

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE VARIEDADES TRADICIONAIS DE FEIJÃO-COMUM COLETADAS NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO

Amanda Fagundes Zambom, Sara de Oliveira Olímpio, João Pedro Moraes Almeida Campos, Daniella Pimentel Junger, Thiarly de Abreu Carvalho, José Dias de Souza Neto, Monique Moureira Moulin.

Instituto Federal do Espírito Santo – Campus Alegre, Distrito de Rive – 29395 - 000 - Alegre, Brasil, amandafbio20@gmail.com, saraolimpio72@gmail.com, joãopedro.moraesas@gmail.com, jungerdaniella@gmail.com, thiarlyabreu3@gmail.com, jdiasneto@gmail.com, moniquemoulin@gmail.com.

Resumo

O Brasil é um importante centro de diversidade secundária do feijão-comum, apresentando grande variabilidade de germoplasma. No Espírito Santo, onde a agricultura familiar é predominante, o feijão-comum é uma importante fonte de renda e subsistência. Apesar de sua relevância, a diversidade genética dessa leguminosa é subestimada, sendo crucial a coleta e caracterização do germoplasma devido a desafios como a perda de genótipos por influências ambientais. Este estudo visou estimar a variabilidade genética de feijão-comum no Espírito Santo usando 67 acessos do Banco Ativo de Germoplasma e 23 marcadores ISSR. A análise revelou alta variabilidade genética e distinção clara entre os pools gênicos Andino e Mesoamericano, confirmando a importância dos agricultores na conservação desse patrimônio genético.

Palavras-chave: Molecular. Variabilidade. ISSR. Germoplasma. *Phaseolus vulgaris* L.

Área do Conhecimento: Genética.

Introdução

O Brasil é um importante centro secundário de diversidade de feijão, abrigando uma enorme variabilidade de germoplasma, com diferentes formas, cores e tamanhos (Gepts, 1998). O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) possui grande importância econômica, nutricional e cultural em todo o Brasil. Esta dentre as leguminosas mais consumidas no mundo e representa uma importante fonte de proteína e micronutrientes, especialmente para as populações de baixa renda (Broughton *et al.*, 2003), pelas quais é cultivado predominantemente por agricultores familiares, com baixo nível tecnológico, voltado, sobretudo, para a subsistência das famílias (Elias *et al.*, 2021).

Muitos produtores têm deixado de plantar feijão por diversas razões. Alguns exemplos são a escassez de chuva, escassez de mão-de-obra, baixo preço do feijão, falta de área para o cultivo, ocorrência de doenças, entre outras (Bellon; Van Etten, 2014), o que faz com que haja risco da perda de genótipos, seja pela ocorrência de pragas e doenças, por mal armazenamento e tantos outros fatores. Esse processo é chamado de erosão genética, no qual a perda de genótipo, entre outras causas, gera prejuízos das cultivares tradicionais, redução da diversidade e vulnerabilidade na segurança alimentar. Desta forma, há a iminente necessidade de se coletar, conservar e caracterizar os materiais de feijão-comum (Fowler e Mooney, 1990; Souza, 2016).

O processo de erosão genética no gênero *Phaseolus* tem sido bastante acentuado em toda a região Sudeste (Cavalcanti *et al.*, 2021). No estado do Espírito Santo, a área plantada vem sofrendo um decréscimo ano após ano (PROATER, 2020). A safra de 1984/1985 chegou a 111 mil ha com um declínio progressivo nos anos seguintes, chegando a 14,4 mil ha na safra de 2019/2020 e uma estimativa de 9,3 mil ha para a safra de 2023/2024 o que representa uma redução elevada de área plantada em 39 anos (CONAB, 2024). Nesse sentido, estabelecer coleções de germoplasma e estudar a variabilidade genética existente é a estratégia mais viável do ponto de vista econômico, buscando mitigar os efeitos da erosão genética de espécies de importância econômica como o *P. vulgaris*.

A variabilidade genética pode ser acessada por diferentes tipos de caracterizações, como por exemplo, a morfológica, agrônômica, bromatológica, molecular, dentre outras. A caracterização molecular é considerada uma boa opção, devido aos marcadores de DNA não sofrerem influência ambiental, além de proporcionarem estimar a variabilidade genética com acurácia (Nick *et al.*, 2010).

Os marcadores de DNA são capazes de prever, mapear e caracterizar um fenótipo molecular (Silva, 2014). Dentre os diversos tipos de marcadores, destaca-se o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), sendo muito utilizados para estudos de variabilidade genética, pois não exigem um conhecimento prévio do genoma (González; Coulson; Brettell, 2002). Além disso, é um marcador de baixo custo, muito polimórfico e de simples utilização.

Neste sentido, a caracterização molecular do germoplasma de feijão-comum coletado no estado do Espírito Santo é de grande relevância, sendo possível dessa forma, retratar a variabilidade genética mantida pelos produtores rurais do estado. Logo, o objetivo deste trabalho é estimar a variabilidade genética do germoplasma de feijão-comum coletado no estado do Espírito Santo por intermédio da caracterização molecular via marcadores do tipo ISSR.

Metodologia

O experimento foi conduzido no Instituto Federal do Espírito Santo, Campus de Alegre, ES (latitude 21°19'23"S e longitude de 41°19'40"W, a 277 m de altitude), em estufa no viveiro do campus. Foram utilizados 67 acessos do Banco Ativo de Germoplasma do Ifes – Campus de Alegre. Os genótipos são oriundos de coletas junto aos produtores rurais e doações do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER). Três acessos comerciais foram utilizados como testemunhas, a saber: Ifes 21 (feijão vermelho), Ifes 77 (feijão preto) e Ifes 78 (feijão carioca). Os feijões são de diversas localidades do estado do Espírito Santo como descritas no Quadro 1 (maiores informações estão disponíveis no Catálogo de Feijões-comuns do Instituto Federal do Espírito Santo – Campus Alegre: <https://repositorio.ifes.edu.br/handle/123456789/2564>).

O experimento foi realizado em um delineamento de blocos completos casualizados (DBC), com três repetições e cinco plantas por parcela. O plantio de três sementes por cova foi estabelecido com espaçamento 0,5 m entre linhas e 0,5 m entre plantas e mantida 1 planta por cova após a germinação, por ocorrência do desbaste. Os tratos culturais, como tutoramento e controle de pragas e doenças, foram realizados segundo as recomendações para a cultura (Carneiro; Júnior; Borém., 2015).

Para a análise da variabilidade entre os indivíduos, foram utilizados marcadores de DNA do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Ifes campus de Alegre.

Para as análises moleculares, foi realizada a extração de DNA das folhas de cada acesso de feijão utilizando o protocolo adaptado de Doyle e Doyle (1990).

Para a análise dos marcadores, foram utilizados 23 marcadores ISSR, previamente selecionados através de artigos sobre feijão - comum, aplicados em 67 acessos de feijão, amplificados através de PCR.

Todas as reações de PCR foram realizadas em termociclador Simpli Amp (*Applied Biosystems*). Os produtos amplificados foram corados com corante tipo T IV, separados em gel de poli-acrilamida 10%, imersos em tampão TAE 0,5% e submetidos à eletroforese horizontal em 200 volts por 2 horas. Posteriormente à eletroforese, os géis foram banhados em brometo de etídeo (0,5 µg µL⁻¹) por 20 minutos e visualizados sob luz ultravioleta, fotografados por câmera.

Para o cálculo da diversidade genética, considerou - se inicialmente a matriz de incidência de para cada banda em cada *primer* (matriz binária). A matriz de similaridade entre os genótipos foi obtida pela distância de *Jaccard*. A partir da matriz de distâncias os acessos foram agrupados pelo método de ligação média entre grupos (UPGMA). As análises foram conduzidas com auxílio do programa R (R Core Team, 2021).

Resultados

Os resultados das análises moleculares revelaram que os marcadores ISSR detectaram polimorfismo genético para os feijões coletados. A partir da amplificação de vinte e três marcadores, foram geradas 158 bandas, produzindo uma média de 6 marcas por iniciador. Deste total de bandas, 146 (92,4%) foram polimórficas conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Descrição do número de bandas e da taxa de polimorfismo para 23 marcadores ISSR aplicados a 67 acessos de feijoeiro.

INICIADOR	Nº BANDAS	BANDAS POLIMÓRFICAS	TAXA DE POLIMORFISMO
A1	9	8	88.8%
A3	6	6	100%
A4	7	6	85.7%
A7	7	7	100%
A11	8	8	100%
A12	12	12	100%
A17	5	5	100%
A18	8	7	87.5%
A21	9	9	100%
A23	7	6	85.7%
A28	12	11	91.7%
P12	6	6	100%
P13	6	5	83.3%
P14	6	6	100%
P15	6	5	83.3%
P16	6	6	100%
P17	6	5	83.3%
P18	4	4	100%
P19	5	3	60%
P20	5	5	100%
P21	4	3	75%
P22	5	4	80%
P23	7	7	100%
Total	158	146	92.4%

As distâncias genéticas entre os acessos foram utilizadas para a construção de um dendrograma, agrupados pelo método UPGMA, representado na Figura 1. O dendrograma permitiu a distinção genética dos indivíduos, resultando na separação em dois grupos principais: o grupo I, constituído por acessos de origem Andina e o grupo II, constituído por acessos de origem Mesoamericana.

adaptação dessas variedades de feijão e a alta capacidade a produtividade, que é significativamente superior em comparação aos genótipos andinos (Tuberosa; Graner; Frison, 2014; Assefa *et al.*, 2019). Isso faz com que o feijão mesoamericano tenha maior abundância no país e conseqüentemente maior consumo.

Khairallah (1992), Franco *et al.* (2001), Carvalho (2008) e Nasar *et al.* (2022) avaliando a diversidade de genótipos de feijoeiro através de marcadores moleculares, também observaram o agrupamento de acordo com os centros de origem.

Singh (1989) fez um estudo com 18.300 acessos de germoplasma de *P. vulgaris* pertencentes ao banco de germoplasma do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) e encontrou evidências semelhantes, no qual os genótipos, em sua grande maioria, foram divididos nestes dois grupos de origem.

Os programas de melhoramento de feijão no Brasil utilizam principalmente o germoplasma mesoamericano, havendo necessidade de ênfase à introgressão de germoplasma andino em bancos de germoplasmas e nos cultivares comerciais desta espécie no país, a exemplo de outros países tropicais (Gepts, 1988). A dissimilaridade observada entre os acessos da coleção de germoplasma e as cultivares comerciais estudadas reforça a necessidade de introgressão desse germoplasma nos programas de melhoramento genético de feijão.

Conclusão

A análise molecular, via marcador ISSR, foi eficiente para acessar a variabilidade genética entre os acessos de feijão-comum do Banco Ativo de Germoplasma do Ifes Campus de Alegre, sendo possível constatar que os agricultores capixabas possuem importante papel na conservação da variabilidade desse patrimônio genético. O agrupamento obtido através do método UPGMA foi satisfatório para caracterização da variabilidade genética entre os acessos, proporcionando a distribuição dos acessos de acordo com suas origens (*pool* gênico Andino e Mesoamericano).

Referências

ASSEFA, T. et al. A review of breeding objectives, genomic resources, and marker-assisted methods in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Mol Breeding**, v. 39, n.20, p. 23, 2019. DOI: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11032-018-0920-0>.

BELLON, M.R.; VAN ETEN, J. Climate change and on-farm conservation of crop landraces in centres of diversity. **Plant genetic resources and climate change**, p. 137-150, 2014. DOI:10.1079/9781780641973.0137.

CARNEIRO, J.E., JÚNIOR, T.J.P., BORÉM, A. **Feijão: do plantio à colheita**. UFV, Viçosa, p 384, 2015.

CARVALHO, M.F. et al. Caracterização da diversidade genética entre acessos crioulos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) coletados em Santa Catarina por marcadores RAPD. **Ciência Rural**, v.38, n.6, p.1522-1528, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000600005>.

CAVALCANTI, T.F.N. et al. Custodians of common bean diversity in Rio de Janeiro state, Brazil: revealing their socioeconomic and environmental profile, **Agroecology and Sustainable Food Systems**, 45:8, 1165-1188, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/21683565.2021.1888186>.

CONAB. 2024. **Série Histórica das Safras**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/infoagro/safras/serie-historica-das-safras?start=20>. Acesso em 27 de março de 2024.

DAGNEW, K., HAILESELISSIE, T.; FEYISSA, T. Genetic diversity study of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm from Ethiopia using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **African Journal of Biotechnology**, 13(36). 2014. DOI: 10.5897/AJB2013.13396.

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

ELIAS, J. C. F. et al. Genome-Environment Association Analysis for Bio-Climatic Variables in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Brazil. **Plants** 2021, 10, 1572. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10081572>.

FOWLER, C.; MOONEY, P. **Shattering: food, politics, and the loss of genetic diversity**. University of Arizona Press, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1525/cuag.1992.12.43.18>.

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, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2001000200023>.

GEPTS, P. Origin and evolution of common beans: past events and recent trends. **HortScience: a publication of the American Society for Horticultural Science**, 1998. DOI: <http://dx.doi.org/10.21273/HORTSCI.33.7.1124>.

GONZÁLEZ, A.; COULSON, M.; BRETTELL, R. **Development of DNA markers (ISSRs) in mango**. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 575, p. 139-143, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.575.13>

HAMOUDA, M., HAIDER, A. S., ELBEHAIRY, E.; ELSHANSHORY, A. R. **Genetic variation among common beans cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) as revealed by morphological, protein and molecular markers**. Egypt. J. Exp. Biol, 16, 129-139. 2020. DOI: 10.5455/egyjebb.20200721080720

KHAIRALLAH, M. M.; SEARS, B. B.; ADAMS, M. W. Mitochondrial restriction fragment length polymorphisms in wild *Phaseolus vulgaris* L.: insights on the domestication of the common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 84, p. 915-922, 1992.

NASAR, S., OSTEVIK, K., MURTAZA, G., RAUSHER, M. D. Morphological and molecular characterization of variation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm from Azad Jammu and Kashmir, Pakistan. **Plos one**, 17(4), e0265817. 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0265817

PROATER - **Programa de Assistência Técnica e Extensão Rural**, Planejamento 2020-2023, ELDR - Incaper, Alegre/ES, 48p., 2020.

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2021. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

SAKRAVI, A., DEHDARI, M.; FAHLIANI, R. A. Genetic relationships among common bean (*Phaseolus vulgaris* L) genotypes using ISSR markers. **Gene Reports**, 32, 101797. 2023. DOI: 10.1016/j.genrep.2023.101797.

SILVA, D. D. Seleção de marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) para o estudo da diversidade genética em *Euphorbia heterophylla* L.2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá, 2014b. Disponível em: <http://repositorio.uem.br:8080/jspui/bitstream/1/1412/1/000223360.pdf> Acesso: 20 de abril de 2024.

SINGH, S.P. Patterns of variation in cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, New York, v.43, p.39-57, 1989.

TUBEROSA, R.; GRANER, A.; FRISON, E. ; **Genomics of plant genetic resources**. In: Genomics of Plant Genetic Resources: Volume 1. Managing, Sequencing and Mining Genetic Resources. [s.l: s.n.]. p. 484–502. 2014.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo e ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico pela disponibilização da bola e ao Instituto Federal do Espírito Santo -Campus Alegre pelo apoio com a estrutura e materiais.