

FRANCIELE BARROS DE SOUZA

**DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE GENÓTIPOS DE FEIJOEIRO  
(*Phaseolus vulgaris* L.) DA COMUNIDADE FORTALEZA NO  
MUNICÍPIO DE MUQUI ESPÍRITO SANTO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Medicina Veterinária do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas e avaliação obrigatória da disciplina Seminários de Graduação em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Taís Cristina Bastos Soares.

ALEGRE - ES

2010

## RESUMO

A história de domesticação do feijoeiro é explicada por diversas hipóteses e origens, atualmente a mais aceita é que possuem três centros primários de diversidade genética, o Mesoamericano, sul e norte dos Andes, como também vários outros centros secundários. O feijão pertence a classe Dicotyledoneae e está incluso dentro da família *Leguminosae* que possui mais de 600 gêneros e que reúne mais de 13000 espécies. O gênero *Phaseolus* possui cerca de 55 espécies, das quais cinco são cultivadas: *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray var. *latifolius* Freeman e *P. polyanthus* Greenman. 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. Objetivou-se neste trabalho, analisar a diversidade genética do Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) do sul do Espírito Santo da comunidade Fortaleza localizada no município de Muqui, comparando genótipos locais, genótipos da EMBRAPA-TRIGO (sul do Brasil) e genótipos comerciais, utilizando marcadores moleculares ISSR. Os marcadores moleculares ISSR foram eficientes na avaliação da diversidade genética em *P. vulgaris*, gerando polimorfismos suficientes para separação dos genótipos de acordo com sua origem (mesoamericana e andina) e região (Fortaleza-Sudeste e EMBRAPA-TRIGO). Foi encontrada uma dissimilaridade média correspondente a 0,44, indicando a existência de uma ampla variabilidade genética entre alguns genótipos estudados, destacando-se o F16, que possuiu a maior distância genética (1,0) na comparação entre o Pérola, F08 e F13. 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, observou-se alta similaridade entre alguns genótipos, principalmente entre os que são da mesma região e entre os comerciais. Também foi possível indicar um genótipo promissor para estudos de características morfoagronômicas, como o Fortaleza 26, uma vez que tiveram distância genética igual a 0,00 em comparação com o cultivar comercial IAPAR 81.

*Palavras chave: dissimilaridade, genótipo, marcador ISSR, variabilidade.*

## 1. JUSTIFICATIVA

A caracterização molecular é muito importante para avaliar as características genéticas existentes entre genótipos para qualquer espécie. É uma ferramenta que permite analisar a relação de distâncias genéticas entre os acessos e com isso identificar a variabilidade genética e o nível de similaridade existente entre eles. A comunidade Fortaleza localizada no município de Muqui-ES, possui um grande número de genótipos de feijoeiro que tem sido utilizados para plantio na região sul do Espírito Santo. Poucas são as informações a respeito da caracterização destes genótipos. O uso dos marcadores moleculares ISSR aliado com análises multivariadas tem sido muito empregados na caracterização genotípica de muitas espécies e alcançando elevado sucesso na análise de diversidade genética. Dessa forma, o presente trabalho propôs a caracterização molecular dos genótipos acima mencionados, bem como dos seguintes materiais genéticos: genótipos de feijoeiro cultivados na região sul do Brasil, fornecidos pela EMBRAPA-TRIGO e variedades comerciais cultivadas em quase todo o território brasileiro. Estas análises possibilitaram comparar e selecionar genótipos de feijoeiro que possuam maior similaridade genética com os cultivares comerciais.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Histórico e Classificação Taxonômica do Feijão

A história de domesticação do feijoeiro é explicada por diversas hipóteses e origens. Tipos selvagens e domesticados encontrados no México datados de cerca de 7.000 a.C., suportam a hipótese de que o feijoeiro teria sido domesticado na Mesoamérica e disseminado, posteriormente, na América do Sul. Por outro lado, achados arqueológicos mais antigos, cerca de 10.000 a.C., de feijões domesticados na América do Sul (sítio de Guitarrero, no Peru) são indícios de que o feijoeiro teria sido domesticado na América do Sul e transportado para a América do Norte (EMBRAPA, 2010). Dados mais recentes, com base em padrões eletroforéticos de faseolina, demonstram que os feijões de origem mesoamericana possuem proteína faseolina do tipo S, os Andinos selvagens do tipo T e os de origem colombiana possuem além da S e T, os tipos B, C e H. Esta constatação foi importante para uma melhor classificação do feijoeiro, sugerindo a existência de três centros primários de diversidade genética, tanto para espécies silvestres como cultivadas: o mesoamericano, que se estende desde o sudeste dos Estados Unidos até o Panamá, tendo como zonas principais o México e a Guatemala; o sul dos Andes, que abrange desde o norte do Peru até as províncias do noroeste da Argentina e o norte dos Andes, que abrange desde a Colômbia e Venezuela até o norte do Peru (BORÉM et al., 2006). Além destes três centros americanos primários, podem ser identificados vários outros centros secundários em algumas regiões da Europa, Ásia e África, onde foram introduzidos genótipos americanos. Como pode ser observado, os feijões estão entre os alimentos mais antigos, remetendo aos primeiros registros da história da humanidade. Eles eram cultivados no antigo Egito e na Grécia, sendo, também, cultuados como símbolo da vida (BORÉM et al., 2006; EMBRAPA, 2010).

O feijoeiro é uma planta da classe Dicotyledoneae, família *Leguminosae*, possui mais de 600 gêneros e 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. acutifolius* 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 cultivar mais antiga e também a mais utilizada, respondendo por 85% da produção mundial (BORÉM, et al., 2006).

## 2.2. Importância Alimentar e Econômica

As leguminosas, em geral são uma das mais importantes fontes de abastecimento alimentar do mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, em termos de alimentação energética, bem como nutrientes. O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) representa uma excelente fonte de proteínas, vitaminas e alguns minerais (Ca, Fe, Cu, Zn, P, K, e Mg) bem como de carboidratos e lipídeos. A aceitabilidade do feijão inclui características com ampla variedade de atributos, como o tamanho do grão, forma, cor, estabilidade nas condições de armazenagem, propriedades de cozimento, qualidade do produto obtido e sabor (BORÉM et al., 2006; PAREDES-LÓPEZ; REYES-MORENO 1993).

Além da grande importância do feijão na dieta do brasileiro, ele é um produto agrícola de relevância econômica e social, por ser cultivado tanto por agricultores de subsistência como por produtores que utilizam alta tecnologia em todas as etapas do processo de produção (COSTA, 2005).

Atualmente, existe a tendência de aumento do consumo do feijão, até mesmo em países onde, até então, seu uso ocorria em baixos níveis. O feijão vem ganhando expressão não só como alimento protéico, mas também, em razão dos conhecimentos mais recentes de suas qualidades terapêuticas, dentre as quais citam-se a sua capacidade de diminuir os níveis de colesterol sanguíneo (CHIARADIA, apud COSTA, 2005).

A produção mundial de feijão no ano de 2008 ficou em torno de 20 milhões de toneladas em uma área de aproximadamente 28 milhões de hectares. Segundo dados da Fao (2010), a Índia obteve maior produção de feijão no ano de 2008 seguido pelo Brasil, Myanmar e o México. Cerca de 30% desta produção vem do México, América

Central e América do Sul, e quantidades significativas são cultivadas na Ásia e na África. Isso mostra que o feijão é considerado a segunda leguminosa mais importante para o comércio mundial, estando a soja em primeiro lugar. (ARC CENTRE OF EXCELLENCE FOR INTEGRATIVE LEGUME RESEARCH, 2010).

A produção brasileira de feijão registrada em 2008/2009 foi de 3.490,6 mil toneladas em uma área de 4.147,8 mil hectares, com produtividade de 842 mil kg/ hectare. Para a safra de 2009/2010, existe uma estimativa de produção de 3546,9 mil toneladas em uma área de 4032,5 mil hectares e produtividade de 880 mil kg/ hectare. (CONAB, 2010).

No estado do Espírito Santo o feijão é o terceiro produto agrícola em importância econômica, ocupando uma área de aproximadamente 22,6 mil hectares com a produção de 19,1 mil toneladas, e produtividade de 847 kg/ hectare no ano de 2008/2009. Em 2009/2010 foi estimado uma produção de 18,1 mil toneladas, em uma área de plantio de 22,4 mil hectares e produtividade de 808 kg/hectare (CONAB, 2010).

### 2.3. Marcadores Moleculares

Diferentes marcadores tem sido utilizados por mais de um século, como ferramentas para a compreensão de herança e relações entre indivíduos e populações. O primeiro geneticista foi o lendário cientista do século XIX Gregor Mendel que ao olhar para as características de ervilhas, como a frequência da cor e superfície das sementes apresentou estudos baseados em marcadores morfológicos para analisar os padrões de herança. Durante as últimas três décadas de desenvolvimento nas áreas de bioquímica e biologia molecular, muitos sistemas de manipulação do DNA foram surgindo, contribuindo para um melhor entendimento das relações de diferentes espécies (BENGTSSON, 2009).

Com a descoberta das enzimas de restrição foi possível fragmentar do DNA em algumas regiões, possibilitando a sua hibridização com outras sequências de DNA. A partir de então, ocorreu o desenvolvimento de técnicas que passaram a fornecer um

número ilimitado de marcadores altamente polimórfico para qualquer organismo vivo. Posteriormente com o surgimento da PCR, possibilitou-se a amplificação de fragmentos de DNA *in vitro*, utilizando oligonucleotídeo iniciadores ou *primers* de sequência conhecida e complementar às extremidades do segmento a ser amplificado, direcionando a síntese de DNA alvo em ciclos repetidos (MULLIS et al., 1986).

A possibilidade de gerar grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma via PCR gerou grande impacto, tornando-se possível a detecção de DNA a olho nu, diretamente em gel de eletroforese por meio de corantes específicos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Com o desenvolvimento e aperfeiçoamento da Biologia molecular, diversas técnicas estão hoje disponíveis para a identificação de variabilidade genética (polimorfismos) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). A caracterização de genótipos por meio de marcadores moleculares tem-se tomado cada vez maior e tem auxiliado no mapeamento genético, separação entre espécies de plantas, no estudo da quantidade de variação no germoplasma de plantas e comparações entre diferentes acessos (FORT-LLOYD et al., 1994). O desenvolvimento e aplicação destas tecnologias fornecem ferramentas únicas, podendo ser utilizadas para discriminar a variabilidade genética existente entre indivíduos e dentro de populações (KRESOVICH et al., 1995). Além disso, geram *fingerprinting* (impressão digital) dos cultivares desenvolvidos podendo ser recomendados ao processo de proteção (SAWASATO et al., 2008).

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).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA via PCR. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (BOTSTEIN et al.,

1980) e minissatélites ou locos VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) (JEFFREYS et al., 1985). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (WILLIAMS et al., 1990); SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) (PARAN; MICHELMORE, 1993); Microsatélite (LITT; LUTY, 1989); AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (ZABEAU, 1993) e ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) (ZIETKIEWICZ et al., 1994).

Diversos métodos de análise molecular são empregados em estudos de variabilidade em plantas, no intuito de identificar e determinar relações entre espécies e cultivares. A técnica de ISSR (ZIETKIEWICZ et al., 1994) tem sido amplamente utilizada nesses estudos por ser um procedimento simples, eficiente, possuir alta reprodutibilidade e gerar altos índices de polimorfismo (REDDY et al., 2002).

O ISSR é uma metodologia que permite a amplificação de segmentos de DNA localizados entre duas seqüências microsatélites idênticas orientadas em direções opostas. O seu princípio baseia-se na amplificação de DNA por PCR, usando como oligonucleotídeos iniciadores seqüências de nucleotídeos com cerca de 16 a 25 pb de comprimento, complementares a sítios de microsatélites aleatórios (ZIETKIEWICZ et al., 1994). Estes oligonucleotídeos podem ser não ancorados ou ancorados em uma das extremidades (5' ou 3') por uma pequena seqüência de um a quatro nucleotídeos. A ancoragem serve para fixar o pareamento do oligonucleotídeo em uma única posição no sítio alvo, o que resulta em baixo nível de pareamento inespecífico (ABADIO, 2007).

Além disso, é uma técnica de fácil obtenção de dados e o custo é relativamente reduzido em relação a outras técnicas moleculares. Sua aplicabilidade é imediata a qualquer tipo de organismo, pois não requer informações prévias de seqüências de DNA da espécie-alvo (BORÉM; CAIXETA, 2006). Apresenta a característica de dominância, ou seja, este tipo de marcador não permite distinguir indivíduos homozigotos de heterozigotos e são semi arbitrários, pois os *primers* são construídos a partir de marcadores microsatélites que amplificam seqüências de DNA espécie específica (GUPTA et al., 1994; ZIETKIEWICZ et al., 1994).



Vários estudos tem apresentado alto conteúdo de informação genética revelado por estes marcadores (BOLIBOK; RAKOCZY-TROJANOWSKA, 2004; FERNÁNDEZ et al., 2002; MAROTTI et al., 2007;)

Segundo Almeida et al. (2009) e Hashemi-Petroudi et al. (2010) o alto nível de polimorfismo dos marcadores ISSR facilitam a obtenção de *fingerprinting* de DNA e no acesso à variabilidade genética, potencializando a identificação de marcadores cultivar-específicos e manejo do germoplasma. Diferentes marcadores moleculares são utilizados hoje para análise de *fingerprinting* em germoplasma vegetal, mas as informações sobre sua eficácia em determinadas culturas ainda não são claras (HASHEMI-PETROUDI et al., 2010).

#### 2.4. Diversidade Genética utilizando análises multivariadas

O estudo da diversidade genética é realizado através de técnicas multivariadas, que têm por objetivo avaliar um conjunto de variáveis aleatórias relacionadas entre si, onde cada uma possui o mesmo grau de importância. Fornece coeficientes de distância genética entre os genótipos partindo da hipótese de que quanto maior a distância genética entre dois genótipos, maiores são as chances de combinações mais promissoras. Linhagens que possuem grande número de alelos em comum para um determinado caráter, são designadas como similares (CHIORATO, 2004).

A identificação de grupos de cultivares com maior similaridade visam à formação de multilinhas, e a identificação de genitores adequados à obtenção de híbridos com maior efeito heterótico e que proporcionem maior segregação em recombinações (CRUZ et al., 2004).

As análises multivariadas têm sido avaliadas por meio de técnicas biométricas, baseados em natureza quantitativa, preditiva, por isoenzimas e pelo emprego de marcadores moleculares baseados no DNA. Atualmente existem basicamente duas formas de avaliar a diversidade genética, através de caracteres morfoagronômicos e/ou moleculares. Os morfoagronômicos subdividem em medidas de dissimilaridade obtidas de variáveis quantitativas (mensuradas), e medidas de dissimilaridade obtidas

de variáveis multicatóricas (morfológicas da espécie). Os moleculares baseiam-se em medidas de dissimilaridade obtidas de variáveis binárias (CRUZ et al., 2003).

A análise da similaridade genética por meio de marcadores moleculares dominantes é um método baseado em presença e ausência de bandas (0 e 1) em que é gerado uma matriz a partir de análise do gel de eletroforese. Os coeficientes são formados a partir de valores que quantifica o número de coincidência do tipo 1-1, 1-0, 0-1 e 0-0 entre dois genótipos. Assim, somando-se cada tipo de coincidência descrita acima podem ser obtidas as medidas de similaridade entre os indivíduos. (CRUZ et al., 2003).

Existem vários coeficientes de similaridade e dissimilaridade, porém os mais utilizados são o coeficiente de coincidência simples, o de Jaccard e o de Nei e Li. O coeficiente de coincidência simples tem a vantagem de ser idêntico ao quadrado da distância Euclidiana média que é muito utilizada em se tratando de variáveis quantitativas e apresenta a desvantagem de considerar o número de coincidência tipo "0-0". Já os de Jaccard e de Nei e Li excluem a coincidência do tipo 0-0 (CRUZ et al., 2003).

Para um estudo da diversidade genética é necessário fazer um agrupamento dos dados de similaridade, para que se tenha uma melhor visualização do nível de parentesco entre os indivíduos e um melhor reconhecimento de grupos homogêneos e heterogêneos (CRUZ et al., 2004).

Existe um grande número de métodos de agrupamentos disponíveis, sendo que os mais utilizados são os hierárquicos e os de otimização (CRUZ et al., 2004).

Nos métodos hierárquicos, os genótipos são agrupados por um processo que se repete em vários níveis, até que seja estabelecido o dendrograma, não havendo preocupação com o número ótimo de grupos (CRUZ et al., 2004). Dentre os métodos hierárquicos podemos destacar os do Vizinho Mais Próximo, do Vizinho Mais Distante, Método da Ligação Média não Ponderada (UPGMA) e de Ward (CRUZ et al., 2003).

Nos métodos de otimização a formação dos grupos é feita através de uma partição dos indivíduos em que a média das medidas de dissimilaridades dentro de

cada grupo deve ser menor que as distâncias médias entre quaisquer grupos. Dentre estes métodos, destaca-se o de Tocher, (CRUZ et al., 2004).

### 2.5. Diversidade Genética em *P. vulgaris*

Muitos são os trabalhos que têm desenvolvido estudos de diversidade genética em feijoeiro. Kumar et al., 2008, utilizaram a técnica de marcadores moleculares AFLP para avaliar a diversidade genética entre 44 acessos de feijão comum, incluindo 6 acessos exóticos e 15 de terras indígenas, para verificar a possibilidade de incluir genótipos em programas de melhoramento.

Asfaw et al., 2009 realizaram trabalho com *P. vulgaris* no planalto do Leste Africano, região com importante produção e com alta diversidade parietal, com o objetivo de revelar a diversidade e estrutura populacional de 192 raças, da Etiópia e do Quênia, juntamente com quatro genótipos para controle do *pool* gênico. Utilizaram técnicas morfológicas e marcadores microsatélites.

Chiorato et al., 2007 por meio de dados morfoagronômicos e de marcadores RAPD realizaram estudos de diversidade com *P. vulgaris* em bancos de germoplasma (Instituto Agrônomo, Campinas) utilizando genótipos de variedades melhoradas, crioulas e espécies selvagens. Os autores mostraram a importância da caracterização de bancos de germoplasma para identificação e no conhecimento de características relevantes para o melhoramento genético e para conservação *ex situ* do germoplasma.

Kwak et al., 2009 também realizaram estudos de diversidade genética baseado em bancos genéticos do feijoeiro comum, entretanto estes pesquisadores fizeram comparações entre dois principais bancos e utilizaram marcadores do tipo microsatélite. Dessa forma foi possível revelar como a seleção humana durante o cultivo afeta a composição genética e mostrar como dois eventos de domesticação geograficamente distintos (região dos Andes e da Mesoamérica), modificam a estrutura e o nível de diversidade genética em feijoeiro.

A disseminação do feijoeiro por várias regiões possibilitou o surgimento de um grande número de genótipos (BORÉM et al., 2006). Entretanto por ser uma planta de

importância econômica e alimentar, a maioria dos genótipos que tem sido utilizado são os que geram maior rendimento. Dessa forma, a maior parte dos trabalhos que tem sido desenvolvido atualmente tem como objetivo comparar os diversos tipos de genótipos, para verificar a variabilidade genética existente entre eles, para uma possível introgressão em programas de melhoramento e identificação de outros genótipos possíveis para o cultivo (FORD-LLOYD et al., 1994; KRESOVICH et al., 1995; ALMEIDA et al., 2009; HASHEMI-PETROUDI et al. 2010).

Demo mode

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Analisar a diversidade genética do feijoeiro comum (*P. vulgaris*) do sul do Espírito Santo, comparando genótipos locais (sul do Espírito Santo), genótipos da EMBRAPA e genótipos comerciais mais cultivados no Brasil como referência.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar molecularmente genótipos de feijoeiro que são cultivadas na região sul do Espírito Santo (comunidade Fortaleza), utilizando marcadores moleculares do tipo ISSR para analisar a diversidade genética.
- Fazer inferência quanto a similaridade genética existente entre os genótipos do sul do Espírito Santo, genótipos da EMBRAPA e comerciais.

## 7. CONCLUSÕES

- Os marcadores moleculares ISSR utilizados possibilitaram a avaliação da diversidade genética entre genótipos de *P. vulgaris* indicando genótipos promissores para estudos de características morfoagronômicas (Fortaleza 26);
- Os polimorfismos gerados foram suficientes na separação dos genótipos de acordo com sua origem (mesoamericana e andina) e região (Fortaleza-Sudeste e EMBRAPA-Sul);
- Verificou-se uma média de dissimilaridade correspondendo a 0,44, indicando a existência de 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 outros e por isso são recomendados para armazenamento em bancos de germoplasma;
- Foi constatada alta similaridade entre alguns genótipos, principalmente entre os que são da mesma região e entre os comerciais.