



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS COM CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS AO ESCURECIMENTO DE GRÃOS, TOLERÂNCIA A SECA E RESISTÊNCIA À MANCHA ANGULAR EM FEIJOEIRO USANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES

Marina Dorigatti **Borges**¹, Daiane Mariele **de Laat**², Brenda Gabriela Díaz **Hernández**³, Carlos Augusto **Colombo**⁴

Nº 14132

RESUMO – *O feijão é essencial na refeição dos brasileiros, fornecendo diversos nutrientes necessários à saúde. É geralmente cultivado nos países em desenvolvimento em pequena escala, o que o torna mais suscetível a pragas e mudanças climáticas e do ambiente. O melhoramento genético visa à identificação de cultivares mais resistentes a essas mudanças e ao ataque de insetos. Os principais problemas que afetam a cultura são a falta de água (por ser uma planta com baixa resistência ao estresse hídrico), o escurecimento do grão (que dificulta a venda para o consumidor) e a mancha angular (doença causada por fungo). Este projeto teve como objetivo a identificação de genótipos com características genéticas de resistência ao estresse hídrico, à mancha angular e com pouco escurecimento do grão. Foram testados cinco marcadores microssatélites para estresse hídrico, dois para escurecimento de grãos e três para mancha angular. Através dos fragmentos amplificados por PCR e visualizados por Gel de agarose e Gel de poliacrilamida, verificou-se que apenas os primers SSR-IAC167 e PVM123, de características de estresse hídrico, apresentaram diferenças mais evidentes entre os genótipos e, assim, podem ser usados para trabalhos futuros.*

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris; Mancha Angular; Escurecimento de grãos; Estresse Hídrico, Microssatélite.*

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, PUC, Campinas-SP; ma.borges@yahoo.com.br

2 Colaboradora: Pesquisadora Pós-doc, Centro de Grãos e Fibras, Instituto Agrônomo – IAC, São Paulo – SP. Bolsista PNPd Capes; daianelaat@gmail.com

3 Colaboradora: Mestranda, Centro de Recursos Genéticos, Instituto Agrônomo – IAC, São Paulo – SP.

4 Orientador: Pesquisador, Centro de Recursos Genéticos, Instituto Agrônomo – IAC, São Paulo – SP; iac.colombo@gmail.com



ABSTRACT – *Common beans are essential in Brazilian meal, providing many nutrients necessary to health. It is usually grown in developing countries on a small scale, which makes it more susceptible to pests, climate and environment changes. The breeding aims to identify cultivars resistant to these changes and to attack by insects. The main problem that affect the crop are the lack of water (being a plant with low resistance to water stress), the darkening of the grain (which makes it difficult to sell to the consumer) and angular leaf spot disease (caused by fungus). This project aimed to identify genotypes with genetic characteristics of water stress resistance, angular leaf spot and darkening of the grain. Five microsatellite markers were tested for water stress, two for browning grains and three for angular leaf spot. By PCR with the aid of agarose gel and polyacrylamide gel, it was found that only the primers SSR-IAC167 and PVM123 of water stress characteristics, showed most obvious differences between genotypes and thus can be used to work future.*

Key-words: *Phaseolus vulgaris; seed darkening; angular leaf spot; drought resistance; microsatellite.*

1. INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris*) é uma das principais fontes de elementos essenciais para a saúde e o combate de doenças na alimentação dos brasileiros (COUTO *et al*, 2010). A maior parte da produção deste grão é feita em pequena escala em países em desenvolvimento, sendo mais suscetíveis a fatores abióticos e bióticos. O desenvolvimento de cultivares resistentes a estes fatores é o objetivo principal dos programas de melhoramento genético, visando a diminuição da perda econômica (MIKLAS *et al*, 2006).

O feijoeiro é uma planta com baixa resistência ao estresse hídrico, em razão do sistema radicular pouco desenvolvido e da baixa capacidade de recuperação após períodos de seca (PERSEGUINI, 2013). A gravidade dos danos provocados pela alteração da quantidade de água disponível depende da duração e intensidade, assim como de fatores genéticos (OLIVEIRA, 2005). Não se sabe muito sobre a genética da resistência a fatores abióticos, já que a resistência a um fator pode estar relacionada ao comportamento da planta na presença ou ausência de outro fator, ou seja, é condicionada por múltiplos mecanismos interagindo ao mesmo tempo (MIKLAS *et al*, 2006). Por ser uma característica difícil de ser trabalhada por métodos de melhoramento genético comuns, poucos projetos são criados para a seleção de genótipos mais tolerantes (CASAGRANDE, 2001).

A mancha angular é causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* e é uma das doenças que mais afeta a produção do feijão. Ela consiste em lesões na planta e faz com que as folhas



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

caiam prematuramente (MONDA *et al*, 2001). Ela é observada com mais frequência tardiamente no ciclo da planta, na época de aparecimento das flores. Além disso, a abundância de água na fase adulta da planta favorece o desenvolvimento do fungo (ALLORENT, 2005).

O escurecimento do grão prejudica os produtores devido à associação que os consumidores fazem entre a cor escura e o maior tempo de cozimento. Este escurecimento está ligado a características do genótipo e a condições ambientais do armazenamento, como a temperatura, alta umidade e tempo de estoque. O melhoramento genético dos cultivares visa cores mais claras possíveis para os grãos e a manutenção deste tom por um período extenso (COUTO *et al*, 2010).

A diversidade genética contribui para a identificação de genótipos resistentes a doenças e a abundância ou ausência de fatores abióticos e bióticos. Assim, o conhecimento desta diversidade é essencial para o melhoramento da produção (VIERA *et al*, 2009). O polimorfismo genético pode surgir através da inclusão ou deleção de nucleotídeos e através do número variável de sequências repetidas ao longo do DNA (LIMA *et al*, 2003). Muitos genes ligados à resistência das espécies se localizam perto destas repetições, facilitando a sua localização. Além disso, os marcadores microssatélite são estáveis e respondem bem a PCR, podendo ser facilmente utilizados também para a construção de mapas genéticos (CARDOSO *et al*, 2008).

No feijoeiro o número de microssatélites disponível é muito pequeno, limitando assim uma pesquisa mais aprofundada sobre seu genoma e sua diversidade (CARDOSO *et al*, 2008). Este projeto teve como objetivo selecionar genótipos, através dos marcadores moleculares microssatélites, com tolerância ao estresse hídrico, resistência à mancha angular e ao escurecimento de grãos em feijoeiro e, com isso, contribuir para o melhoramento da cultura.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Centro Experimental Central do Instituto Agrônomo (IAC), na Fazenda Santa Elisa em Campinas, no Laboratório de Diversidade Genética Vegetal. Foram utilizados para a pesquisa 32 genótipos de feijão provenientes do Banco de Germoplasma do IAC (Tabela 1).

Tabela 1. Genótipos de feijão provenientes do Banco de Germoplasma do IAC usados no experimento.

Genótipos							
Lec 01-11	P10-1-9/38	CNFC-10762	TB 03-13	87/7 3-5-3/1	PR10 4-4/24	IAC Uma	PR 10-4-4/23
LP 09-40	FAP-F3-2	C10-2-16/8	C10-2-4/41	49/61-1/2	LP 09-181	TB 02-23	CNFP 10 794
45/57-7-3-1/2	CHC 9842	45/57-7-3-1/4	FT 08-75	41/35-3-2/2	PR10-4-2/10	14/20-5-3-2/1	CHP 01-238
45/57-4-2-1/4	FAP-F3RC2	IAC-milênio	FT 08-47	IAC diplomata	Lep 02-11	LP 02-02 Tangará	IAC milênio C4-7-7-2-2



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

A extração do material genético a partir das folhas foi realizada usando o protocolo de extração simples (CTAB 10% modificado). Os pellets finais foram diluídos em 100 uL de água autoclavada. Para verificar a concentração (ng/mol) e a absorvância (razão 260/280) das amostras extraídas utilizou-se o Nanodrop, e para a conservação foram armazenadas no refrigerador (4°C). As amostras dos genótipos 45/57-7-3-1/2, FAP-F-3-2 e C10-2-4/41 foram diluídas (1:1) em água autoclavada, por apresentarem inicialmente concentração maior que 1000 ng/mol.

Com base no artigo de Couto *et al* (2010) os primers PV176 e PVESTBR-98 foram escolhidos para identificar marcas de escurecimento do grão. Os demais primers foram selecionados do trabalho de Persequini (2013), sendo que o BMc 215, SSR-IAC 127 e o SSR-IAC 52 são para mancha angular e os demais são para características de estresse hídrico. A sequência de cada primer, assim como o tamanho esperados das bandas e a temperatura de anelamento ideal para cada um foram tabulados e analisados (Tabela 2).

Tabela 2. Sequência de primers para resistência a mancha angular, escurecimento do grão e estresse hídrico.

	Primer F	Primer R	Ta (°C)	Tamanho das Bandas	Autor
PvM120	CCCCATCCTCACTCACAAC	TCATTCTTCTGGTGCTGCTTT	60	200-211	Persequini, 2013
BMc236	CTTCGGGTCCTGGTTGTTA	CAATTTGTGCAACCCAAGGT	57	98	Persequini, 2013
PvM123	CCCACTACCACTCCTTTG	AGCGTCTGAACCCATTG	60	194-220	Persequini, 2013
SSR-IAC167	AGACCAAGAAACAATGAGAAT	AAGTTTCGTTAGTCTGTGATTT	59	150-180	Persequini, 2013
BMc265	CACAGCTTACAACCTTACACACTCC	ATTTGGCCGATAACATCTGA	60	109	Persequini, 2013
BMc215	TAAGACGTGAAGGACGAAGC	GAACCCTCAGCACCACTT	-	98	Persequini, 2013
SSR-IAC127	GAGGCTAGCCCAACTTA	AGCGCAAGACTTTACTACTC	59	198-200	Persequini, 2013
SSR-IAC52	TGC TGTATGTAGGCGGTTTA	GTGGCTTTTGCTTTTGTAGTCA	55	200-216	Persequini, 2013
PV176	GAGGAAAGAGAAAGCAACAGAGA	AGTTTGAGGAGCAGGAGCAG	60	-	Couto <i>et al</i> , 2010
PVESTBR-98	TCTTTAACAGCGCACACACTTT	GTTGAAAACGACAGTAGGAACC	60	-	Couto <i>et al</i> , 2010

As reações de PCR foram feitas usando 2 a 3 ul de DNA, 1,5 ul de cada primer (Forward e Reverse) em uma concentração de 2 uM, 0,3 ul de dNTP (4,5 mM), 0,2 ul de Taq polimerase, 1,5 ul de Tampão da enzima, 1,2 ul de MgCl²⁺ (25 mM) e a quantidade suficiente de água miliQ para completar 15 ul (5,8 uL). O seguinte ciclo foi usado: 5 minutos a 95 °C, com 34 repetições de 30 segundos a 95°C, 30 segundos na temperatura ideal de cada primer e 1 minuto a 72 °C, e 6 minutos a 72 °C. Para os primers PvM120, BMc236 e SSR-IAC127 usou-se 3 ul de DNA de cada genótipo. Para os demais foram usados 2 ul, já que nos primeiros houve um excesso de DNA no gel.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

As reações foram analisadas através do Gel de agarose 1%, utilizando o corante Azul de bromofenol e xileno cianol e Gel red. Todos os Géis de agarose foram submetidos à uma voltagem inicial de 65 volts por 10 minutos, com o objetivo de que a amostra adentrasse no gel e depois, à 95 volts para o resto da corrida. Usou-se um marcador molecular de 50 pb. Feita a verificação de que as amostras foram amplificadas, elas foram aplicadas no Gel de poliacrilamida 6%, para melhor separação dos fragmentos. Foram utilizados o corante Azul de formamida e um marcador molecular de 100pb. Os géis foram analisados de acordo com o tamanho e nitidez das bandas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração do material genético dos indivíduos gerou resultados esperados. As concentrações foram todas acima de 200 ng/mol, com exceção do genótipo CNFP 10 794, que teve resultado de 185,5 ng/mol. As amostras dos genótipos 45/57-7-3-1/2, FAP-F-3-2 e C10-2-4/41, que foram diluídas posteriormente a extração, resultaram em concentração acima de 300 ng/mol. Todas as amostras apresentaram razão 260/280 entre 1,9 e 2,2, indicando um DNA de alta qualidade, livre de contaminação por proteínas.

Para os primers PV176 e PVESTBR- 98 não foram encontrados os tamanhos esperados das bandas. Os primers BMc215 e PV176 não foram amplificados pela PCR. Uma justificativa para isso pode ser que as condições de PCR não eram adequadas de forma a garantir o sucesso da amplificação. Todos os demais primers foram visualizados em Gel de agarose, ou seja, foram amplificados. Os primers BMc236, BMC265 e PVESTBR-98 não apresentaram bandas nítidas no Gel de acrilamida, mesmo sendo visualizados em Gel de agarose. Apenas quatro primers foram visualizados em Gel de acrilamida. O PvM120, SSR-IAC127 e o SSR-IAC52 resultaram em banda, mas não foi possível a diferenciação entre os indivíduos, pois todos os indivíduos possuíam as mesmas bandas. No primeiro, o tamanho das bandas encontradas estava próximo do esperado, entre 200 e 300 pb. No segundo, o tamanho encontrado foi bem maior que o esperado, entre 500 e 600 pb. Isso ocorreu também no último, no qual se encontrou bandas entre 700 e 900 pb. Assim, estes primers não se mostraram eficientes para identificar as características desejadas.

Já o primer SSR-IAC167 tem potencial de ser diferenciador de plantas suscetíveis e tolerantes ao estresse hídrico, por ter evidenciado diferença no tamanho das bandas tanto no Gel de agarose quanto no de poliacrilamida (Figura 1). Os tamanhos apresentados pelos homozigotos foram próximo de 700 pb e de 600 pb (Tabela 3). Entretanto, os genótipos CHC 9842 e IAC Una apresentaram uma banda de cada tamanho, sendo heterozigotos. Em ambos os casos, as bandas encontradas foram maiores do que as esperadas. Porém, o primer pode ser eficiente na



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

diferenciação entre genótipos. Comparando os resultados encontrados com as características fenotípicas dos genótipos já preestabelecidas por outro estudo realizado pelo grupo do feijão IAC, visando a produtividade de grãos em condições de déficit hídrico aplicado na pré-floração, pode-se perceber que os quatro genótipos utilizados nos dois projetos (LP 09-40, IAC-Milênio, IAC diplomata e IAC Una) apresentaram bandas de 600 pb e eles foram classificados como promissores para tolerância à seca. Ou seja, é possível que aqueles com este tamanho de banda sejam mais resistentes do que aqueles com banda de 700 pb.

Tabela 3. Tamanho das bandas amplificadas pelo primer SSR-IAC167 nos genótipos de feijoeiro.

Nº	Genótipo	Tamanho da Banda	Nº	Genótipo	Tamanho da Banda
1	Lec 01-11	700	17	87/7 3-5-3/1	600
2	LP 09-40	600	18	49/61-1/2	600
3	45/57-7-3-1/2	600	19	41/35-3-2/2	600
4	45/57-4-2-1/4	700	20	IAC diplomata	600
5	P10-1-9/38	600	21	PR10 4-4/24	700
6	FAP-F3-2	700	22	LP 09-181	700
7	CHC 9842	600/700	23	PR10-4-2/10	600
8	FAP-F3RC2	600	24	Lep 02-11	600
9	CNFC-10762	600	25	IAC Una	600/700
10	C10-2-16/8	600	26	TB 02-23	700
11	45/57-7-3-1/4	600	27	14/20-5-3-2/1	700
12	IAC-Milênio	600	28	LP 02-02 Tangará	600
13	TB 03-13	700	29	PR 10-4-4/23	700
14	C10-2-4/41	600	30	CNFP 10 794	700
15	FT 08-75	700	31	CHP 01-238	600
16	FT 08-47	600	32	IAC milênio C4-7-7-2-2	600



Figura 1. Resultado da reação nos 32 genótipos utilizando o primer SSR-IAC167. A) Gel de agarose; B) Gel de poliacrilamida.

Assim como o SSR-IAC 167, o PVM123 também pode ser utilizado para diferenciar plantas que reagem de formas diferentes quando submetidas ao estresse hídrico. As bandas amplificadas foram vistas no Gel de agarose, porém no Gel de poliacrilamida houve a melhor separação das bandas, evidenciando ainda mais a diferença de tamanho entre elas (Figura 2). As bandas apresentadas neste, foram de aproximadamente 240 e 260 pb (Tabela 3). Ao contrário do que visto com o primer anterior, esses dados não podem ser reforçados através do projeto realizado pelo grupo do feijão, já que dois dos genótipos utilizados em ambos os trabalhos apresentaram banda



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

de 240 pb (LP 09-40 e IAC Una) e dois banda de 260 pb (IAC-Milênio e IAC diplomata). Outros estudos de campo devem ser feitos para corroborarem com estes resultados.

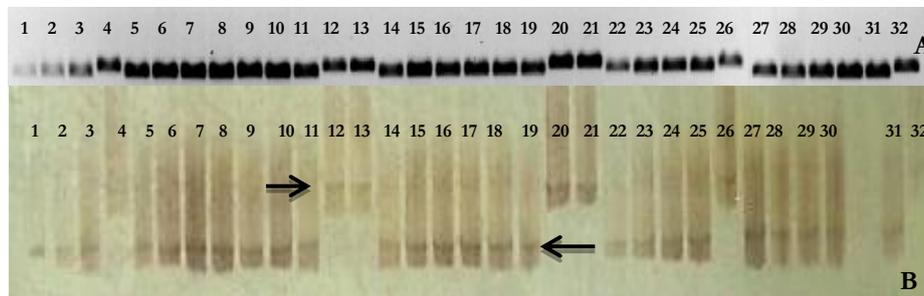


Figura 2. Resultado da reação nos 32 genótipos utilizando o primer PVM123. A) Gel de agarose; B) Gel de poliacrilamida.

Tabela 4. Tamanho das bandas amplificadas pelo primer PVM123 nos genótipos de feijoeiro.

Nº	Genótipo	Tamanho da Banda	Nº	Genótipo	Tamanho da Banda
1	Lec 01-11	240	17	87/7 3-5-3/1	240
2	LP 09-40	240	18	49/61-1/2	240
3	45/57-7-3-1/2	240	19	41/35-3-2/2	240
4	45/57-4-2-1/4	260	20	IAC diplomata	260
5	P10-1-9/38	240	21	PR10 4-4/24	260
6	FAP-F3-2	240	22	LP 09-181	240
7	CHC 9842	240	23	PR10-4-2/10	240
8	FAP-F3RC2	240	24	Lep 02-11	240
9	CNFC-10762	240	25	IAC Una	240
10	C10-2-16/8	240	26	TB 02-23	260
11	45/57-7-3-1/4	240	27	14/20-5-3-2/1	240
12	IAC-Milênio	260	28	LP 02-02 Tangará	240
13	TB 03-13	260	29	PR 10-4-4/23	240
14	C10-2-4/41	240	30	CNFP 10 794	240
15	FT 08-75	240	31	CHP 01-238	240
16	FT 08-47	240	32	IAC milênio C4-7-7-2-2	260

Os primers selecionados no trabalho de Persegui (2013) mostraram o polimorfismo em todos os acessos nele usados. Porém, nos genótipos utilizados neste projeto, apenas o SSR-IAC167 e o PVM123 evidenciaram esta característica. O mesmo aconteceu nos primers selecionados através do trabalho de Couto (2010). Isto pode ter acontecido pela diferença entre os genótipos analisados.

4. CONCLUSÃO

Dos primers escolhidos, apenas o SSR-IAC167 e o PVM123 foram selecionados como candidatos a diferenciador entre genótipos tolerantes e resistentes ao estresse hídrico por apresentarem polimorfismo entre as bandas amplificadas. O Gel de agarose se mostrou eficiente



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

na distinção das bandas, e se for adotada para este fim, pode tornar a técnica menos trabalhosa e mais barata.

5. AGRADECIMENTO

Agradecemos ao CNPq pela bolsa concedida.

6. REFERÊNCIAS

ALLORENT, D.; SAVARY, S. **Epidemiological characteristics of angular leaf spot of bean: a systems analysis.** *European Journal of Plant Pathology*, 113(4):329-341, 2005.

CARDOSO, J. M. K.; OBLESSUC, P. R.; CAMPOS, T.; SFORÇA, D. A.; CARBONELL, S. A.; CHIORATTO, A. F.; FORMIGHIERI, E. F.; SOUZA, A. P.; BENCHIMOL, L. L. **New microsatellite markers developed from an enriched microsatellite common bean library.** *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 43, n. 7, July 2008.

CASAGRANDE, E. C.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; PEDROSO, J.; MARTINS, P. K.; BRETON, M. C.; NEPOMUCENO, A. L. **Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em soja.** *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, Lavras, v. 13, n. 2, 2001.

COUTO, C. R.; SANTOS, J.B.; RAMALHO, M.A.P.; SILVA, G.S. **Identificação de marcadores microssatélites relacionados ao escurecimento de grãos em feijão.** *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.45, n.11, p.1268-1274, nov. 2010.

LIMA, V. L. A.; SEKI, H. A.; RUMJANEK, F. D. **Microsatellite polymorphism in wheat from Brazilian cultivars; inter- and intra-varietal studies.** *Genet. Mol. Biol.*, São Paulo, v. 26, n. 3, 2003.

MIKLAS, P.N.; KELLY, J.D.; BEEBE, S.E.; BLAIR, M.W. **Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical to MAS breeding.** *Euphytica*, 147(2):105-131, 2006.

MONDA, E.O.; SANDERS, F.E.; HICK, A. **Infection and colonization of bean leaf by *Phaeoisariopsis griseola*.** *Plant Pathology*, 50:103-110, 2001.

OLIVEIRA, A. D.; FERNANDES, E. J.; RODRIGUES, T. J. D. **Condutância estomática como indicador de estresse hídrico em feijão.** *Eng. Agríc.*, Jaboticabal, v. 25, n. 1, Apr. 2005.

PERSEGUINI, J. M. K.C.; **Estudo do desequilíbrio de ligação em *Phaseolus vulgaris* L. visando o mapeamento associativo de fatores bióticos e abióticos.** 2013. 147. Tese de Doutorado da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

VIEIRA, E. S. N.; SCHUSTER, I.; SILVA, R. B.; OLIVEIRA, M. A. R. **Variabilidade genética em cultivares de soja determinada com marcadores microssatélites em gel de agarose.** *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 44, n. 11, nov. 2009.