



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA A SECA EM UM PAINEL DE FEIJÃO COMUM VISANDO O MAPEAMENTO ASSOCIATIVO COM MARCADORES MICROSSATÉLITES

Caléo **Almeida**^{1a}; Juliana Morini Küpper Cardoso **Perseguini**^{1,2c}; Alisson Fernando **Chiorato**^{1c};
Sérgio Augusto Moraes **Carbonell**^{1c}, Luciana Lasry Benchimol-**Reis**^{1b}

¹Instituto Agrônomo de Campinas, Departamento de ; ²Instituto de Biologia – Unicamp

Nº 13105

RESUMO - O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) pode ser considerado uma cultura amplamente difundida no Brasil, maior país produtor e consumidor do grão. Pesquisas em todo o mundo vêm sendo realizadas visando melhorar os cultivares de feijões já existentes, para resistência a vários patógenos e à seca, por exemplo. Tendo em vista que os programas de melhoramento genético do feijoeiro tem buscado desenvolver cultivares que apresentem tolerância à seca, o presente trabalho teve por objetivo mensurar em um painel composto por 120 genótipos de feijão comum caracteres que estão relacionados ao estresse hídrico, e a genotipagem de marcadores SSRs para fazer análises de mapeamento associativo com os caracteres referentes ao estresse hídrico. Um total de 4 características relacionadas ao estresse hídrico apresentaram diferenças significativas de um total de 7 características avaliadas, e um total de 23 SSRs apresentaram associação com as características que apresentaram diferenças significativas na ANOVA. Estas associações podem ser úteis para promover a seleção assistida em programas de melhoramento e, portanto o presente estudo representa uma importante contribuição para o melhoramento de feijão comum.

Palavras-chaves: estresse abiótico, estresse hídrico, SSRs, marcadores moleculares.

^a Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, caleoalmeida@hotmail.com; ^b Pesquisadora do Centro de Recursos Genéticos Vegetais, llasry@iac.sp.gov.br ; ^c Doutoranda em Genética e Biologia Molecular/UNICAMP, julianamorini@hotmail.com ; ^c Diretor do Centro de Grãos e Fibras, afchiorato@iac.sp.gov.br; ^c Diretor Geral do Instituto Agrônomo de Campinas, carbonel@iac.sp.gov.br



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

ABSTRACT- The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) can be considered a widespread crop in Brazil, the largest producer and consumer of the grain. Research efforts around the world have been made to improve the existing varieties of beans, with respect to resistance to multiple pathogens and drought, for example. Given that the breeding programs have sought to develop bean cultivars with drought tolerance, this study aimed to measure in a panel of 120 common bean genotypes related traits to water stress, and genotype SSR markers to perform associative mapping analyses. A total of 4 characters related to water stress showed significant differences in total 7 evaluated traits, and a total of 23 SSRs were associated with the characteristics that showed significant differences in the ANOVA. These associations may be useful to promote markers assisted selection in breeding programs and therefore, the present study represents an important step to the improvement of common bean.

Key-words: abiotic stress, water stress, SSRs molecular markers.

1 INTRODUÇÃO

O feijão é uma fabacea domesticada há mais de sete milhões de anos. Atualmente o estresse hídrico é o segundo fator de importância que gera grandes perdas na produtividade do feijoeiro. De acordo com Silveira & Stone (2005), o rendimento do feijoeiro é bastante afetado pela condição hídrica do solo. Enquanto a resposta a estresse biótico tem sido mais bem estudada, a resistência a estresse abiótico é fisiologicamente e geneticamente de natureza mais complexa e geralmente tem herança poligênica, pois pode ser condicionado por múltiplos mecanismos interagindo ao mesmo tempo (Miklas *et al.*, 2006). Em países em desenvolvimento, a seca é um dos principais redutores da produtividade em feijão comum, especialmente onde a irrigação para a cultura não é frequente.

O Programa de Melhoramento do Feijoeiro do Instituto Agrônomo (PMF-IAC) tem investindo no desenvolvimento de ferramentas robustas e aplicáveis que possam colaborar para a identificação e transferência de genes de interesse econômico para cultivares elites do programa.

Neste sentido, o uso de marcadores moleculares vem sendo cada vez mais empregados. Dentre as classes de marcadores moleculares disponíveis, os marcadores SSRs evidenciam-se



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

como a classe mais informativa para realizar análises genéticas (Ferreira & Gratapaglia, 1998). O mapeamento genético é hoje uma ferramenta usada para a identificação de QTLs em plantas. Todavia, essa estratégia possui algumas limitações, incluindo um custo elevado para a geração de cruzamentos controlados adequados (quando eles são possíveis, o que nem sempre é o caso) e a genotipagem dos mesmos, uma baixa resolução para detectar os QTLs e o fato de que o número de alelos a ser analisado é baixo (Flint-Garcia *et al.*, 2003). Uma alternativa interessante é a genética de associação que se baseia no uso de populações com uma base genética maior (como coleções de germoplasma), estratégia essa que foi usada com sucesso no genoma humano para detectar regiões envolvidas no controle de doenças simples e complexas.

Tendo em vista que os programas de melhoramento genético do feijoeiro tem buscado desenvolver cultivares que apresentem tolerância à seca, o presente trabalho teve por objetivos mensurar em um painel composto por 180 genótipos de feijão comum provenientes do Banco de Germoplasma do Instituto Agrônomo do IAC caracteres que estão relacionados ao estresse hídrico, e a genotipagem de marcadores SSRs nos 120 genótipos de feijão comum para fazer análises de mapeamento associativo com os caracteres referentes ao estresse hídrico avaliados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Genotipagem dos 180 acessos de feijão comum com marcadores SSRs

Um total de 103 marcadores SSRs foram genotipados nos 180 genótipos de feijão comum. As reações de amplificação para todos os marcadores utilizados foram realizadas com 30 ng de DNA, 1U de *Taq*-DNA polimerase, 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,15 mM de cada dNTP, 0,8µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*) e 1x de tampão da enzima, num volume final de 15 µl. As condições de amplificação utilizadas para os SSRs genômicos foram: 1) 94°C, 1 min.; 2) 94°C, 1 min.; 3) temperatura de anelamento (*T_a*) específica para cada SSR por 1 min.; 4) 72°C, 1 min., 5) volta ao passo 2 por 30 vezes; 6) 72°C, 5 min.; 7) 15°C, incubação final. O termociclador MyCycler (BioRAD), foi utilizado. A genotipagem foi realizada em géis de acrilamida 6% corados com nitrato de prata.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

2.2 Fenotipagem dos caracteres relacionados com estresse hídrico

Em experimento em casa de vegetação, sementes das 120 genótipos de feijão comum foram selecionados dos 180 genótipos de feijão comum, que compõem um painel associativo, as sementes foram semeadas em delineamento de blocos casualizados, com três repetições, no Centro Experimental Central do Instituto Agrônomo, em Campinas. As sementes foram plantadas em vasos de 14 litros com duas sementes em cada vaso. Os genótipos foram plantados em duas casas de vegetação com dois regimes de água diferentes, sendo uma irrigada com 80% da capacidade de campo e a outra exposta a estresse terminal na fase vegetativa V3/V4. Todos os vasos foram irrigados com um sistema individual de irrigação. Após 20 dias de estresse (suspensão da irrigação), as plantas apresentaram abscisão, senescência foliar e potencial matricial da água no solo de 199 kPa.

Após o estresse, foram mensurados o conteúdo de clorofila usando o equipamento SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Inc, Osaka, Japão) e a temperatura das folhas utilizando um termômetro infravermelho (Telatemp model AG-42D, Telatemp, CA, EUA).

Para quantificar outras diferenças fisiológicas na tolerância ao estresse hídrico, vários atributos foram medidos através de amostragens destrutivas, separando a planta por partes e medindo a distribuição de massa nas diferentes partes da planta, sendo mensuradas a massa fresca da folha, a massa fresca do caule e a área foliar. A área foliar foi medida num scanner LICOR modelo LI-3000. As diferentes partes das plantas foram colocadas em sacolas e secas para medir a produção de matéria seca do caule e da folha.

2.3 Análises dos dados fenotípicos

Análises de variância (ANOVA) das variáveis nos tratamentos irrigado e não irrigado foram realizadas utilizando o pacote estatístico SAS v.8.2 (Instituto SAS, Cary, NC, EUA) para cada característica avaliada, a nível de probabilidade de 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

2.4 Análises de mapeamento associativo com os caracteres relacionados com o estresse hídrico

As análises de mapeamento associação foram realizadas utilizando o programa TASSEL 3.0. O Modelo linear de Mistura (*Mixed Linear Model* - MLM) presente no programa Tassel, versão



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

3.0 (www.maizegenetics.net), sendo que os marcadores que foram testados e as subpopulações que foram geradas pelas análises (matriz Q) foram considerados como fatores de efeito fixo, e a matriz de parentesco foi considerada como efeito aleatório. A matriz de parentesco foi obtida utilizando o *software* SPAGeDi, versão 1.2 (Hardy & Kemans, 2002), utilizando a porcentagem de subpopulações (K=4), que foi calculada utilizando o programa STRUCTURE 2.3.4. As informações de posição dos marcadores SSRs utilizados foram obtidas do mapa genético IAC-UNA x CAL-143 (Campos et al., 2011), e do Phytozome (<http://www.phytozome.net>), fazendo um BLAST das sequências dos marcadores SSRs com o banco de dados de *Phaseolus vulgaris*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o experimento de estresse hídrico aplicado nas casas de vegetação em vasos, a média de temperatura e umidade da casa de vegetação do tratamento irrigado foi de 28,67°C e 33,0% e, da casa de vegetação não irrigada foi de 29,39°C e 40,0%, respectivamente. As análises de variância apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,001$) no tratamento não irrigado nos 120 genótipos de feijão comum para as seguintes características: área foliar (AFNI), massa fresca do caule (MFCNI), massa fresca da folha (MFFNI) e temperatura da folha (TFNI), enquanto que para o tratamento irrigado nenhuma das características avaliadas apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Tabela 1).

Tabela 1. Análise de variância (ANOVA) para as medidas de características quantitativas nos 120 genótipos de feijão comum do experimento de tratamentos irrigado e não irrigado nos vasos, em casa de vegetação.

Características	Irigado		Não irrigado	
	Média dos 120 genótipos	Diff	Média dos 120 genótipos	Diff.
Teor de clorofila	37,44	ns	32,25	ns
Área foliar	431,02	ns	166,31*	*
Massa fresca da folha	6,55	ns	1,47*	*
Massa fresca do caule	3,45	ns	1,61*	*
Massa seca da folha	3,41	ns	3,19	ns
Massa seca do caule	0,62	ns	0,57	ns
Temperatura da folha	19,88	ns	31,71	*



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

* Diferenças significativas à probabilidade de 0,05; ns: não significativo; Diff: diferenças entre os 120 genótipos de feijão comum.

Para os dados fenotípicos que apresentaram diferenças significativas (Tabela 1), obtidos no experimento de tolerância à seca dos 120 genótipos de feijão comum, foram realizados testes estatísticos para verificar se eles estavam ou não normalizados, a fim de utilizá-los nas análises de mapeamento associativo. Os testes utilizados para esta avaliação foram o Skewness, Kurtosis e Shapiro. As características que apresentaram mais de um dos testes significativos foram submetidos à transformação Box-cox (Osborne, 2010) com auxílio do programa estatístico R, a qual gera curvas para a normalização dos dados para os dois experimentos. O objetivo dessa normalização é que os valores esperados das observações transformadas sejam descritos por um modelo de estrutura simples, a variância seja constante e as observações estejam normalmente distribuídas. Os valores não significativos foram mantidos, pois já estavam normalizados. A partir do parâmetro lambda (λ) indicado nestas curvas, foi escolhido o modelo de normalização mais adequado a ser aplicado nos valores dos dados fenotípicos.

Após os dados dos 120 genótipos de feijão comum para as características de peso fresco da folha no tratamento não irrigado, o peso fresco do caule no tratamento não irrigado e a temperatura da folha no tratamento não irrigado serem normalizados, histogramas dos valores de cada característica foram construídos, e os valores normalizados foram utilizados para fazer o mapeamento associativo. Para a característica de área foliar do tratamento não irrigado os valores do LSMEAN foram utilizados para realizar as análises de mapeamento associativo.

Tabela 2. Teste de associação entre os marcadores SSRs e as característica de tolerância à seca que apresentaram diferenças significativas utilizando o método do modelo MLM (Modelo Misto Linear).

Característica	Cromossomo	Nome do marcador	p^a	$R^2_{\text{marcador}^b}$
AFNI ^a	1	PvM120	0,0046**	4.07E-05
AFNI	1	BMc271	0,0018**	2.05E-05
AFNI	2	PvM93	0,0364*	5.94E-04
AFNI	3	PvM124	0,0204*	1.99E-04
AFNI	3	BMc215	0,0262*	2.68E-04
AFNI	3	PvM78	0,0348*	3.39E-04
AFNI	6	PvM14	0,0094**	0.0731
AFNI	8	PvM118	0,022*	0.0716
MFCNI ^b	1	PvM58	0,01**	0,0554
MFCNI	1	PvM123	0,01**	0,0411
MFCNI	1	SSR-IAC136	0,0462**	0,1083
MFCNI	3	PvM22	0,0421**	0,0816
MFCNI	6	BMc265	0,002**	0,1643
MFCNI	7	BMc236	0,0009697***	0,0019
MFCNI	11	PvM150	0,0019**	0,0024
MFNI ^c	3	B5J1	0,0204*	0,0653



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

MFFNI	3	BMc259	0,0396*	0,052
MFFNI	6	PvM14	0,0476*	0,0552
MFFNI	6	BMc265	0,0372*	0,0839
MFFNI	8	PvM118	0,0157*	0,0616
TFNI^d	1	PvM123	0,034*	0,0441
TFNI	1	PvM120	0,0295*	0,0359
TFNI	2	BMc228	0,0448*	0,024
TFNI	3	PvM132	0,0085*	0,0671
TFNI	6	PvM28	0,0264*	0,0483
TFNI	9	PvM79	0,0427*	0,0408

(^a)AFNI=Área foliar não irrigado; (^b) PFCNI=Massa fresca do caule não irrigado; (^c)MFFNI=Massa fresca da folha não irrigado; (^d) TFNI=Temperatura da folha não irrigado.

(^e) *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

(^f) R^2_{marcador} foi calculado como a proporção do montante dos quadrados devido ao marcador após contabilização de todos os outros efeitos no modelo.

Um total de 23,33% dos marcadores SSRs (Tabela 2) apresentaram associação as quatro características relacionadas com a tolerância à seca que apresentaram diferenças significativas na ANOVA (Tabela 1). Para a característica AFNI 7,76% dos marcadores SSRs apresentaram associação, para a característica MFCNI 6,79% dos marcadores SSRs apresentaram associação, para a característica MFFNI 4,85% dos SSRs foram associados e para a característica TFNI 5,82 dos SSRs apresentaram associação. A característica AFNI foi a que apresentou um maior número de marcadores associados, sendo um total de 8 SSRs associados a esta característica. Os marcadores PvM120, PvM14 e BMc265 apresentaram associação para mais de uma característica, sendo que, o SSR PvM120 teve associação com a característica AFNI e com a TFNI. O marcador SSR PvM14 apresentou associação tanto com a característica AFNI, quanto para a PFFNI. O SSR BMc265 teve associação com as características PFCNI e PFFNI. Estes marcadores podem ser fortes candidatos para utilização em processos de *screening* em linhagens de feijão comum que estão em processo de seleção para obtenção de cultivares tolerantes à seca, sendo que, para tanto, é necessário realizar a fenotipagem das quatro características que apresentaram diferenças significativas e que apresentam associações significativas com estes marcadores.

Galeano et al. (2012) utilizaram 170 SNPs para genotipar um painel de diversidade genética de feijão do CIAT composto por 93 acessos de feijão, além da genotipagem, foi realizada a fenotipagem de vários caracteres relacionados à tolerância à seca, os dados da genotipagem e da fenotipagem foram utilizados para realizar análises de mapeamento associativo. Neste trabalho, os autores estabeleceram associação de 30 marcadores com diferentes características relacionadas a tolerância a seca pelo método GLM (*General Linear Model*) e 28 associações utilizando o método



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

MLM (*Mixed Linear Model*). Sendo assim, o presente projeto vem somar esforços nesta abordagem de mapeamento, que tem demonstrado ser promissora, e pode vir a contribuir nos programas de melhoramento do feijoeiro.

4 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente estudo demonstraram que o mapeamento associativo com um número razoável de marcadores é possível de ser realizado, sendo que um grande número de marcadores apresentaram associações com as características avaliadas, e com uma ampla distribuição nos cromossomos da espécie *Phaseolus vulgaris* L. Entretanto há necessidade de novos experimentos de fenotipagem para tolerância ao estresse hídrico em outro ambiente, que possibilitem isolar os efeitos ambientais dos efeitos genéticos, e melhorar a detecção do efeito genético para cada associação detectada.

5 AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi apoiada por concessões da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (números 2009/05284-1 e 2009/02502-8) e CNPq (número 477239/2010-2 e 100105/2013-0).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Campos, T.; Oblessuc P.R.; Sforça, D.A.; Cardoso, J.M.K.; Baroni, R.M.; Benchimol, L.L.; Carbonell, S.A.M.; Chioratto, A.F.; Garcia, A.A.F.; Souza, A. P. Development of new linkage map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) based on microsatellite markers. Aceito para publicação **Molecular Biology**, v 27: 4, 549-560, 2010.

Ferreira, M. E. & Grattapaglia, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, p. 220, 1998.

Flint-Garcia, S.A.; Thornsberry, J.M.; Buckler, E.S. Structure of linkage disequilibrium in plants. **Annu Rev Plant Bio** 54:357-374, 2003.

Galeano, C.H.; Cortés, J.A.; Fernández, A.C.; Soler, A.; Franco-Herrera, N.; Makunde, G.; Vanderleyden, J.; Blair, M.W. Gene-based Single Nucleotide Polymorphism Markers for Genetic and Association Mapping in Common Bean. **BMC Genetics**, 13:48, 2012.

Hardy, O.J. & Vekemans, X. SPAGeDi: A versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Mol. Ecol. Notes**, v. 2, p. 618–620, 2002.

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(1-2):105-131, 2006.

Osborne, J.W. Improving your data transformations: Applying the Box-Cox transformation. **Practical Assessment, Research & Evaluation**, v.15, n.12, 9p.

Silveira, P.M. & Stone, L.F. **Cultivo de feijão irrigado na região nordeste de Minas Gerais**. Disponível:<http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoIrrigadoNoroesteMG/irrigacao.htm>, 2005.