

VARIABILIDADE GENÉTICA DE FEIJÃO-CAUPI DE PORTE ERETO E CICLO PRECOCE ANALISADA POR MARCADORES ISSR

Ana Paula Moura da Silva¹, Francisco Tiago Cunha Dias², José Jaime Vasconcelos Cavalcanti³ e Cândia Hermínia Campos de Magalhães Bertini⁴

Resumo

O conhecimento da variabilidade genética é de fundamental importância para o processo de melhoramento genético das culturas em geral. Objetivou-se avaliar a variabilidade genética em 46 genótipos de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce por meio de marcadores ISSR. O material foi proveniente do Banco de Germoplasma da Universidade Federal do Ceará e do programa de melhoramento genético de feijão-caupi da Embrapa Meio Norte. As extrações de DNA foram realizadas de acordo com o protocolo de Ferreira e Grattapaglia. Oito iniciadores ISSR produziram 49 bandas polimórficas (79,04%) com 6,12 marcadores por iniciador. A análise de agrupamento permitiu a divisão dos 46 genótipos de feijão-caupi em dez grupos de similaridade genética a uma distância de 0,52. Os marcadores ISSR foram eficientes em detectar o polimorfismo entre os genótipos estudados.

Introdução

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma fabaceae bastante cultivada por pequenos e médios produtores das regiões Norte e Nordeste do Brasil, e mais recentemente por grandes agricultores dessas regiões (XAVIER et al., 2005), os quais necessitam de cultivares adequadas a colheita mecânica e com maturação uniforme. Desse modo, a existência de variabilidade genética e a caracterização de germoplasma torna-se necessário para o início de um programa de melhoramento genético. Tradicionalmente, a caracterização dos genótipos é feita baseando-se em marcadores morfológicos, herdáveis, facilmente visíveis e mensuráveis, que, a princípio, são expressos em todos os ambientes (IPGRI, 1996). Um dos grandes problemas da utilização dos marcadores fenotípicos é o número reduzido desses marcadores disponíveis, a ausência de ligação destes com caracteres de importância econômica e os efeitos deletérios das mutações que limitam sua utilização (GUIMARÃES; MOREIRA, 1999). Assim, a seleção de descritores com alta herdabilidade e estáveis são de grande importância para a caracterização genotípica do feijão-caupi.

O desenvolvimento dos marcadores moleculares apresenta uma grande contribuição para os estudos da genética de populações e melhoramento genético por tornar possível a análise de cada população, ou indivíduo, de interesse em um pequeno espaço de tempo, sendo possível à utilização de qualquer forma alélica (fragmento de DNA ou a expressão de uma proteína codificada por ele) originada de um genoma como marcador genético (SOUZA JUNIOR, 2001).

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), um marcador molecular é definido como todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondendo a regiões expressas ou não do genoma). Diversas técnicas moleculares estão disponíveis para a avaliação da diversidade genética ao nível de sequência de DNA, ou seja, para a determinação do polimorfismo genético, permitindo a obtenção de um número ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo.

Várias técnicas envolvendo marcadores moleculares têm sido empregadas no estudo dos recursos genéticos vegetais. Dentre essas técnicas está o polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP); o polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD); polimorfismo de

1 .Estudante de Agronomia da Universidade Federal do Ceará. Bolsista PIBIC/CNPq: anapaula.moura@hotmail.com.

2 . Engenheiro Agrônomo, Estudante de Mestrado do programa de pós-graduação em Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, Bolsista da CAPES. ftcdias@gmail.com.

3 . Engenheiro Agrônomo, Ph.D, Pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Dra. Sara Mesquita 2270, C.P. 3761, CEP: 60511-110, Planalto Pici, Fortaleza, CE, jaime@cnpat.embrapa.br.

4. Engenheira Agrônoma, Doutora, Professora da Universidade Federal do Ceará, Departamento de Fitotecnia, Bloco 805, Av. Mister Hull, 2977, CEP 60.356-001. Fortaleza-CE. candida@ufc.br.

Apoio financeiro: CAPES

comprimento de fragmentos amplificados (AFLP); polimorfismo resultante da presença de diferentes números de elementos simples repetidos detectados por meio de marcadores microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeat). A escolha do marcador molecular depende da reprodutibilidade e simplicidade. Os melhores marcadores para o mapeamento genômico, seleção assistida ou detecção do polimorfismo são os que requerem baixo custo, facilidade de manipulação e alta reprodutibilidade (BORNET; BRANCHARD, 2001).

Desde 1994 os marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) tem sido utilizados, apresentando alto grau de polimorfismo, baixo custo e reprodutibilidade, sendo empregado em estudos de diversidade genética, correlações filogenéticas, prospecção de genes, dentre outros (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994). Dessa forma, objetivou-se com esse trabalho estimar a variabilidade de genótipos de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce através de marcadores ISSR.

Material e Métodos

Quarenta e seis (46) genótipos de feijão-caupi provenientes do Banco de Germoplasma da Universidade Federal do Ceará e do programa de melhoramento genético de feijão-caupi da Embrapa Meio Norte foram avaliados por oito iniciadores ISSR IDT (Integrated DNA Technologies). As extrações de DNA foram realizadas de acordo com o protocolo estabelecido por Ferreira e Grattapaglia (1998). As reações de ISSR foram preparadas para um volume total de 20 µL contendo 50 ng de DNA molde, 0,2 mM de cada dNTP, 2,0 mM de MgCl₂, 1X PCR Buffer, 0,8 mM do iniciador, 20 µg de BSA e 1,0 unidade da enzima Tag DNA Polimerase (Invitrogen).

As condições de PCR utilizadas foram: 4 minutos a 94 °C (desnaturação inicial), seguindo-se de 40 ciclos de desnaturação (94 °C por 1 minuto), anelamento (47-55 °C, dependendo do iniciador por 1 minuto) e extensão (72 °C por 1 minuto) seguindo-se de uma etapa de extensão final (72 °C por 5 minutos). Todas as reações de PCR foram realizadas em termociclador TECHNE TC-512. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose (2%) corados com brometo de etídio (0,5 µg/µL) submetidos a 90 volts por 4 horas. Posteriormente os géis foram visualizados sob luz UV e fotografados em fotodocumentador.

Foi construída uma planilha de dados com informações referentes à presença e ausência de bandas, características de cada iniciador para cada um dos genótipos. Em seguida, esses dados foram utilizados para construção de uma matriz de similaridade genética onde foi utilizado o coeficiente de similaridade de Jaccard. A partir dessa matriz, o dendrograma foi obtido pelo método UPGMA (Método de média aritmética não ponderada).

Resultados e Discussão

A partir da amplificação dos oito iniciadores ISSR utilizados foram gerados 49 marcadores polimórficos (Tab. 1), perfazendo uma média de 6,12 marcadores por iniciador. Do total de 62 marcadores, 48 (79,03%) foram polimórficos e 13 (20,96%) foram monomórficos. Sousa et al. (2008) estudando a diversidade genética em *Zabrotes subfasciatus* utilizando marcadores ISSR obtiveram uma média de polimorfismo de 83,20% estando de acordo com este trabalho. A Figura 1 ilustra o padrão de amplificação do iniciador ISSR 810.

A análise de agrupamento (Fig. 2) realizada com base nas distâncias genéticas permitiu a divisão dos 46 genótipos de feijão-caupi em dez grupos de similaridade genética a uma distância de 0,52. Dwivedi et al. (2001) trabalhando com 26 acessos de amendoim e oito iniciadores RAPD foram capazes de realizar o agrupamento desses genótipos em cinco grupos, já Xavier et al. (2005) estimando a variabilidade genética em feijão-caupi através de oito iniciadores RAPD verificaram o agrupamento de 45 acessos de feijão-caupi em quatro grupos. Esses resultados demonstram a eficiência dos marcadores ISSR na detecção do polimorfismo genético. Segundo Esselman et al. (1999), os marcadores ISSR possuem a vantagem de gerar grandes quantidades de bandas, sendo abundantes ao longo do genoma de eucariontes, assim são bastante úteis na avaliação de populações em estudos genéticos, na detecção da diversidade genética e em estudos de mapeamento genético.

Conclusão

Os marcadores ISSR foram eficientes em detectar o polimorfismo entre os genótipos estudados.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade Federal do Ceará pelo apoio institucional, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível de Superior (CAPES), pelo apoio financeiro, Embrapa Meio Norte pela concessão do material genético utilizado nessa pesquisa e a Embrapa Agroindústria Tropical pela utilização do Laboratório de Biologia Molecular.

Referências

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19: 209-215, 2001.

DWIVEDI, S.L.; GURTU, S.; CHANDRA, S.; YUEJIN, W.; NIGAM, S.N. Assessment of genetic diversity among selected groundnut germplasm: 1- RAPD analysis. *Plant Breeding*, v.120, p.345-359, 2001.

ESSELMAN, E. J.; JIANQIANG, L.; CRAWFORD, D. J.; WINDUSS, J. L.; WOLFE, A. D. Clonal diversity in the rare *Calamagrotis porter* ssp. *Insperrata* (Poaceae): Comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology*, v.8, p.443-451, 1999.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3º ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998, 220p.

GUIMARÃES, C. T.; MOREIRA, M. A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. (Ed.). *Melhoramento de espécies cultivadas*. Viçosa: UFV, 1999. p.715-740.

IPGRI- *International Plant Genetic Resources Institute. Descriptors for banana (Musa spp.)*. Roma: IPGRI, 1996, 55p.

SOUSA, G. A.; CARVALHO, M. R. O.; MARTINS, E. R.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, L. O. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.43, n.7, p.843-849, 2008.

SOUSA JUNIOR, C. L. Melhoramento de espécies alógamas. In: NASS, L. L.; VALOUIIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C.; (Ed.). *Recursos genéticos e melhoramento: plantas*. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.159-2001.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RUMJANEK, N. G.; FREIRE FILHO, F. R. Variabilidade genética em acessos de caupi analisada por meio de marcadores RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.40, n.4, p.353-359, 2005.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20:176-183, 1994,

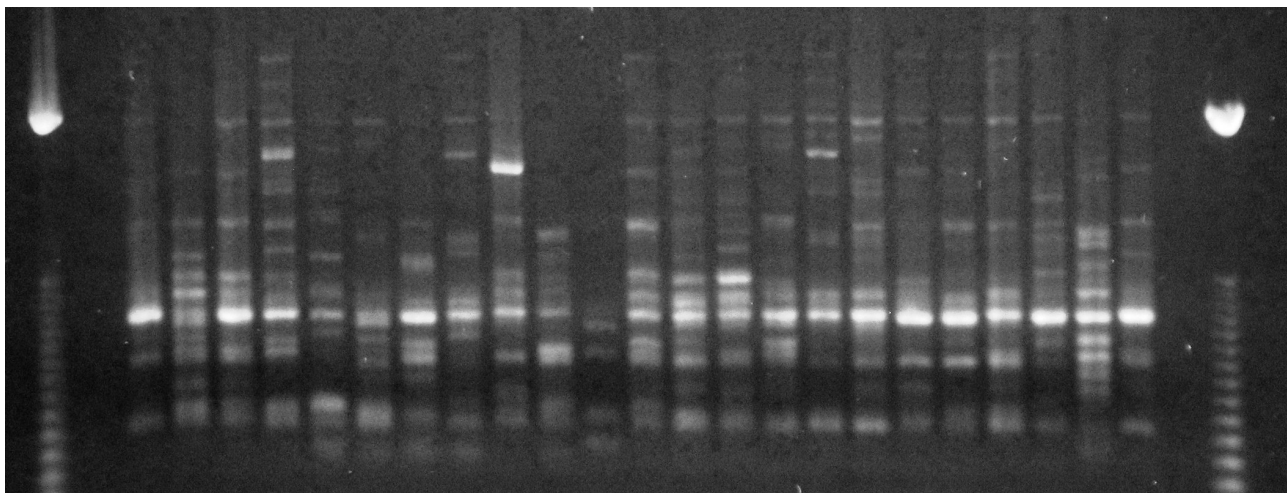


Figura 1. Perfil eletroforético dos fragmentos amplificados com o iniciador ISSR 810 em 23 genótipos de feijão-caupi.

Tabela 1. Sequência do iniciador, bandas geradas e polimórficas de oito iniciadores ISSR utilizadas na caracterização da variabilidade genética em feijão-caupi.

Iniciador	Seqüência (5'→3')	Bandas geradas	Bandas polimórficas
810	5' GAG AGA GAG AGA GAG AT	9	9
822	5' TCT CTC TCT CTC TCT CA	6	5
826	5' ACA CAC ACA CAC ACA CC	7	6
841	5' GAC AGA GAG AGA GAG GT	7	6
857	5' ACA CAC ACA CAC ACA CYG	5	3
861	5' ACC ACC ACC ACC ACC ACC	8	5
880	5' GGA GAG GAG AGG AGA	8	6
885	5' BHB GAG AGA GAG AGA GA	7	4
888	5' BDB CAC ACA CAC ACA CA	5	5
Total		62	49

B: S,G,T; **H:** A, C, T; **Y:** C,T

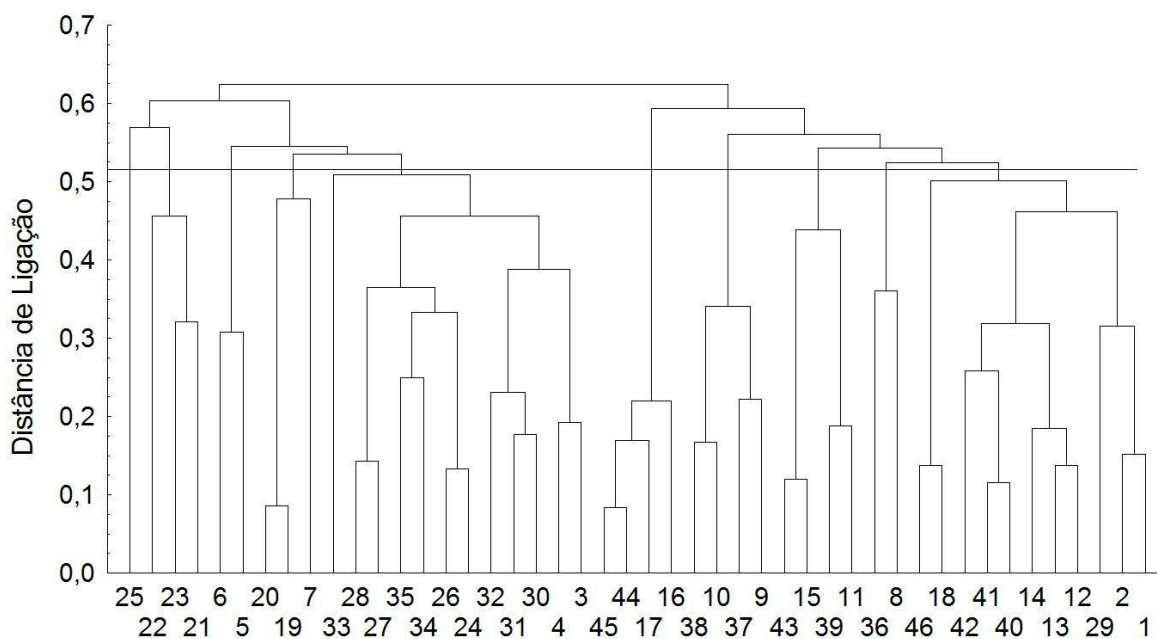


Figura 2. Dendrograma obtido a partir da amplificação de oito iniciadores ISSR.