a diversidade, para identificação de cultivares e populações geneticamente próximas e para estudos de processos evolucionários, como sistemas reprodutivos e fluxo gênico. Foram analisadas 6 cultivares de feijão (Rim de porco, Enxofrão2, Enxofrão3, Rosinha, Paraná, Jalo1) com 5 amostras de cada. Utilizou-se 9 primers ISSR que apresentaram marcadores no mapa referência de feijão (Bat93 X Jalo EEP558), e nas cultivares analisadas amplificaram 26 marcadores. ISSR mostrou-se promissora, reproduzível para detecção de variabilidade entre cultivares, não mostrando variação entre amostras da mesma cultivar.

Termos para indexação:

Phaseolus vulgaris, seqüências internas repetitivas, variabilidade genética,

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Embrapa Arroz e Feijão

³ Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica (DABAC) of Università degli Studi della Tuscia, Viterbo

Genetic variability analysis of bean cultivars with ISSR markers

Abstract

Beans are very important food legume, mainly for developing countries where they are used as primary protein, iron and carbohydrate source. The mean productivity in Brazil is low, due, mainly, to complexity of cultivation systems and cultivation time and also to the low genetic variability of commercial cultivars in use. The knowledge of extension and distribution of the genetic variability is an important condition to improve the germplasm utilization in breeding programs. To this end, molecular markers provide the best genetic diversity estimate, as they are independent of environmental effects. The ISSR (Inter simple sequence repeats) technique involves the DNA amplification by PCR. These markers are supposedly nuclear, neutral, dominant and do not require previous knowledge of the genomic sequence. The utilization of ISSR has been a fast, simple and cheap way to access the diversity, to identify cultivars and populations genetically close and to study evolutionary processes, as reproductive system and gene flow. Six bean cultivars (Rim de porco, Enxofrão2, Enxofrão3, Rosinha, Paraná, Jalo1) were analyzed, with five samples of each. Nine ISSR primers that were mapped in the reference map were utilized and presented 26 polymorphic markers. ISSR showed to be promissory and reproducible to detect variability between bean cultivars, showing no variation within samples of the same cultivar.

Index terms:

Phaseolus vulgaris, ISSR, genetic variability, germplasm

Introdução

Visando o manejo sustentável da agrobiodiversidade nos biomas Cerrado e Caatinga, o Programa Biodiversidade Brasil-Itália fez um trabalho participativo para levantar as características desejáveis de comunidades de pequenos agricultores em seu contexto ambiental e socioeconômico. Estas características vêm sendo alvo das atividades com marcadores moleculares a serem utilizados na conservação, no melhoramento genético e eventual seleção. Para feijoeiro comum: tolerância à baixa fertilidade do solo (N, P e K); tolerância ao estresse hídrico; tolerância à alta temperatura; tolerância à podridão de fusário; tolerância à mancha angular e precocidade. O feijão é um alimento importante, principalmente em países em desenvolvimento, onde é utilizado como fonte primária de proteínas, ferro e carboidratos. O feijoeiro comum é cultivado em todos os estados da Federação, e os principais, Paraná, Minas Gerais, Bahia, São Paulo e Santa Catarina, representam 55% da produção (SANTOS e BRAGA, 1998). A média de produtividade no Brasil, no entanto, é baixa, em virtude, principalmente, da complexidade e diversidade dos sistemas e épocas de cultivo e, também, da estreita variabilidade genética das cultivares comerciais em uso. Uma das alternativas para incrementar esta produtividade é a melhor utilização dos recursos genéticos existentes, como fonte de introdução de variabilidade genética nos programas de melhoramento.

Para esta finalidade, marcadores moleculares fornecem a melhor estimativa da diversidade genética. A técnica de marcadores ISSR (Inter simple sequence repeats) envolve a amplificação de DNA por PCR, usando um único primer composto de uma seqüência de microssatélite, ancorado na região 3` ou 5` por dois a quatro nucleotídeos arbitrários e sempre degenerados (ZIETKIEWICZ et al., 1994) (Fig 1). São supostamente, marcadores nucleares neutros e dominantes, reproduzíveis e não requerem conhecimento prévio da seqüência genômica.

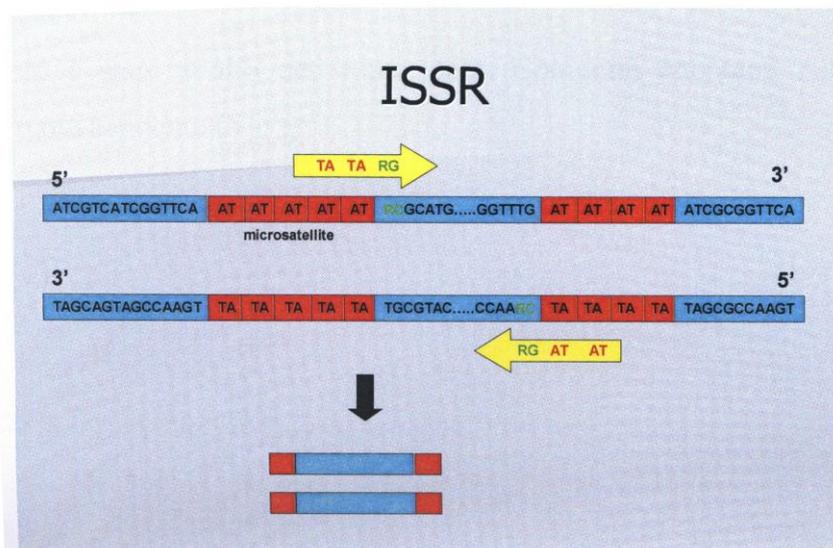


Figura 1 - Esquema do desenho de primers ISSR e da amplificação (GIANFILIPPI, 2006)

Este trabalho teve como objetivo testar a utilização de ISSRs como uma forma rápida, simples e barata para acessar a diversidade e para identificação de cultivares de feijoeiro comum.

Material e Métodos

Para o desenvolvimento deste trabalho foram analisadas 6 cultivares crioulas de feijoeiro comum: A- Rim de porco, B- Enxofrão2, C- Enxofrão3, D- Rosinha, E- Paraná, F- Jalo1) com 5 amostras de cada. O DNA foi extraído de folhas jovens de acordo com o protocolo descrito em Ferreira e Grattapaglia (1998).

Testou-se 12 primers ISSR que representam marcadores no mapa referência de feijão (Bat93 X Jalo EEP558) (ACAMPORA et al., 2007) (Tabela 1). Desses, 9 primers apresentaram polimorfismo entre as cultivares analisadas. A análise dos marcadores ISSR polimórficos permitiu gerar uma matriz binária baseada na presença ou ausência destes marcadores, utilizada para estimar a similaridade genética entre os acessos, empregando-se o coeficiente de Jaccard. Os acessos foram agrupados segundo sua similaridade pelo método de agrupamento UPGMA ("Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average") utilizando o software NTSYS versão 2.02pc (ROHLF, 1992) e os agrupamentos foram observados por meio do dendrograma produzido.

Tabela 1. Primers utilizados em estudos genéticos de feijoeiro comum no Laboratório da Universidade de Viterbo

Temperatura anelamento 42 ^o C	Degeneração	Temperatura anelamento 56 ^o C	Degeneração
ISSR1 (GACA) ₃ RG	R= A+G	ISSR7 (AG) ₈ YG	Y= C+T
ISSR2 (GACAC) ₂		ISSR8 (CA) ₈ RY	R= A+G
			Y= C+T
ISSR3 (GA) ₈ RG	R= A+G	ISSR9 (AC) ₈ YA	Y= C+T
ISSR4 YR(GACA) ₃	Y= C+T	ISSR10 (GA) ₈ YT	Y= C+T
	R=A+G		
ISSR5 (ACTG) ₃ RG	R= A+G	ISSR11 (GT) ₈ YC	Y== C+T
ISSR6 (GACA) ₃ RT	R= A+G	ISSR12 BDB(CA) ₇	B= G+T+C
			D= G+A+T

Resultados e Discussão

Os 9 primers ISSR (ISSR1, ISSR2, ISSR3, ISSR5, ISSR6, ISSR7, ISSR9, ISSR11, ISSR12) utilizados nas cultivares analisadas amplificaram 26 marcadores polimórficos (Fig.3) de um total de 100 fragmentos amplificados. As bandas variaram de 300 a 1400 pb de tamanho quando comparadas ao marcador 1 Kb. O primer ISSR6 amplificou uma banda que ocorreu somente nos indivíduos da cultivar Paraná, enquanto os 26 marcadores ISSR selecionados e utilizados na análise de similaridade distinguiram claramente as cultivares incluídas nesse estudo.

Um dendrograma UPGMA resultante da análise de agrupamento SAHN baseada no coeficiente de dissimilaridade de Jaccard é mostrado na Figura 2. Ele inclui os 30 indivíduos avaliados, 5 de cada cultivar. O fenograma contém 6 grupos correspondentes às 6 cultivares, sendo que não houve diferença entre os indivíduos de cada cultivar.

Adicionalmente, as cultivares não foram agrupadas de acordo com seu grupo gênico, pois Jalo, Enxofrão 2, Enxofrão 3 são do grupo andino e Rin de Porco, Paraná e Rosinha do mesoamericano (Fig 2). Inter simple sequence repeats tem sido usado para explorar a estrutura genômica, acessar a diversidade genética em coleções de germoplasma, assim como determinar a frequência de repetições de seqüências simples em várias espécies (BLAIR et al.; PREVOST e WILKINSON, 1999). Os ISSRs têm provado serem reproduzíveis, fáceis de gerar, e um conjunto versátil de marcadores que não necessitam conhecimento prévio da seqüência do genoma para gerar marcadores, como SSRs (GUPTA et al., 1994). A flexibilidade para desenhar primers contendo di-, tri-, ou tetra-nucleotídeos repetitivos ancorados por um ou mais nucleotídeos no final 3' ou 5' faz deles marcadores ideais para explorar o genoma de qualquer espécie, incluindo aquelas que não se tem conhecimento prévio da seqüência de DNA.

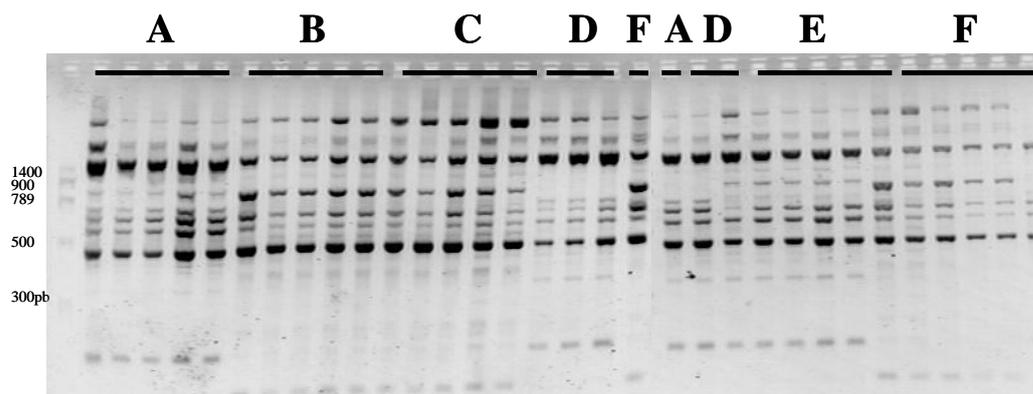


Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 2% da reação com primer ISSR 3 para Feijão; Coluna 1- marcador molecular; A- amostras da cultivar Rim de Porco; B- cultivar Enxofrão3; C- cultivar Enxofrão2; D- cultivar Rosinha; E- Paraná; F- cultivar Jalo.

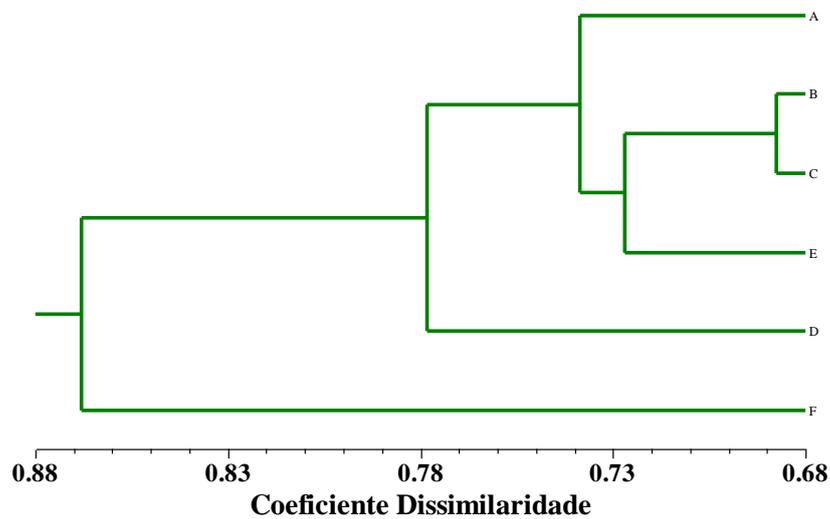


Figura 3 – Dendrograma representando a dissimilaridade de Jaccard entre 6 cultivares de *feijão* analisadas com 24 locos ISSR. As porcentagens indicam as consistências dos nós. A- amostras da cultivar Rim de Porco; B- cultivar Enxofrão3; C- cultivar Enxofrão2; D- cultivar Rosinha; E- cultivar Paraná; F- cultivar Jalo.

Conclusões

Os resultados obtidos mostram que ISSR é uma técnica promissora de grande valia para utilização em estudos da variabilidade genética em acessos de feijoeiro comum, sobretudo para a distinção de cultivares. Este marcador pode ainda ser utilizado em estudos de estrutura genética das coleções, mapeamento de características importantes e utilização futura na seleção assistida por marcadores moleculares e análise de pedigree.

Referências

ACAMPORA, A.; CIAFFI, M.; PACE, de C.; PAOLACCI, A. R.; TANZARELLA, O. A. Pattern of variation for seed size traits and molecular markers in Italian germplasm of *Phaseolus coccineus* L. **Euphytica**, Dordrecht, Netherlands, v. 157, p. 69-82, 2007.

BLAIR, M.; PANAUD, O.; MCCOUCH, S. Inter-simple sequence repeats (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting of rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 98, p.1517-1522, 1999.

BUSO, G. S. C.; AMARAL, Z. P. de S.; MORETZSOHN, M. de C.; BRONDANI, C.; SILVA, H. T. da. **Estudo das relações genéticas de acessos de feijão utilizando marcadores RAPD**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 21 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 9).

CERQUEIRA, A. A.; AZEVEDO, V. C. R.; AMARAL, Z. P. S.; FERREIRA, M. A.; OHSE, B. J. G.; BRONDANI, R. V.; BRONDANI, C.; DEL PELOSO, M. J.; MELO, L. C.; BASSINELLO, P. Z.; CARNEIRO, S. T.; SIBOV, M. S.; BUSO, G. S. C. **Identificação, desenvolvimento e caracterização de regiões hipervariáveis (microssatélites) para estudos genéticos do feijoeiro comum**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51., 2005, Águas de Lindóia, SP. A era da genômica: da bioestatística à bioinformática: anais. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2005. p. 644.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introducao ao uso de marcadores moleculares em analise genetica**. 3. ed. Brasilia: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 20). Disponível em: <<http://www.cnepaf.embrapa.br/>>. Acesso em: 2005.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introducao ao uso de marcadores moleculares em analise genetica**. 3.ed. Brasilia: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p. (EMBRAPA CENARGEN. Documentos, 20).

GALVAN, M. Z.; BORNET, B.; BALATTI, P. A.; BRANCHARD, M. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, Dordrecht, Netherlands, v. 132, p. 297-301, 2003.

GIANFILIPPI, F. **Studio della diversita molecolare in popolazioni locali italiane di lenticchia (*Lens culinaris* Medik) tramite marcatori**. Tuscia: Università degli studi della Tuscia, 2006. Tesi de láurea Agrária

GUPTA, M.; CHUI, Y. S.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89, p. 998-1006, 1994.

JIN, L.; CHAKRABORTY, R. Estimation of genetic distance and coefficient of gene diversity from single-probe multilocus DNA fingerprinting data. **Molecular Biology Evolution**, Chicago, v. 11, n. 1, p. 120-127, 1993.

PREVOST, A.; WILKINSON, M. A new system of comparing: PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 98, p. 107-112, 1999.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc**: Em umerical Taxonomy and Multivariate System. Version 2.9. New York: Applied Biostatistics, 1993.

SANTOS, M. L. dos; BRAGA, M. J. Aspectos econômicos. In: VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T. J. de; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão**: aspectos gerais e cultura no estado de Minas. Viçosa, M. G.: Universidade Federal de Viçosa, 1998.

SILVA, H. T. da. **Análise da divergência genética do germoplasma de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) melhorado e tradicional (Crioulo) cultivado no Brasil, e das formas silvestres de origem centro e sul americana**. Botucatu: UNESP, 1999. 111 p. Tese de Doutorado.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, San Diego, v. 20, p.176-183, 1994.

Apoio: Programa Biodiversidade Brasil-Itália