

## DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE FEIJÃO-CAUPI ATRAVÉS DE MARCADORES SSR

E. M. R. COSTA<sup>1</sup>; C. J. ANUNCIÇÃO FILHO<sup>2</sup>; L. V. RESENDE<sup>3</sup>; K. J. DAMASCENO-SILVA<sup>4</sup>; M. C. ANDRADE<sup>5</sup>

**Resumo** - A avaliação da divergência genética entre acessos fornece informações importantes aos programas de melhoramento. Com o objetivo de caracterizar a diversidade genética entre acessos de feijão-caupi do Banco Ativo de Germoplasma (BAG), da Embrapa Meio-Norte, a técnica SSR foi aplicada no presente estudo. Foram caracterizados trinta e dois acessos, que geraram 22 bandas polimórficas, a partir de 10 *primers* de microssatélites. Os resultados obtidos foram analisados pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) com o auxílio do programa NTSYs versão 2.1. O dendrograma gerado agrupou a maior parte dos acessos em três grupos, os acessos IT99K-529-2 e IT98K-506-1, IT00K-1263 e IT97K-499-35, IT00K-1217 e IT93K-625, IT98K-1111-1 e IT93K-452-1 e IT99K-316-2 e IT89KD-260 apresentaram alta similaridade entre si. Os resultados dos marcadores SSR, confirmam o seu potencial na caracterização da diversidade genética em germoplasma de feijão-caupi.

**Palavras-chave:** Banco de germoplasma. Caracterização.

## GENETIC DIVERGENCE AMONG COWPEA ACCESSIONS BY SSR MARKERS

**Abstract** - The genetic divergence assessment among accessions provides important information for breeding programs. In the present study, the genetic diversity among accessions from Embrapa Mid-North's Cowpea Germplasm Active Bank (BAG) was evaluated using SSR markers. Thirty two accessions were assessed using 10 SSR *primers* generating 22 polymorphic bands. The data matrix was analyzed by UPGMA (Unweighted Pair Group using mathematical averages) using NTSYs 2.1 program. Most of the accessions were distributed in three clusters, and the accessions IT99K-529-2 and IT98K-506-1, IT00K-1263 and IT97K-499-35, IT00K-1217 and IT93K-625, IT98K-1111-1 and IT93K-452-1 and IT99K-316-2 and IT89KD-260 presented high similarity to each other. The SSR results of the underscore their potential in elucidating patterns of germplasm diversity of cowpea.

**Keywords:** Germplasm bank. Characterization.

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, CEP: 52.171-900, Recife-PE. E-mail: [evamrc\\_9@hotmail.com](mailto:evamrc_9@hotmail.com);

<sup>2</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, CEP: 52.171-900, Recife-PE. E-mail: [cjoseufrpe@yahoo.com.br](mailto:cjoseufrpe@yahoo.com.br)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Lavras, Departamento de Agricultura, 37.200-000 Lavras – MG. E-mail: [luciane.vilela@ufla.br](mailto:luciane.vilela@ufla.br)

<sup>4</sup>Embrapa Meio-Norte, Av. Duque de Caxias, 5650, B. Buenos Aires, CEP 64006-220, Teresina, PI. E-mail: [kaesel@cpamn.embrapa.br](mailto:kaesel@cpamn.embrapa.br)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Lavras, Departamento de Agricultura, 37.200-000 Lavras – MG. E-mail: [marcellinhaufa@gmail.com](mailto:marcellinhaufa@gmail.com)

## Introdução

O feijão-caupi, feijão-de-corda ou feijão-macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), é uma das principais culturas da região Nordeste. Recentemente, foi apontada pela FAO como uma das melhores alternativas para o aumento da oferta de proteínas (SIMON, 2002). Esta cultura destaca-se na economia brasileira e, especialmente na região Nordeste, sendo esta responsável por 94,40% da área e 87,73% da produção total de feijão-caupi no Brasil (UNIFEIJÃO, 2006).

Segundo Silva et al. (2005), a caracterização e avaliação de uma coleção permitem a compreensão da variabilidade existente, e constituem atividades prioritárias no manejo de um banco de germoplasma. A caracterização permite indicar aspectos de uso imediato aos agricultores, bem como identificar acessos que apresentem características interessantes para o melhoramento (FONSECA et al., 1994).

Classicamente a diversidade genética tem sido avaliada por meio de análise fenotípica, ou seja, por meio de características morfoagronômicas. No entanto, a caracterização de germoplasma vegetal tem sido beneficiada pelo desenvolvimento e emprego de métodos moleculares que permitem identificar variação de seqüência na molécula de DNA, (FERREIRA et al., 2007).

Dentre as metodologias para geração de marcadores moleculares existentes, a técnica SSR (Simple Sequence Repeat), tem sido considerada uma importante ferramenta na identificação individual, estudo de divergência genética e na construção de mapas de ligação (LI et al. 2001).

Este trabalho teve como objetivo estimar a divergência genética entre acessos de feijão-caupi do Banco Ativo de Germoplasma de Feijão-caupi da Embrapa Meio-Norte.

## Material e Métodos

Trinta e dois acessos de feijão-caupi do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Meio-Norte (Tabela 1) foram caracterizados através de marcadores SSR. A extração de DNA foi realizada a partir de folhas jovens de plantas semeadas em papel germinador, segundo Ferreira e Grattapaglia (1998). Foram usados 20 pares de *primers* microssatélites desenvolvidos por Li et al. (2001).

**Tabela 1.** Acessos de feijão-caupi do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Meio-Norte, Teresina-PI.

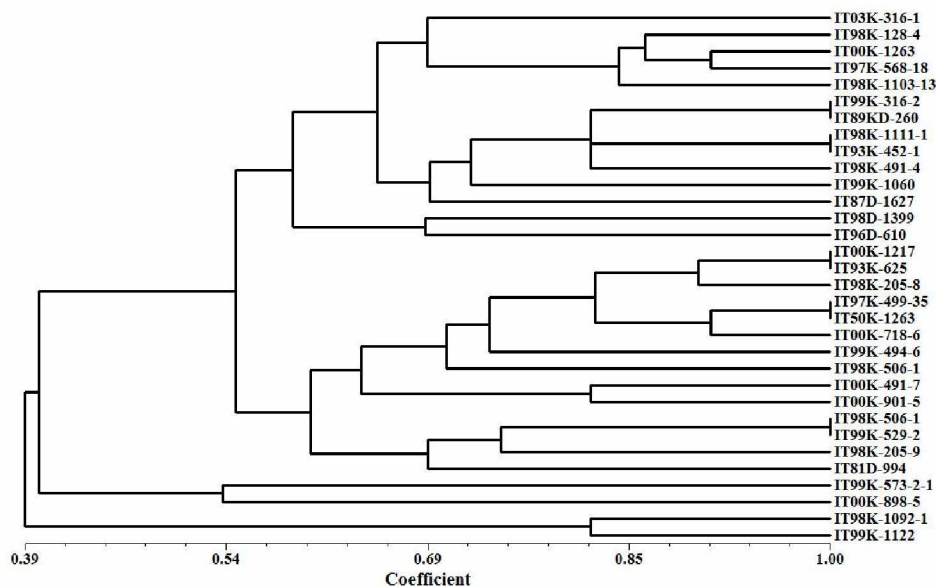
| Acessos de feijão-caupi |                   |                    |                  |
|-------------------------|-------------------|--------------------|------------------|
| 1 - IT03K-316-1         | 9 - IT93K-452-1   | 17 - IT00K-1263    | 25 - IT00K-718-6 |
| 2 - IT00K-1217          | 10 - IT98K-491-4  | 18 - IT98K-506-1   | 26 - IT93K-625   |
| 3 - IT99K-316-2         | 11 - IT98K-1092-1 | 19 - IT00K-1263    | 27 - IT98K-205-9 |
| 4 - IT99K-573-2-1       | 12 - IT99K-494-6  | 20 - IT99K-1122    | 28 - IT89KD-260  |
| 5 - IT98K-1111-1        | 13 - IT97K-499-35 | 21 - IT99K-529-2   | 29 - IT98D-1399  |
| 6 - IT99K-1060          | 14 - IT00K-901-5  | 22 - IT97K-568-18  | 30 - IT87D-1627  |
| 7 - IT00K-491-7         | 15 - IT98K-205-8  | 23 - IT98K-1103-13 | 31 - IT81D-994   |
| 8 - IT98K-506-1         | 16 - IT98K-128-4  | 24 - IT00K-898-5   | 32 - IT96D-610   |

Seguindo as condições dos *primers*, as reações foram submetidas a diferentes programações, seguindo dois “Touchdown”. A primeira programação seguiu uma temperatura de anelamento que foi decrescida 0,5°C por 18 ciclos, variando entre 67°C e 58°C, continuando por mais 20 ciclos adicionais de 94°C por 1 min e 72°C por 1 min, finalizando com uma extensão final de 72°C por 10 min. Outra PCR em condições similares foi realizada, exceto para as temperaturas de anelamento ( $T_m$ ), que variou entre 64°C e 55°C durante 18, ciclos decrescendo 0,5°C por ciclo, seguindo por mais 30 ciclos adicionais de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, e 72°C por 1 min.

Os produtos da PCR foram separados em gel de poliacrilamida 6% não-desnaturante e corado com nitrato de prata de acordo com Sanguinetti et al., (1994). Foi construída uma planilha de dados com informações referentes à presença (1) e ausência (0) de bandas. Os dados gerados foram utilizados para a construção de uma matriz de similaridade genética, com auxílio do programa Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis (NTSYS – PC V.2.1) utilizando o coeficiente de similaridade Jaccard.

### Resultados e Discussão

No presente estudo, dos 20 *primers* SSR inicialmente testados, 10 revelaram polimorfismo entre os acessos analisados (VM3, VM12, VM13, VM19, VM31, VM33, VM36, VM39, VM68 e VM70). A maior parte dos *primers* produziu dois alelos, no entanto, os *primers* VM3 e VM68 amplificaram três alelos. Trabalhos envolvendo cultivares e espécies silvestres em feijão-caupi, encontraram mais de sete alelos, e um alto polimorfismo, utilizando *primers* SSR (LI et al., 2001; OGUNKANMI et al., 2008).



**Fig. 1.** Dendrograma baseado nos coeficientes de similaridade de Jaccard entre 32 acessos de feijão-caupi, construído por análise de agrupamento (UPGMA) com base nos dados de SSR.

O dendrograma obtido com os marcadores SSR (Fig. 1), foi eficiente em agrupar os acessos de feijão-caupi. Foram formados três grupos, sendo que a maioria ficou concentrada em dois grandes grupos. Os acessos IT99K-529-2 e IT98K-506-1, IT00K-1263 e IT97K-499-35, IT00K-1217 e IT93K-

625, IT98K-1111-1 e IT93K-452-1 e IT99K-316-2 e IT89KD-260 apresentaram similaridade igual a 1,0, podendo ser considerado como duplicatas por meio destes marcadores.

Os acessos IT99K-573-2-1, IT98K-1092-1, IT99K-1122 e IT00K-898-5 foram os que se mostraram mais distantes no agrupamento, podendo ser considerados mais divergentes, por possuírem características individuais que os diferencia dos demais acessos estudados, indicando também que estes acessos podem ser utilizados como genitores em cruzamentos para a ampliação da base genética em feijão-caupi, atualmente considerada estreita.

### Conclusões

Por meio dos marcadores SSR, foi possível identificar a presença de duplicatas no Banco Ativo de Germoplasma (IT99K-529-2 e IT98K-506-1, IT00K-1263 e IT97K-499-35, IT00K-1217 e IT93K-625, IT98K-1111-1 e IT93K-452-1 e IT99K-316-2 e IT89KD-260);

Os acessos IT99K-573-2-1, IT98K-1092-1, IT99K-1122 e IT00K-898-5 foram os mais divergentes neste estudo;

### Agradecimentos

CNPq, PROCAD/CAPES e Embrapa Meio-Norte.

**Revisores:** Comitê Local de Publicação da Embrapa Meio-Norte – CLP ([clp@cpamn.embrapa.br](mailto:clp@cpamn.embrapa.br)). Avenida Duque de Caxias, 5650; Bairro Buenos Aires; 64006-220; Teresina-PI.

### Referências

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa-CENARGEM, 1998. 220 p.

FERREIRA, M. E.; MORETZSOHN, M. de C.; BUSO, G. S. C. Fundamentos de caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 377-420.

FONSECA, N.; SILVA, S. de O.; SAMPAIO, J. M. M. Caracterização e avaliação de cultivares de manga na região do recôncavo baiano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 16, n. 3, p. 29-45, 1994.

LI, C. D.; FATOKUN, C. A.; UBI, SINGH, B. B.; SCOLES, G. J. Determining genetic similarities and relationships among cowpea breeding lines and cultivars by microsatellite markers. **Crop Science**, v. 41, p. 189-197, 2001.

OGUNKANMI L. A.; OGUNDIPE, O. T.; NG N. Q. and FATOKUN C. A... Genetic diversity in wild relatives of cowpea (*Vigna unguiculata*) as revealed by simple sequence repeats (SSR) markers. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 6, n. 3/4 p. 263 -268, 2008.

SANGUINETTI, C. J., E. D. NETO, and A. J. G. SIMPSON. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **BioTechniques**, v. 17, p. 915-919, 1994.

SILVA, H. T. da e FONSECA, J. R. **Banco Ativo de Germoplasma de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Disponível em: <[www.cnpaf.embrapa.br/conafe/pdf/conafe2005-0116](http://www.cnpaf.embrapa.br/conafe/pdf/conafe2005-0116)>. Acesso em: 23 de ago. 2006.

SIMON, M. V. **Uso de marcadores moleculares em *Phaseolus vulgaris***. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

UNIFEIJÃO. **A produção de feijão no Brasil**. Disponível em: <[http://www.unifeijao.com.br/feijao\\_do\\_brasil/feijao\\_dobrasil.thm](http://www.unifeijao.com.br/feijao_do_brasil/feijao_dobrasil.thm)>. Acesso em: 24 ago. 2006.