

Área: Biotecnologia

VARIABILIDADE GENÉTICA DO BANCO DE GERMOPLASMA DE FEIJÃO-CAUPI POR MARCADORES ISSR

Michelli Ferreira dos Santos¹; Massaine Bandeira de Sousa²; Caroline de Jesús Pires²; Kaesel Jackson Damasceno e Silva³; Maurisrael de Moura Rocha³

¹ Bióloga, Doutoranda em Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, RENORBIO, E-mail: michelly_m_santos@yahoo.com.br.

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

³ Engº 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 uma das leguminosas mais consumidas no Norte e Nordeste do Brasil. Atualmente, essa cultura passou a ocupar outros cenários agrícolas e começou a ser cultivada por grandes produtores, com maior adoção de tecnologia. Técnicas moleculares permitem fazer distinção diretamente em nível de DNA, acessar a variabilidade genética dentro de espécies cultivadas e assim identificar a diversidade disponível em bancos de germoplasma. O objetivo desse trabalho foi avaliar a variabilidade genética entre os acessos pertencentes ao Banco de Germoplasma de Feijão-Caupi da Embrapa Meio-Norte, por meio de marcadores ISSR. Foram realizadas extrações de DNA de tecido foliar de 60 genótipos de feijão-caupi e selecionados 5 *primers* de ISSR com melhor polimorfismo, que revelaram um total de 34 bandas, sendo 31 polimórficas (91,18%), observada uma variação de 4 a 9 locos polimórficos e média de 6,2 bandas por *primer*, a matriz de similaridade revelou que o coeficiente de similaridade entre os pares de acessos variou de 0,37 a 0,96 e apresentou média de 0,73, o par mais similar ocorreu entre os indivíduos TE-MNC-304 e TE-MNC-320 e entre TE-MNC-800 e TE-MNC-1030, enquanto o par mais dissimilar foi registrado entre os indivíduos TE-MNC-321 e TE-MNC-597. Os marcadores ISSR possibilitaram a diferenciação genética e o dendrograma permitiu a separação em dez grupos. Os marcadores ISSR foram eficientes em detectar o polimorfismo entre os genótipos estudados.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*, similaridade, polimorfismo.

Introdução

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma das leguminosas mais consumidas no Norte e Nordeste do Brasil, representando importante fonte de proteína, energia, fibras e minerais, além de gerador de emprego e renda (ROCHA, 2009). Até a década de 90 seu cultivo era quase que exclusivo de pequenos e médios agricultores de base familiar. Atualmente, essa cultura passou a ocupar outros cenários agrícolas, em áreas de perímetro irrigado e na safrinha, após a cultura da soja. Com isso começou a ser cultivada por grandes e médios produtores, que adotam tecnologia mais avançada (SOARES et al., 2006).

Nos últimos dez anos, técnicas que permitem fazer distinção diretamente em nível de DNA, como os marcadores moleculares têm permitido acessar a variabilidade genética dentro de espécies cultivadas, assim como identificar a diversidade disponível em bancos de germoplasma (BORÉM, 1998). Os Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) são uma alternativa para a conservação dos recursos genéticos vegetais. A avaliação da

diversidade genética entre os acessos de um BAG resulta em informações sobre potenciais genitores a serem utilizados em programas de melhoramento (NASS, 2007). Neste aspecto, o marcador ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) que se baseia na amplificação de regiões entre sequências microsátélites adjacentes do DNA via PCR (*Polymerase Chain Reaction*), além de não exigir um conhecimento prévio do genoma (GONZALÉZ et al. 2002), apresenta elevado grau de polimorfismo, reprodutibilidade e baixo custo.

Nesse sentido o objetivo desse trabalho foi avaliar a divergência entre os acessos pertencentes ao Banco de Germoplasma de Feijão-Caupi da Embrapa Meio-Norte, por meio de marcadores ISSR.

Material e Métodos

Foram realizadas extrações de DNA de tecido foliar de 60 genótipos de feijão-caupi, provenientes do Banco de Germoplasma 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. μ L⁻¹, para serem usadas nas reações de PCR.

Tabela 1- Tratamentos com os respectivos acessos de feijão-caupi pertencentes ao BAG.

Acessos	Origem	Acessos	Origem	Acessos	Origem
TE-MNC-09	Brasil	TE-MNC-180	Brasil	TE-MNC-310	EUA
TE-MNC-21	EUA	TE-MNC-186	Brasil	TE-MNC-311	EUA
TE-MNC-42	Brasil	TE-MNC-188	Costa Rica	TE-MNC-312	EUA
TE-MNC-44	Brasil	TE-MNC-189	Costa Rica	TE-MNC-313	África do Sul
TE-MNC-53	Brasil	TE-MNC-221	Costa Rica	TE-MNC-316	Não informado
TE-MNC-68	Brasil	TE-MNC-223	Costa Rica	TE-MNC-318	Não informado
TE-MNC-111	EUA	TE-MNC-230	EUA	TE-MNC-319	Não informado
TE-MNC-117	EUA	TE-MNC-237	Brasil	TE-MNC-320	Não informado
TE-MNC-119	Brasil	TE-MNC-243	Brasil	TE-MNC-321	Não informado
TE-MNC-123	Brasil	TE-MNC-258	EUA	TE-MNC-329	Índia
TE-MNC-128	Nigéria	TE-MNC-259	Quênia	TE-MNC-373	Brasil
TE-MNC-133	Não informado	TE-MNC-260	Quênia	TE-MNC-433	Nigéria
TE-MNC-135	Não informado	TE-MNC-263	Nigéria	TE-MNC-490	Brasil
TE-MNC-138	Botsuana	TE-MNC-266	Quênia	TE-MNC-597	Brasil
TE-MNC-143	Brasil	TE-MNC-267	EUA	TE-MNC-752	EUA
TE-MNC-148	África do Sul	TE-MNC-268	EUA	TE-MNC-800	Brasil
TE-MNC-149	África do Sul	TE-MNC-278	Nigéria	TE-MNC-1030	Brasil
TE-MNC-150	EUA	TE-MNC-279	Nigéria	TE-MNC-1034	Brasil
TE-MNC-157	Gana	TE-MNC-289	EUA	TE-MNC-1269	Brasil
TE-MNC-160	Não informado	TE-MNC-304	Nigéria	TE-MNC-1320	EUA

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 μ L, contendo os seguintes componentes: tampão 10X [16,65 mM Tris-HCl, pH 8,0; 83,25 mM KCL; 2,5 mM de MgCl₂ (New England), 0,75 mM de dNTP (Invitrogen), 0,2 μ M de *primer*, 1U de *Taq* DNA *polimerase* (New England), 1 μ L de DNA

genômico (~15 ng) e H₂O ultrapura. As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cyclor (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 pra posterior contagem das bandas.

As bandas dos 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} é similaridade genética entre cada par de indivíduos e N número de pares obtidos.

Resultados e Discussão

Para análise da diversidade genética dos genótipos foram utilizados 5 *primers* ISSR: UBC-810, UBC-888, UBC-856, UBC-828 e UBC-826 com melhor polimorfismo, que revelaram um total de 34 bandas, sendo 31 polimórficas (91,18%) (Tabela 2). Foi observada uma variação de 4 a 9 locos polimórficos e média de 6,2 bandas por *primer*, sendo evidente o polimorfismo entre os genótipos. Xavier et al. (2005) utilizando oito iniciadores RAPD polimórficos obtiveram um total de 48 bandas, mas com uma porcentagem menor de polimorfismo em torno de 30 (62,5%).

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

<i>Primer</i>	Sequencias	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	8
UBC 856	5' ACA CAC ACA CAC ACA CYA 3'	7	7
UBC 828	5' TGT GTG TGT GTG TGT GA 3'	7	7
UBC 826	5' ACA CAC ACA CAC ACA CC 3'	4	2
Total		34	31

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

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 acessos variou de 0,37 a 0,96 a e apresentou média de 0,73, o par mais similar ocorreu entre os indivíduos TE-MNC-304 e TE-MNC-320 e entre TE-MNC-800 e TE-MNC-1030, enquanto o par mais dissimilar foi registrado entre os indivíduos TE-MNC-321 e TE-MNC-597. A importância de índices de dissimilaridade genética é identificar genitores para a obtenção de híbridos com maior efeito heterótico e recomendá-los para cruzamentos (CRUZ & CARNEIRO, 2003).

A representação gráfica das distâncias genéticas foi obtida a partir complemento aritmético dos dados da matriz de similaridade, que foi utilizado para gerar um dendrograma pelo método UPGMA (Figura 1).

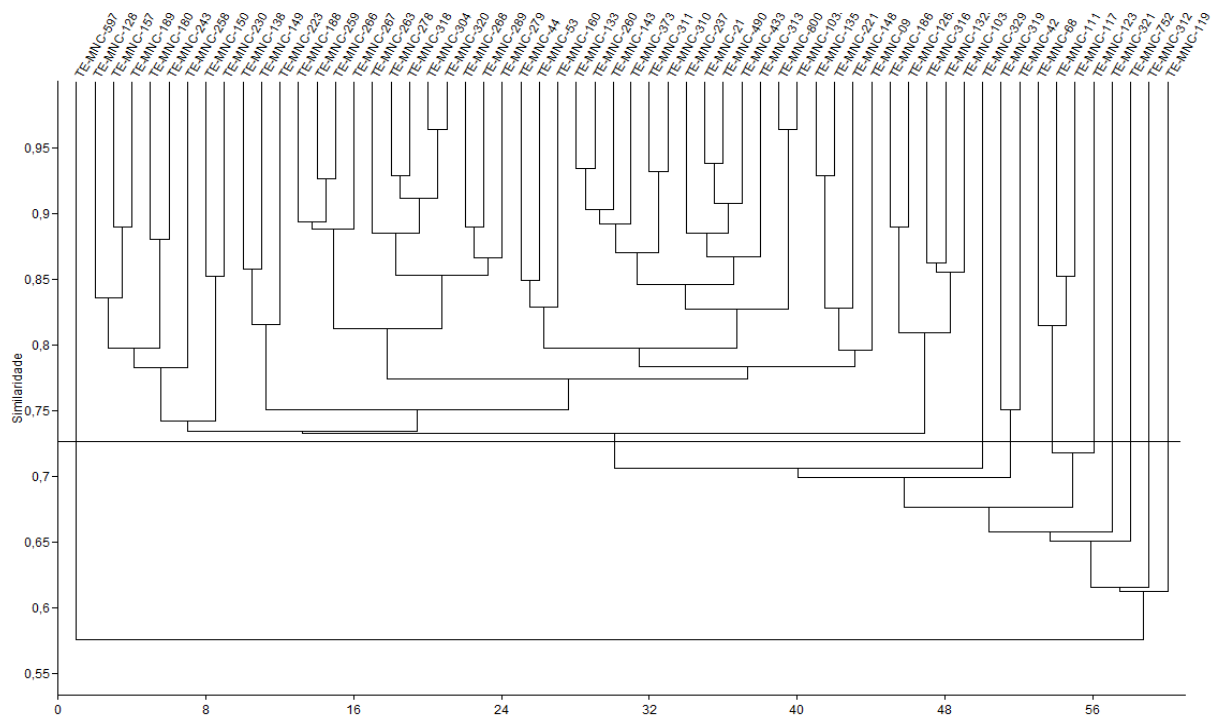


Figura 1 - Dendrograma gerado pelas similaridades genéticas entre os 60 genótipos de feijão-caupi, utilizando o índice de similaridade de Jaccard, e o método de agrupamento UPGMA.

Os marcadores ISSR possibilitaram a diferenciação genética e o dendrograma permitiu a separação em dez grupos ($dg_m = 0,73$). Houve variabilidade dos genótipos dentro dos países, já que o feijão-caupi é uma cultura extremamente rica em diversidade, embora acessos do mesmo país tenderam a ser agrupados. Acessos da África do Sul e Costa Rica, com uma exceção, pertenceram a grupos diferentes, indicando que estes genótipos tiveram origem distinta dentro dos seus países de origem.

Os dados sugerem que é importante coletar acessos de países distintos, já que houve muita variabilidade entre os países e, em alguns casos, dentro dos países. Estudos de diversidade genética tem sido de grande importância em programas de melhoramento, por fornecerem informações de identificação de genitores que possibilitem grande efeito heterotico (SILVA et al. 2008).

Conclusões

Os acessos de feijão caupi do BAG são divergentes e os marcadores ISSR são eficientes em detectar este polimorfismo, sendo importante o intercâmbio internacional de germoplasma para aumentar a variabilidade do BAG.

Referências

- BOREM, A. Melhoramento de Plantas. 2. ed. Universidade Federal de Viçosa, 453p., 1998.
- CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. Modelos biométricos aplicados ao Melhoramento genético, Viçosa, MG, UFV, 357-434, 2003.
- GONZÁLEZ, A.; COULSON, M.; BRETTELL, R. Development of DNA markers (ISSRs) in mango. Acta Horticulturae, Wageningen, v. 575, p. 139-143, 2002.

- 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, *Invitek*, 2008.
- NASS, L.L. Recursos genéticos vegetais. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 858p.
- ROCHA, M. M. O feijão-caupi para consumo na forma de feijão fresco. 2009. Disponível em: <www.agrosoft.org.br/agropag/212374.htm>. Acesso em: 20 fevereiro 2013.
- SILVA, G. O; PEREIRA, A.S.; SOUZA, V.Q.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C.; BERTAN, I.; NETO, R.F. Importância de caracteres na dissimilaridade de progênies de batata em gerações iniciais de seleção. *Bragantia*, v. 67, n. 01, p. 141-144, 2008.
- SOARES, A. L.; FERREIRA, P.A.A; PEREIRA, J.P.A.R.P.; VALE, H. M. M.; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M.S. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em perdões (MG). I – caupi. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, Viçosa, MG, v. 30, n. 5, p. 795-802, 2006.
- 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.