

DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE GENÓTIPOS DE FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) DA COMUNIDADE FORTALEZA NO MUNICÍPIO DE MUQUI - ESPÍRITO SANTO**Franciele Barros de Souza¹, Pablo Diego Silva Cabral², Diogo Souza Alves¹, Fábio Demolinari de Miranda¹, Andreia Barcelos Passos Lima¹, Taís Cristina Bastos Soares¹**¹ Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, UFES. Alto Universitário, s/nº Alegre, ES – 29.500-000, tcbsoares@yahoo.com.br² Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro/ Doutorando em Genética e Melhoramento de Plantas, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil, pablodscabral@hotmail.com

Resumo- O gênero *Phaseolus* possui cerca de 55 espécies, sendo o feijão-comum *Phaseolus vulgaris* L, o mais importante, por ser a espécie cultivada mais antiga e por ser fonte de abastecimento alimentar do mundo. Em virtude da grande importância alimentar e econômica do feijoeiro, muitos estudos tem sido realizado para caracterização de genótipos por meio de marcadores moleculares. A técnica de ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) tem sido amplamente utilizada nestes estudos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade genética de genótipos de feijoeiro do sul do Espírito Santo, comparando os genótipos locais, com genótipos da EMBRAPA-TRIGO (sul do Brasil) e genótipos comerciais, utilizando marcadores moleculares ISSR. Foi encontrada uma dissimilaridade média correspondente a 0,44, indicando a existência de uma ampla variabilidade genética entre alguns genótipos estudados. O cultivar Pérola apresentou a maior média de dissimilaridade (0,76) em relação aos outros e por isso pode ser recomendado para armazenamento em bancos de germoplasma. Além disso, foi possível indicar o genótipo Fortaleza 26 como promissor para estudos de características morfoagronômicas.

Palavras-chave: Feijoeiro, Dissimilaridade genética, Marcador ISSR, Variabilidade.**Área do Conhecimento:** Agronomia/Fitotecnia/Melhoramento Vegetal.**Introdução**

A história de domesticação do feijoeiro é explicada por diversas hipóteses e origens, atualmente a mais aceita é que existem três centros primários de diversidade genética, o Mesoamericano, sul e norte dos Andes, como também vários outros centros secundários (BORÉM et al., 2006; EMBRAPA, 2010)

O feijão pertence à classe Dicotyledoneae e está incluído dentro da família *Leguminosae* que possui mais de 600 gêneros, reunindo mais de 13000 espécies (JOLY, 2005). O gênero *Phaseolus* possui cerca de 55 espécies, das quais cinco são cultivadas: *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolus* A. Gray var. *latifolius* Freeman e *P. polyanthus* Greenman (DEBOUCK, 1993). Entre elas, o feijão-comum *Phaseolus vulgaris* L é o mais importante, por ser a espécie cultivada mais antiga e por ser fonte de abastecimento alimentar do mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, em termos de alimentação energética, bem como nutrientes (BORÉM, et al., 2006).

Em virtude da grande importância alimentar e econômica do feijoeiro, muitos estudos tem sido realizado para caracterização de genótipos por meio de marcadores moleculares. Esta prática tem-se tornado cada vez maior e tem auxiliado no

mapeamento genético, distinção entre espécies de plantas, no estudo da quantidade de variação no germoplasma de plantas e comparações entre diferentes acessos (FORT-LLOYD et al., 1994).

A natureza poligênica dos caracteres de importância agrônômica e a interação genótipo-ambiente constituem um dos maiores desafios para análise de diversidade entre genótipos e para o processo de seleção em um programa de melhoramento (BORÉM; CAIXETA, 2006). Sendo assim, a utilização de marcadores moleculares permite a identificação e seleção de indivíduos baseada diretamente no genótipo, o que resulta em maior eficiência para ganhos genéticos (LOPES, 2007).

Diversos métodos de análise molecular são empregados em estudos de variabilidade em plantas, visando identificar e determinar relações entre espécies e cultivares. A técnica de ISSR (ZIETKIEWICZ et al., 1994) tem sido amplamente utilizada nestes estudos por ser um procedimento simples, eficiente, possuir alta reprodutibilidade e gerar altos índices de polimorfismo (REDDY et al., 2002).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade genética de genótipos de feijoeiro do sul do Espírito Santo, comparando os genótipos locais, com genótipos da EMBRAPA-

TRIGO (sul do Brasil) e genótipos comerciais, utilizando marcadores moleculares ISSR.

Metodologia

Neste experimento foram utilizados 57 genótipos de feijoeiro (Tabela 1), sendo 20 fornecidos pela EMBRAPA-TRIGO, 31 obtidos de pequenos produtores da comunidade Fortaleza (Muqui-ES), e 6 cultivares comerciais como referência: Carioca, Serrano, IAPAR 31, IAPAR 44, IAPAR 81 e Pérola. Cada genótipo foi plantado em copos descartáveis e acondicionado na casa de vegetação do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo com temperatura de 27° C e 10% de umidade até o crescimento foliar (10 dias).

Tabela 1 - Identificação e origem dos genótipos utilizados para análise de diversidade genética.

Identificação	Origem	Identificação	Origem
Pérola	Comercial	F33	Local
F2	Local	F34	Local
F3	Local	F35	Local
F5	Local	F36	Local
F6	Local	F37	Local
F7	Local	F38	Local
F8	Local	E 01	EMBRAPA
F9	Local	E 02	EMBRAPA
F10	Local	E 03	EMBRAPA
F11	Local	E 04	EMBRAPA
F13	Local	Iapar 31	Comercial
F14	Local	E 06	EMBRAPA
F15	Local	E 07	EMBRAPA
F16	Local	E 08	EMBRAPA
F17	Local	E 09	EMBRAPA
F18	Local	E 10	EMBRAPA
F19	Local	E 11	EMBRAPA
F20	Local	E 12	EMBRAPA
F21	Local	E 13	EMBRAPA
F23	Local	E 14	EMBRAPA
F24	Local	E 15	EMBRAPA
F25	Local	E 16	EMBRAPA
F26	Local	E 17	EMBRAPA
Iapar 81	Comercial	E 18	EMBRAPA
F28	Local	E 19	EMBRAPA
Carioca	Comercial	Iapar 44	Comercial
Serrano	Comercial	E 21	EMBRAPA
F31	Local	E 22	EMBRAPA
F32	Local		

As folhas de cada planta foram coletadas, identificadas e posteriormente foi realizada a

extração de DNA, segundo protocolo de Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações propostas por Abdelnoor et al. (1995).

As amostras de DNA dos cultivares foram amplificadas pela técnica de ISSR, de acordo com Svetleva et al. (2006). Foram utilizados 11 *primers* (Tabela 2) selecionados de acordo com a literatura dentre aqueles que apresentaram maior polimorfismo para feijoeiro.

Tabela 2 - *Primers* ISSR utilizados nas análises de diversidade genética.

Primer	Seqüência no sentido 5'3'
UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC
UBC843	CTCTCTCTCTCTCTRA
UBC854	TCTCTCTCTCTCTCRG
UBC855	ACACACACACACACACYT
UBC857	ACACACACACACACACYG
UBC859	TGTGTGTGTGTGTGTGRC
UBC880	GGAGAGGAGAGGAGA
808	AGAGAGAGAGAGAGAGC
810	GAGAGAGAGAGAGAGAT
834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT
890	VHVGTGTGTGTGTGTGT

O registro de dados moleculares foi feito a partir das bandas polimórficas detectadas entre os cultivares. Assim, foi gerada uma matriz de valores binários, onde a codificação (0) significará ausência e (1) presença da banda. As estimativas de dissimilaridade genética (*d_{ij}*) foram feitas de acordo com o complemento aritmético do coeficiente de Jaccard (1901).

Os valores de dissimilaridade genética foram organizados em matrizes para serem empregadas na análise de agrupamento pela ligação média entre grupos (UPGMA). As análises de divergência genética e de agrupamento foram realizadas com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2008).

Resultados

Os marcadores moleculares ISSR foram bastante eficientes para o estudo da diversidade genética em feijoeiro. Os 11 *primers* utilizados produziram 51 bandas, destas 39 foram polimórficas, com média de 3,5 bandas polimórficas por *primer*, correspondendo a 76,4% de polimorfismo. Houve variações de polimorfismo em cada *primer*: o *primer* 834 foi o mais polimórfico (seis bandas) e os *primers* 890 e UBC880 os menos polimórficos com duas bandas (Tabela 3).

Tabela 3: Polimorfismo e número de bandas apresentado pelos *primers* ISSR utilizados para análise.

<i>Primer</i>	Números de bandas	Número de bandas polimórficas
UBC841	5	3
UBC843	5	3
UBC854	5	4
UBC855	4	4
UBC857	4	3
UBC859	4	3
UBC880	3	2
808	6	5
810	6	4
834	7	6
890	2	2
Total	51	39

As distâncias genéticas entre os 57 genótipos foram analisadas através da matriz de dissimilaridade produzida pelo complemento de coeficiente de Jaccard, apresentando uma distribuição bastante desuniforme, variando 0,00 a 1,0, com média de 0,44. Foi observada uma concentração no intervalo de 0,2 a 0,69, correspondendo a mais de 86% da dissimilaridade total observada. A classe que compreende de 0,5 a 0,59 apresentou a maior frequência da dissimilaridade com 23,37% do total (Figura 1).

Os genótipos E22 e F07 juntamente com F16 e E19 apresentaram a menor dissimilaridade entre os pares 0,0. A maior distância genética (1,0) foi encontrada entre F16 e outros três genótipos, Pérola, F08 e F13. A cultivar Pérola apresentou a maior média de dissimilaridade, 0,76, demonstrando que esta cultivar tem uma alta divergência em relação aos outros genótipos em estudo (Figura 1).

Como observado no dendograma, os 57 genótipos foram distribuídos em 11 grupos (Tabela 4) de acordo com a distância genética entre eles.

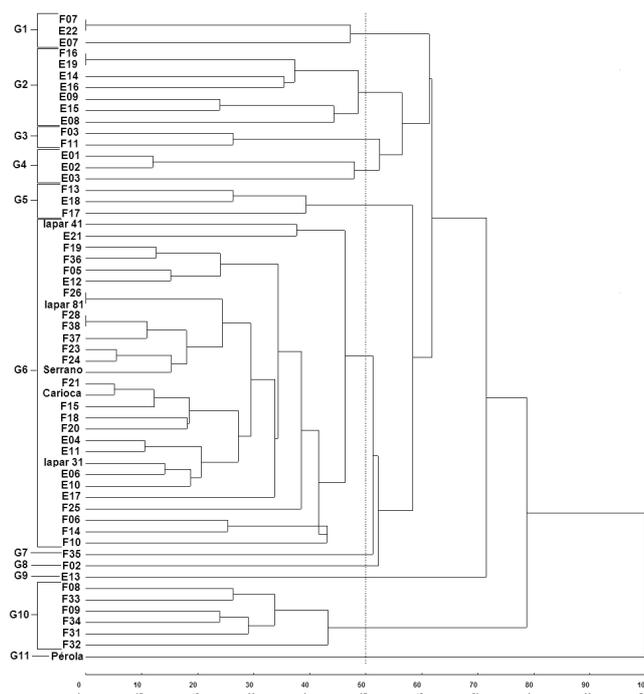


Figura 1 – Dendrograma obtido através de marcadores ISSRs com o complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard e pelo método de agrupamento UPGMA, dos 57 genótipos de feijão comum; linha pontilhada: corte no dendrograma em aproximadamente 50%; G 1 a G 11 são os 11 grupos formados.

Tabela 4 – Agrupamento dos 57 genótipos de feijoeiro a partir do dendrograma obtido através de marcadores ISSR com o complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard e pelo método de agrupamento UPGMA.

Grupo	Genótipos
G1	F07, E22 e E07
G2	F16, E19, E14, E16, E09, E15 e E08
G3	F03 e F11
G4	E01, E02 e E03
G5	F13, E18 e F17
G6	lapar 44, E21, F19, F36, F05, E12, F26, lapar 81, F28, F38, F37, F23, F24, Serrano, F21, Carioca, F15, F18, F20, E04, E11, lapar 31, E07, E10, E17, F25, F06, F24 e F10
G7	F35
G8	F02
G9	E13
G10	F08, F33, F09, F34, F31 e F32
G11	Pérola

Discussão

Como apresentado nos resultados, a partir dos 11 *primers* utilizados foi obtido um total de 76,4% de polimorfismo e 23,6% de bandas polimórficas, com uma média de 3,5 bandas polimórficas por *primer*. Resultados semelhantes foram observados por Carvalho et al. (2008), onde foram utilizados 21 iniciadores ISSR na análise de diversidade, obtendo 96 bandas polimórficas, com média de 4,6 bandas por *primer*. Yong-Cui et al. (2005) trabalhando com cevada em análises com ISSR, identificaram um total de 107 bandas, sendo 105 bandas polimórficas (98,13%), com 5,94 bandas por *primer*. Muthusamy et al. (2008) utilizaram 37 *primers* ISSR em análise de diversidade de feijoeiro e obtiveram 479 bandas das quais 296 foram polimórficas, correspondendo a 61,79% de polimorfismo.

Analisando o dendograma da Figura 1 nota-se que a técnica de ISSR possibilitou a distinção e agrupamento dos genótipos. Paula et al. (2007) estudando a variabilidade genética em oliveira através dos marcadores ISSR e RAPD, destacaram que essas técnicas permitiram identificar individualmente todos os cultivares de oliveira estudados. Acampora et al. (2007), estudando a variação do germoplasma Italiano de *P. coccineus* L. com marcadores ISSR, RAPD e ETs (regiões de éxon) demonstraram que o ISSR foi o mais eficiente na separação dos grupos de acordo com suas origens e distinção entre os genótipos.

Os agrupamentos apresentados na Figura 1 evidenciam uma média de dissimilaridade correspondendo a 0,44, indicando a existência de uma ampla variabilidade genética entre alguns genótipos estudados, principalmente aqueles com dissimilaridade entre 0,5 a 0,59, que possuem a maior frequência da dissimilaridade total. Entre estes genótipos destaca-se o F16, que possui a maior distância genética (1,0) quando comparado aos genótipos Pérola, F08 e F13. A ampla variação de dissimilaridade encontrada é muito importante, pois sugere a existência de genótipos mais divergentes na região sul do Espírito Santo.

O genótipo comercial Pérola obteve a maior média de dissimilaridade (0,76) em relação aos demais (Figura 1). Esta constatação fornece informações relevantes para a agricultura, pois indica que mesmo sendo comercial este genótipo possui características genéticas próprias, podendo contribuir para o aumento da heterose entre as variedades em programas de melhoramento. Fikuru et al. (2007) ao estudarem a diversidade genética e estrutura populacional de lentilha, relataram que genótipos com maiores distâncias genéticas possuem boas implicações para conservação futura em bancos de germoplasma.

Franco et al. (2001) estudando a diversidade em *P. vulgaris*, relataram que a identificação de cultivares com máxima variabilidade genética é importante para a ocorrência de maior segregação entre os descendentes.

Neste estudo, além da constatação de alguns genótipos com maior variabilidade, observou-se também a existência de alguns genótipos que possuem pequenas distâncias genéticas (Figura 1, Tabela 4). As cultivares comerciais e os pares de genótipos E22-F07, F16-E19, F26-IAPAR 81 e F28-F38 (apresentaram a dissimilaridade igual a 0,0) tiveram maior destaque.

Emygdio et al. (2003) trabalhando na comparação entre cultivares locais e comerciais de feijoeiro através de marcadores RAPD, destacaram que os genótipos comerciais apresentaram distâncias genéticas pequenas, pertencendo a um mesmo grupo dentro do dendograma, como visto no presente estudo. Os autores relataram que esta constatação pode ser devido à estreita base genética na qual foram gerados.

A Tabela 5 mostra a relação de dissimilaridade dos genótipos comerciais, locais e os da EMBRAPA, enfatizando os genótipos que apresentaram as menores distâncias genéticas. Vários genótipos apresentaram alta similaridade, quando comparados aos comerciais, como observando entre Fortaleza 26 e Iapar 81 (distância igual 0,00). Esta análise demonstra a existência de genótipos promissores para estudos de características morfoagronômicas, podendo assim avaliar o seu potencial de produção na agricultura, relacionando com características importantes das cultivares comerciais. Souza et al. (2009) submeteram genótipos de feijoeiro em análises de divergência genética e compararam genótipos comerciais com locais utilizando marcadores RAPD. Os autores indicaram dois genótipos que podem ser promissores para o cultivo na região sul do Espírito Santo.

Tabela 5: Distância Genética entre Genótipos comerciais, da comunidade Fortaleza e EMBRAPA obtidos através de marcadores ISSR com o complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard

Genótipos	Distâncias Genéticas
IAPAR 81-F15-F21-F23	0,15
F07- E22	0,00
IAPAR 81-F26	0,00
E4-E11	0,08
Carioca-F19-F24	0,12
F28-F38	0,00
Carioca-F21	0,04
E1-E2	0,09
F20-F21	0,10
F24-F23	0,04
Serrano-F24	0,08
E19-F16	0,14
E11-E15-F24	0,12

Conclusão

- Os marcadores moleculares ISSR possibilitaram a avaliação da diversidade genética entre genótipos de *P. vulgaris* indicando genótipos promissores para estudos de características morfoagronômicas (Fortaleza 26);
- Existe uma ampla variabilidade genética entre alguns genótipos estudados, destacando-se o F16, que possuiu a maior distância genética (1,0) quando comparado com Pérola, F08 e F13;
- O genótipo Pérola apresentou a maior média de dissimilaridade (0,76) em relação aos demais genótipo estudado, sendo por isso, recomendado para armazenamento em bancos de germoplasma;
- Foi constatada alta similaridade entre alguns genótipos, principalmente entre aqueles pertencentes à mesma região e entre os comerciais.

Referências

- ABDELNOOR, R. V.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, v. 18, p.265-273, 1995.

- ACAMPORA, A. et al. Pattern of variation for seed size traits and molecular markers in Italian germplasm of *Phaseolus coccineus* L. **Euphytica**, Italy, v. 157, p. 69–82, mar. 2007.

- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores Moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006, 374 p.

- BORÉM, A.; VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J. (Ed.). **Feijão**. 2. ed. atual. Viçosa, MG: UFV, 2006. 600 p.

- CARVALHO, M. F. Caracterização da diversidade genética entre acessos crioulos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) coletados em Santa Catarina por marcadores RAPD. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.6, p. 1522-1528, jan. 2008.

- CRUZ, C. D. Programa Genes – versão Windows. Ed. UFV. Viçosa, MG. 278 p. 2008.

- DEBOUCK, D. Systematics and morphology. In: SCHOONHOVEN, A. van and VOYSESR, O. (eds.). **Common beans – Research for crop improvement**. Cali, CAB International, CIAT, p. 55-118, 1993.

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

- EMBRAPA. Arroz e feijão. Origem e História do feijão. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/feijao/historia.htm>>. Acesso em: 29 abr. 2010.

- EMYGDIO, B. M. Diversidade genética em cultivares locais e comerciais de feijão baseada em marcadores RAPD. **Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília**, v. 38, n. 10, p. 1165-1171, out. 2003.

- FIKIRU, E.; TESFAYE, K.; BEKELE, E. Genetic diversity and population structure of Ethiopian lentil (*Lens culinaris* Medikus) landraces as revealed by ISSR marker. **African Journal of Biotechnology**, Ethiopia, v. 6, n. 12, p. 1460-1468, may. 2007.

- FORT-LLOYD, B. V. et al. The use of RAPD for identifying and classifying *Musa* germplasm. **Genome**, Edgbaston, v 37, n. 2, p. 328-332, abr. 1994.

- FRANCO, M. C. et al. Caracterização da diversidade genética em feijão por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília**, v. 36, n. 2, p. 381-385, fev. 2001.

- JACCARD, P. 1901. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura Bull. **Society Vaudoise Scientific Nature**, v. 37, p. 547-579.

- JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 13. ed. São Paulo, SP: Nacional, 2002. 777 p.

- LOPES, V. R. Divergência genética entre clones de cana-de-acucar da série RB97. 2007. 87 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

- MUTHUSAMY, S. KANAGARAJAN, S. PONNUSAMY, S. Efficiency of RAPD and ISSR markers system in accessing genetic variation of rice bean (*Vigna umbellata*) landraces. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso – Chile, n. 3, v. 11, jul. 2008.

- PAULA, M. L. et al. RAPD and ISSR molecular markers in *Olea europaea* L.: Genetic variability and molecular cultivar identification. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Portugal, v. 54, p. 117–128, apr. 2007.

- REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, India, v. 128, p. 9-17, mar. 2002.

- SOUZA, F. B et al. Caracterização Molecular de Genótipos de Feijão Comum Cultivados nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil. In: Encontro Latino Americano de Pós Graduação, São José dos Campos - SP. O paradigma do século XXI, 2009.

- SVETLEVA D.; PEREIRA G.; CARLIER J.; CABRITA L.; LEITÃO J.; GENCHEV D. Molecular characterization of *Phaseolus vulgaris* L. genotypes included in Bulgarian collection by ISSR and AFLPTM analyses. **Scientia Horticulturae**, v.109, p.198–206, 2006.

- YONG-CUI, H.; ZE-HONG, Y.; YU-MING, W.; YOU-LIANG, Z. Genetic diversity in barley from west China based on RAPD and ISSR analysis. **Barley Genetics Newsletter**, China, v. 35, p. 9-22. 2005.

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