

Área: Biotecnologia

## **VARIABILIDADE GENÉTICA DE FEIJÃO-CAUPI DE PORTE PROSTRADO E SEMI-PROSTRADO POR MARCADORES ISSR**

**Michelli Ferreira dos Santos<sup>1</sup>; Massaine Bandeira de Sousa<sup>2</sup>; Caroline de Jesús Pires<sup>2</sup>; Kaesel Jackson Damasceno e Silva<sup>3</sup>; Maurisrael de Moura Rocha<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Bióloga, Doutoranda em Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, RENORBIO, E-mail: michelly\_m\_santos@yahoo.com.br.

<sup>2</sup> Bióloga, Mestranda em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Universitário Ministro Petrônio Portella - Bairro Ininga, CEP: 64049-550, Teresina, PI.

<sup>3</sup> Eng<sup>o</sup> Agrônomo, Pesquisador Embrapa Meio Norte, Av. Duque de Caxias, 5650 - Buenos Aires, Caixa Postal 001, CEP: 64006-220, Teresina, PI.

**Resumo** – O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é expressivamente cultivado nas regiões Norte e Nordeste do Brasil onde é incorporado nos arranjos produtivos como safrinha e em alguns locais como cultura principal. Os programas de melhoramento genético no país têm adotado juntamente com o melhoramento clássico as modernas técnicas biotecnológicas, e uma das etapas importantes nesse processo consiste na caracterização de genótipos a nível molecular. O objetivo desse trabalho é avaliar a variabilidade genética de feijão-caupi de porte prostrado e semi-prostrado por marcadores ISSR. Foram realizadas extrações de DNA de tecido foliar de 20 genótipos de feijão-caupi de porte Prostrado e Semi-Prostrado, provenientes do Programa de Melhoramento Genético de Feijão-Caupi da Embrapa Meio-Norte. A partir da amplificação dos cinco *primers* ISSR utilizados foram gerados 34 marcadores, sendo 27 polimórficas (79,41%). Foi observada uma variação de 4 a 9 locos polimórficos e média de 5,4 bandas por *primer*. A matriz de similaridade obtida por meio do coeficiente de Jaccard entre os genótipos com base nos marcadores ISSR revelou que o coeficiente de similaridade entre os pares de genótipos variou de 0,41 a 0,96 e apresentou média de 0,69. O par mais similar ocorreu entre os acessos MNCO1-649F-2-1 e MNCO1-649F-2-11, enquanto os pares mais dissimilares foram registrados entre os acessos MNCO2-675-4-9. Os marcadores ISSR foram eficientes em detectar o polimorfismo entre os genótipos estudados.

**Palavras-chave:** *Vigna unguiculata*, coeficiente de similaridade, caracterização de genótipos.

### **Introdução**

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é expressivamente cultivado nas regiões Norte e Nordeste sendo estratégico para agricultura de base familiar, e nos últimos anos vem se expandindo na região Centro-Oeste, onde é incorporado nos arranjos produtivos como safrinha e em alguns locais como cultura principal (FREIRE FILHO et al., 2009).

Os programas de melhoramento genético no país têm adotado juntamente com o melhoramento clássico modernas técnicas biotecnológicas, e uma das etapas importantes nesse processo consiste na caracterização de genótipos a nível molecular (TEIXEIRA, 2009). Os marcadores moleculares com o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) têm sido recomendados como ferramentas mais seguras na caracterização de espécies de plantas. Dessa forma é possível identificar acessos que possuem características desejáveis para o desenvolvimento de novas cultivares.

Com isso, o objetivo desse trabalho é avaliar a variabilidade genética de feijão-caupi de porte prostrado e semi-prostrado por marcadores ISSR.

### Material e Métodos

Foram realizadas extrações de DNA de tecido foliar de 20 genótipos de feijão-caupi de porte Prostrado e Semi-Prostrado, provenientes do Programa de Melhoramento de Feijão-Caupi da Embrapa Meio-Norte (Tabela 1). A extração do DNA foi realizada obedecendo-se as recomendações dos kits de purificação Invitex (INVISORB, 2008). A quantificação de DNA foi feita em gel de agarose a 0,8%, corado com GelRed-Biotium® 10.000X, comparando a resolução do DNA das amostras com o DNA-λ na concentração de 100ng. A qualidade e quantidade do DNA extraído foi observada no espectrofotômetro NanoDrop™. As amostras de DNA foram diluídas em tampão TE, na concentração de 15 ng.μL<sup>-1</sup>, para serem usadas nas reações de PCR.

**Tabela 1** - Relação dos genótipos elite de feijão-caupi pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético de Feijão-Caupi da Embrapa Meio-Norte, Teresina-PI, 2012.

Acessos	Características	Acessos	Características
MNCO1-649F-1-3	Semi- Prostrado	MNCO2-701F-2	Semi- Prostrado
MNCO1-649F-2-1	Semi- Prostrado	MNCO3-736F-2	Semi- Prostrado
MNCO1-649F-2-11	Semi- Prostrado	MNCO3-736F-26f-6	Semi- Prostrado
MNCO2-675-4-9	Semi- Prostrado	MNCO3-761F-1	Semi- Prostrado
MNCO2-675F-9-5	Semi- Prostrado	PINGO DE OURO-1-2	Semi- Prostrado
MNCO2-676F-1	Semi- Prostrado	BRS-XIQUEXIQUE	Prostrado
MNCO2-677F-2	Semi- Prostrado	BRS-JURUÁ	Prostrado
MNCO2-677F-5	Semi- Prostrado	BRS-ARACÊ	Prostrado
MNCO2-680F-1-2	Semi- Prostrado	BRS-GURGUÉIA	Prostrado
MNCO2-689F-2-8	Semi- Prostrado	BRS-MARATAOÃ	Prostrado

Foram avaliados 70 *primers* ISSR da Operon Technologies, os quais foram aplicados em amostras de DNA de três indivíduos. Nesta etapa, procurou-se selecionar *primers* que amplificaram o maior número de marcadores polimórficos e de boa qualidade para leitura. Para análise da diversidade genética foram utilizados os 5 *primers* com melhor polimorfismo. As reações de amplificação foram realizadas de acordo com o protocolo de Williams et al. (1990) modificado. O volume final utilizado nas reações foi de 10 μL, contendo os seguintes componentes: tampão 10X [16,65 mM Tris-HCl, pH 8,0; 83,25 mM KCL; 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (New England), 0,75 mM de dNTP (Invitrogen), 0,2 μM de *primer*, 1U de *Taq* DNA *polimerase* (New England), 1 μL de DNA genômico (~15 ng) e H<sub>2</sub>O ultrapura. As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®), com uma etapa inicial de desnaturação de 5 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 1 min a 94°C para desnaturação, 1 min de 50°C a 55°C para o anelamento, dependendo do iniciador, 2 min a 72°C para extensão e uma extensão final de 5 min a 72°C. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, tamponados e revelados com GelRed-Biotium®. Ao final, os géis foram visualizados em transluminador UV e fotodocumentados para posterior contagem das bandas.

As bandas correspondentes aos fragmentos amplificados ao acaso foram codificadas como caracteres binários, 0 e 1, correspondendo a ausência e presença de bandas, respectivamente. A partir desses dados, foi estimada a similaridade genética entre os genótipos, utilizando-se o coeficiente de similaridade de Jaccard,

calculado pelo programa PAST v.1.34 (HAMMER et al. 2001). A partir da matriz de similaridade gerada foi realizada a análise de agrupamento pelo método de Ligação Média Entre Grupos (UPGMA) no mesmo programa. O coeficiente de correlação cofenético ( $r$ ) foi calculado, por meio da matriz de similaridade e do dendrograma obtido. O ponto de corte foi feito com base na estimativa da similaridade genética média  $sg_m = \sum sg_{ij} / N$ , em que,  $sg_{ij}$  significa similaridade genética entre cada par de indivíduos e  $N$  número de pares obtidos.

### Resultados e Discussão

A partir da amplificação dos cinco *primers* ISSR: UBC-810, UBC-888, UBC-856, UBC-828 e UBC-826 utilizados foram gerados 34 marcadores, sendo 27 polimórficas (79,41%) (Tabela 2). Foi observada uma variação de 4 a 9 locos polimórficos e média de 5,4 bandas por *primer*, sendo evidente o polimorfismo entre os genótipos.

**Tabela 2** - *Primers* de ISSR selecionados, com suas respectivas sequências e número de fragmentos amplificados e polimórficos.

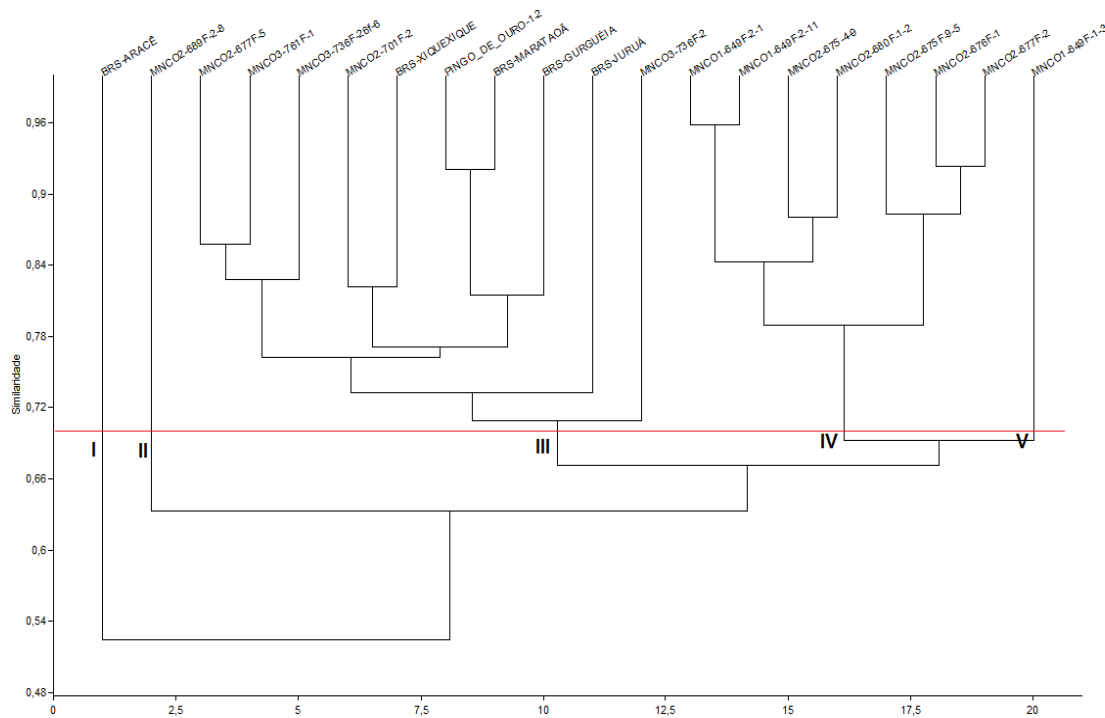
<i>Primer</i>	Sequências	Nº de fragmentos	
		Amplificados	Polimórficos
UBC 810	5' GAG AGA GAG AGA GAG AT 3'	7	7
UBC 888	5' BDB CAC ACA CAC ACA CA 3'	9	7
UBC 856	5' ACA CAC ACA CAC ACA CYA 3'	7	6
UBC 828	5' TGT GTG TGT GTG TGT GA 3'	7	6
UBC 826	5' ACA CAC ACA CAC ACA CC 3'	4	1
Total		34	33

\*Y= (C, T); B= (C, G, T).

Silva et al. (2009) ao estudarem a variabilidade genética de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce analisada por oito *primers* ISSR, obtiveram 49 marcadores polimórficos, sendo que os primers UBC-810 e UBC-888, assim como neste trabalho foram os mais informativos.

A matriz de similaridade entre os genótipos obtida por meio do coeficiente de Jaccard com base nos marcadores ISSR revelou que o coeficiente de similaridade entre os pares de genótipos variou de 0,41 a 0,96 e apresentou média de 0,69. O par mais similar ocorreu entre os acessos MNC01-649F-2-1 e MNC01-649F-2-11, enquanto os pares mais dissimilares foram registrados entre os acessos MNC02-675-4-9 e BRG-ARACÊ.

Os marcadores ISSR possibilitaram a diferenciação genética dos 20 genótipos de feijão-caupi (Figura 1). O dendrograma permitiu a separação em cinco grupos ( $dg_m = 0,69$ ).



**Figura 1** - Dendrograma gerado pelas similaridades genéticas entre os 20 genótipos de feijão-caupi, utilizando o índice de similaridade de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA.

O grupo I foi formado pelo genótipo BRS-ARACÊ, que possui características distintas dos demais, como cor da semente verde e porte prostrado, o grupo II pelo genótipo MNCO2-689F-2-8 e no grupo V pelo genótipo MNCO1-649F-1-3 que apareceram isolados. O grupo III e IV agrupou os demais genótipos em que a maioria apresenta cor da semente marrom, porte semi-prostrado e distribuição da vagem acima da folhagem.

### Conclusões

Os marcadores ISSR foram eficientes em detectar o polimorfismo entre os genótipos de feijão-caupi de porte prostrado e semi-prostrado. O par mais similar ocorreu entre os acessos MNCO1-649F-2-1 e MNCO1-649F-2-11, enquanto os pares mais dissimilares foram registrados entre os acessos MNCO2-675-4-9 e BRG-ARACÊ.

### Referências

- FREIRE FILHO, F.R.; ROCHA, M. de M.; RIBEIRO, V.Q.; SITOLLIN, I.M. Avanços e perspectivas para a cultura do feijão-caupi. In: ALBUQUERQUE, A.C.S.; SILVA, A.G. da (Ed.). Agricultura Tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. c.7, p.235-250.
- HAMMER, O.; HARPER, D. A.T., P.D.R. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, v.4, n.1, 2001. 9pp.
- INVISORB. Spin Plant Mini Kit for DNA extractions, *Invitex*, 2008.
- SILVA, A. P. M. ; DIAS, F. T. C.; CAVALCANTI, J. J. V.; BERTINE, C. H. C. M. M. Variabilidade genética de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce analisada por marcadores ISSR. In: 5º Congresso Brasileiro de

Melhoramento de Plantas, 2009, Guarapari. ANAIS do 5º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2009

TEIXEIRA, R.A. Melhoramento genético vegetal no Brasil: formação de recursos humanos, evolução da base técnico-científica e cenários. Revista Parcerias Estratégicas, v.14, n.28, p.153-193, 2009.

WILLIAMS J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, v.18, p. 6531-6535, 1990