



ISSN 0104-866X
Dezembro, 2001

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Avanços Tecnológicos no Feijão Caupi

V Reunião Nacional de Pesquisa de Caupi
4 a 7 de dezembro de 2001

Anais

Organizadores:

Francisco Rodrigues Freire Filho
Embrapa Meio-Norte

Valdenir Queiroz Ribeiro
Embrapa Meio-Norte

Aderson Soares de Andrade Júnior
Embrapa Meio-Norte

Edson Alves Bastos
Embrapa Meio-Norte

Embrapa Meio-Norte
Teresina, PI
2001

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Meio-Norte

Av. Duque de Caxias, 5650

Telefone: (86) 225-1141

Fax: (86) 225-1142. E-mail: publ@cpann.embrapa.br.

Caixa Postal 01

CEP 64006-220 Teresina, PI

Tratamento editorial: Lígia Maria Rolim Bandeira

Normalização bibliográfica: Jovita Maria Gomes Oliveira

Capa: Célio Marcos Martins de Oliveira

Tiragem: 600 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação aos direitos autorais (Lei nº 9.610)

CIP - Cotalogação na publicação
Embrapa Meio-Norte

Reunião Nacional de Pesquisa de Caupi, (5.: 2001. Teresina). Anais da 5ª
Reunião Nacional de Caupi [Organização de] Francisco Rodrigues
Freire Filho... [et al.]. Teresina, PI. Embrapa Meio-Norte, 2001.
343 p.; 28 cm - (Embrapa Meio-Norte. Documentos,
ISSN 0104-866X; 56)

1. Caupi, Tecnologia. 2. Feijão de corda - Tecnologia.
I. Freire Filho, Francisco Rodrigues. II Título. III Título: Avanço
Tecnológicos no Feijão Caupi. IV Série.

CDD. 635.6592063-21. ed

©Embrapa 2001

ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)¹

D. S. CIDRACK², M. A. O. ALVES², F. R. FREIRE FILHO³, E. A. FREIRE², B. S. CAVADA⁴ e T. B. GRANGEIRO^{2*}

Resumo - O feijão-de-corda, também conhecido como feijão caupi, é uma leguminosa de subsistência por excelência. No Velho Mundo ela é produzida extensamente na África e na Índia, e no Novo Mundo, principalmente no Nordeste do Brasil. Este trabalho teve como objetivo realizar uma análise da variabilidade genética de oito genótipos de caupi (IT-81D-1069, IT-82D-106 G, IT-87D-939, IT-89KD-845, IT-81D-1073, Au-94-M-OB-816, IT-82D-849 e Princess Ann), usando para isso a determinação do número somático de cromossomos e a amplificação de marcadores moleculares do tipo RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"). As contagens cromossômicas foram realizadas a partir de pontas de raiz, obtidas de sementes em germinação. Marcadores moleculares RAPD foram amplificados por PCR a partir de DNA genômico, usando nove iniciadores decâmicos, de sequência arbitrária. O número diplóide de cromossomos foi de $2n=22$ para todos os genótipos estudados, demonstrando ausência de polimorfismo cromossômico numérico. Entretanto, os iniciadores usados foram capazes de gerar 68 bandas de RAPD, sendo 57 polimórficas. O grau de polimorfismo, semelhante ao encontrado para outros genótipos de *V. unguiculata*, é menor em relação aos valores encontrados para outras culturas.

Palavras-chave: DNA genômico, cromossomos, melhoramento genético.

ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY OF COWPEA (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) GENOTYPES

Abstract - Cowpea is an important food crop widely cultivated in Africa, Asia and in the northeast of Brasil. The aim of this work was to carry out an analysis of the genetic variability of eight cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) genotypes (IT-81D-1069, IT-82D-106 G, IT-87D-939, IT-89KD-845, IT-81D-1073, Au-94-M-OB-816, IT-82D-849 e Princess Ann) by means of chromosome number determination and amplification of RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) molecular markers. Chromosome numbers were determined in root tip cells by the squash technique. RAPD markers were amplified by PCR using genomic DNA as template and 10-mer primers of arbitrary sequences. A somatic chromosome number of $2n=22$ was found in all genotypes. On the other hand, RAPD markers were showed to be polymorphic in these cowpea genotypes with a total of 68 bands being amplified by the nine primers used. The degree of polymorphism found is similar to that found for other *V. unguiculata* genotypes, but it is lower than the values determined for other crops.

Keywords: genomic DNA, chromosomes, plant breeding

Introdução

Os marcadores genéticos morfológicos contribuíram significativamente para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e para a construção dos primeiros mapas genéticos. A utilização desses marcadores em genética e melhoramento iniciou-se junto com o desenvolvimento da pesquisa genética após a I Guerra Mundial. Nessa época, surgiram os primeiros mapas genéticos, como os da *Drosophila*, do milho e do tomateiro (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Phillips & Vasil, 1994).

O advento da tecnologia do DNA recombinante a partir de 1970 possibilitou o desenvolvimento de marcadores genéticos moleculares, baseados no polimorfismo que ocorre naturalmente nas sequências de DNA de regiões codificadoras e não-codificadoras, presentes nos genomas de todos os organismos. Dentre os

¹Parte da monografia de conclusão de curso de graduação do primeiro autor apresentada a UFC

²Depto. de Biologia, UFC, CEP 60.451-970, Fortaleza, CE. E-mails: dscidrack@zipmail.com.br, eder-freire@bol.com.br, thalles@ufc.br*

³Embrapa Meio-Norte, Caixa Postal 01, CEP 64.006-220, Teresina, PI. E-mail: freire@cpamn.embrapa.br.

⁴Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, 60.451-970, Fortaleza, CE. E-mail: bscavada@ufc.br.

*autor para correspondência.

marcadores moleculares que têm sido mais usados no melhoramento genético vegetal, podemos citar o RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism"), o AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism") e o RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"). Mapas genéticos usando marcadores moleculares têm sido construídos para uma série de culturas importantes economicamente, como trigo, milho, amendoim, feijão comum, arroz e soja (Phillips & Vasil, 1994).

Os marcadores moleculares RAPD são baseados na técnica de PCR ("Polymerase Chain Reaction"), descrita inicialmente por Mullis & Faloona (1987), na qual segmentos de DNA são amplificados *in vitro*. No RAPD, segmentos de DNA, que apresentam polimorfismo de tamanho, são amplificados *in vitro*, usando-se iniciadores ("primers") curtos e de seqüência arbitrária, como descrito originalmente e de maneira independente por Williams et al. (1990), Caetano-Anóles et al. (1991) e Welsh & McClelland (1990).

O uso de marcadores moleculares do tipo RAPD objetiva quatro aplicações: a) obtenção de "fingerprints" (impressões digitais) genômicos de indivíduos, variedades e populações; b) análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e banco de germoplasma; c) estudos filogenéticos entre diferentes espécies; e d) construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica e a localização e clonagem de genes de interesse agrônomo (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

O principal objetivo desse trabalho foi realizar uma caracterização citogenética e molecular de genótipos de feijão-de-corda, usando a determinação do número somático de cromossomos e amplificação de marcadores moleculares do tipo RAPD.

Material e Métodos

As sementes quiescentes de oito genótipos de *V. unguiculata* (IT-81D-1069, IT-82D-106 G, IT-87D-939, IT-89KD-845, IT-81D-1073, Au-94-M-OB-816, IT-82D-849 e Princess Ann) utilizadas neste trabalho foram fornecidos pela Embrapa Meio-Norte. As sementes foram estocadas em recipientes fechados, a 4 °C, até serem usadas.

A determinação do número somático de cromossomos dos oito genótipos de caupi foi realizada pelo método de esmagamento, usando-se pontas de raízes de sementes em germinação, como descrito por Guerra (1983).

A extração de DNA genômico foi realizada utilizando-se o detergente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), em uma modificação do método originalmente descrito por Murray & Thompson (1980). Inicialmente, 0,5 g de folhas jovens de cada genótipo foram pulverizadas em presença de nitrogênio líquido, e o pó obtido foi transferido para um tubo tipo Falcon contendo 5 mL do tampão de extração (Tris-HCl 100 mM, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2% (v/v) e 2-mercaptoetanol 0,2 %, pH 8,0). Após 1 hora em banho-maria a 65 °C, a mistura foi extraída pela adição de 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v) e inversão. As duas fases (aquosa e orgânica) foram separadas por centrifugação (2.000 x g, 15 minutos, a temperatura ambiente), a fase aquosa (superior) foi transferida para um tubo limpo e os ácidos nucléicos foram precipitados pela adição de 2/3 do volume de isopropanol 100%. O precipitado obtido foi coletado por centrifugação (500 x g, 2 minutos, a temperatura ambiente) e dissolvido em NaCl 1M. Os ácidos nucléicos foram novamente precipitados com 2,5 volumes de etanol 100%. O precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70 % e dissolvido em 2 mL de tampão TE pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) e mantido a 4 °C para uso posterior. A qualidade das preparações de DNA genômico foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, como descrito por Sambrook et al. (1989). A concentração do DNA nas amostras foi determinada pela medida da absorbância a 260 nm (A_{260}).

Padrões de marcadores RAPD para cada um dos genótipos de caupi foram obtidos por PCR, usando-se nove iniciadores decaméricos do kit F, produzido pela Operon Technologies (USA). As misturas dos reagentes para a PCR foram realizadas em tubos de 0,2 ml, específicos para PCR, da Axygen Scientific (USA). As reações de amplificação foram realizadas em um volume de 25 µl contendo DNA genômico (cerca de 30 ng), Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP 100 µM cada um), oligonucleotídeo 5 pmoles (iniciador) e 0,5 unidades de Taq DNA polimerase (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia). As reações de amplificação foram realizadas usando-se um termociclador PTC-100 (MJ Research Inc., USA), programado para executar 45 ciclos (94 °C por 1 minuto, 36 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos), seguidos de uma extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Os produtos de PCR, gerados por cada um dos iniciadores, foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Sambrook et al., 1989) e a presença ou ausência de cada uma das bandas de DNA visualizadas no gel foi registrada como 1 e 0, respectivamente, de modo a gerar uma matriz binária. Esses dados foram usados para se calcular os coeficientes de similaridade genética de Jaccard (S_j), com auxílio do programa FreeTree, de acordo com a fórmula:

$$S_j = \frac{a}{a+b+c}, \text{ onde}$$

a = presença da banda em ambos os genótipos (número de contagens de concordância do tipo 1 1);

b = presença de banda no genótipo A e ausência em B (número de contagens de discordância do tipo 1 0);

c = ausência de banda no genótipo A e presença em B (número de contagens de discordância do tipo 0 1);

Resultados e Discussão

O número somático de cromossomos encontrado para os oito genótipos de caupi analisados foi de $2n=22$ (Figura 1). Esse mesmo número somático de cromossomos foi obtido por outros autores que realizaram contagens cromossômicas em diversos genótipos de caupi bem como em outras espécies do gênero *Vigna* (Gill & Husaini, 1985, Sharma & Gupta, 1982, Gopinathan & Babu, 1986).

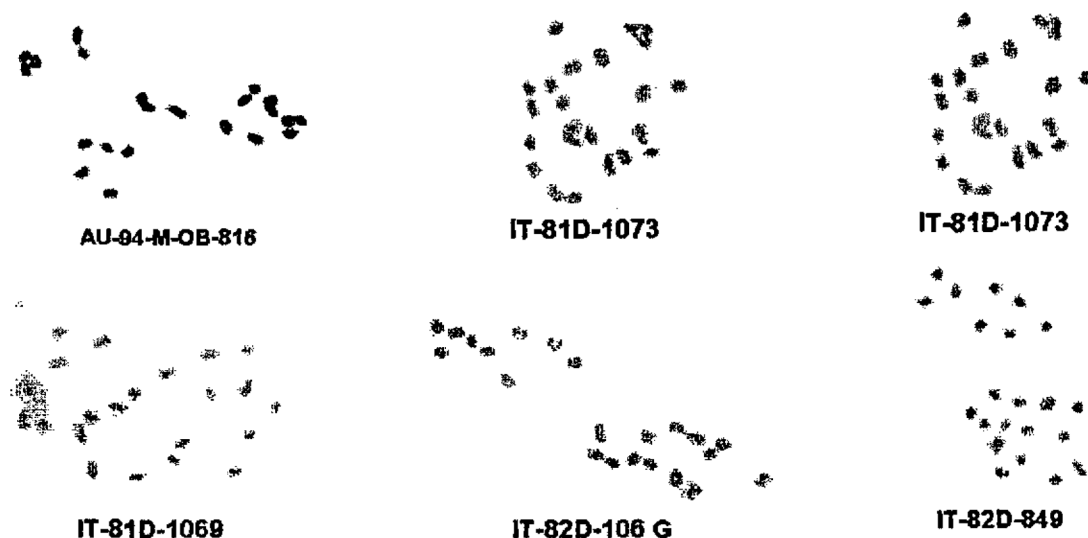


FIGURA 1. Cromossomos metafásicos de alguns genótipos de caupi, obtidos a partir de células da ponta da raiz de sementes em germinação.

Para se analisar o grau de variabilidade genética usando marcadores moleculares RAPD, amostras de DNA genômico foram purificadas de plântulas de cada um dos genótipos de caupi. De acordo com a estimativa realizada pela medida da absorbância a 260nm (A_{260}), a concentração de DNA genômico variou de 83 $\mu\text{g/ml}$ (IT-81D-1069) a 257 $\mu\text{g/ml}$ (IT-82D-849). A razão entre as absorbâncias a 260 nm e a 280nm (A_{260}/A_{280}) das amostras de DNA genômico variou de 1,56 (IT-81D-1073) a 2,00 (IT-81D-1069). De acordo com Sambrook et al. (1989), uma amostra de DNA genômico pode ser considerada livre da contaminação por proteínas se a razão A_{260}/A_{280} for superior a 1,75. Portanto, os resultados obtidos para os oito genótipos de caupi mostraram que as amostras de DNA genômico tinham pouca ou nenhuma contaminação com proteínas, sendo consideradas apropriadas para as ampliações de marcadores RAPD.

A análise eletroforética em gel de agarose 0,8 % das amostras de DNA genômico dos oito genótipos de caupi, revelou uma banda com cerca de 23 kb, sem degradação aparente. Também não foi observada nenhuma contaminação com RNA.

Dos nove iniciadores decaméricos e de seqüência arbitrária (Tabela 1), usados para amplificação de marcadores RAPD a partir das amostras de DNA genômico dos oito genótipos de caupi, todos produziram polimorfismos. O número de bandas amplificadas por iniciador variou de cinco (iniciador OPF-08) a doze (iniciador OPF-03). No total, 68 bandas de DNA foram amplificadas e registradas, o que equivale a uma média de 4,6 por iniciador. Além disso, das 68 bandas amplificadas, 57 foram polimórficas (83,8 %) e 11 foram monomórficas (16,2 %). Três iniciadores produziram apenas bandas polimórficas (OPF -4, OPF-7 e OPF-10).

O grau de similaridade genética entre os genótipos de caupi estudados foi estimado pelo cálculo do coeficiente de Jaccard (Tabela 2). A menor similaridade ($S_j = 0,22$) foi observada entre os genótipos IT-81D 939 e

AU-94-M-OB-816, enquanto que a similaridade mais elevada ($S_j = 0,80$) ocorreu entre os genótipos IT-81D 939 e IT-82D 1069.

O número médio de bandas de RAPD amplificadas por iniciador (4,6), observado no presente trabalho, é muito semelhante ao valor médio de 4,7, encontrado por Li et al. (2001), para o número médio de marcadores do tipo microsatélite, amplificados por PCR, em 90 linhagens de feijão-de-corda, desenvolvidas no Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA). Esse polimorfismo reduzido em relação a marcadores moleculares também tem sido detectado em cultivares de outras espécies do gênero *Vigna*. Por exemplo, Lakhanpaul et al. (2000), estudando a variabilidade genética de 23 cultivares indianos de *V. radiata* por marcadores RAPD, encontraram uma média de 12,7 produtos de amplificação por iniciador. Os autores consideraram esse nível de polimorfismo como sendo de moderado a baixo.

TABELA 1: Sequências de nucleotídeos dos iniciadores utilizados nas reações de amplificação de marcadores moleculares RAPD em genótipos¹ de caupi.

Iniciadores*	Sequência de nucleotídeos (5' para 3')	Número de bandas RAPD geradas
OPF-03	CCT GAT CAC C	12
OPF-04	GGT GAT CAG G	07
OPF-05	CCG AAT TCC C	07
OPF-06	GGG AAT TCG G	07
OPF-07	CCG ATA TCC C	07
OPF-08	GGG ATA TCG G	05
OPF-09	CCA AGC TTC C	06
OPF-10	GGA AGC TTG G	07
OPF-12	ACG GTA CCA G	10

*kit F, Operon Technologies, USA

¹IT-81D-1069, IT-82D-106 G, IT-87D-939, IT-89KD-845, IT-81D-1073, Au-94-M-OB-816, IT-82D-849 e Princess Ann

TABELA 2. Coeficientes de similaridade genética de Jaccard entre os oito genótipos de caupi., determinados a partir de marcadores moleculares RAPD.

	IT-81D 939	IT-81D 1073	IT-82D 106 G	IT-82D 849	IT-82D 1069	AU-94- M-OB- 816	IT-89KD 849	Princess Ann
IT-81D 939	-	0,64912	0,56667	0,72727	0,80702	0,22034	0,74545	0,68519
IT-81D 1073	-	-	0,62264	0,70588	0,75926	0,28000	0,66038	0,69388
IT-82D 106 G	-	-	-	0,64151	0,66667	0,30612	0,60000	0,48214
IT-82D 849	-	-	-	-	0,74545	0,30000	0,67925	0,64706
IT-81D 1069	-	-	-	-	-	0,23729	0,79630	0,76923
AU-94-M-OB-816	-	-	-	-	-	-	0,26923	0,27083
IT-89KD 849	-	-	-	-	-	-	-	0,77083
Princess Ann	-	-	-	-	-	-	-	-

Li et al. (2001) sugeriram que o menor polimorfismo de marcadores minisatélites apresentado por genótipos de caupi, em relação a outras culturas como soja, poderia ser devido a menor diversidade genética das variedades cultivadas. De acordo com alguns autores, o caupi teria sido domesticado apenas uma vez, ao contrário do que ocorreu com o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e o arroz, por exemplo. Desta maneira, a menor diversidade genética dos genótipos cultivados de caupi seria o resultado dessa base genética estreita. Em outras espécies de *Vigna*, como *V. angularis*, estudos usando marcadores moleculares têm demonstrado um maior grau de polimorfismo nas variedades selvagens em relação aos genótipos das variedades cultivadas (Mimura et al., 2000).

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que os nove genótipos de caupi estudados possuem marcadores RAPD polimórficos. O grau de polimorfismo, semelhante ao encontrado para outros genótipos de caupi, é menor em relação aos valores encontrados para outras culturas.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado com recursos da Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). D. S. Cidrack e E. A. Freire são bolsistas de mestrado da FUNCAP e CAPES, respectivamente. Os autores B. S. Cavada e T. B. Grangeiro são bolsistas de produtividade em pesquisa do CNPq.

Referências

- CAETANO-ANOLLES, G.; BASSAM, B. J.; GRESSHOFF, P. M. High resolution DNA amplification fingerprint using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology*, v. 9, p.553-557, 1991.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN, 1995. 220p.
- GILL, L. S.; HUSANI, S. W. H. Cytology of some arborescent Papilionoideae (Leguminosae) of southern Nigeria. *Bol. Soc. Brot. Ser.*, v. 2, n. 58, p. 187-200, 1985.
- GOPINATHAN, M. C.; BABU, C. R. Meiotic studies of the F1 hybrid between rice bean (*Vigna umbellata*) and its wild relative *V. minima*. *Genetica*, v.71, p.115-117, 1986.
- GUERRA, M. dos S. O uso do corante Giemsa na citogenética vegetal - comparação entre a coloração simples e o bandeamento. *Ciência e Cultura*, v. 35, p. 190-193, 1983.
- LAKHANPAUL, S.; CHADHA, S.; BHAT, K.V. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis in Indian mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) cultivars. *Genetica*, v. 109, n. 3, p.227-234, 2000.
- LI, C.D.; FATOKUN, C.A.; UBI, B.; 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.
- MIMURA, M.; YASUDA, K.; YAMAGUCHI, H. RAPD. variation in wild, weedy and cultivated azuki beans in Asia. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v.47, n.6, p.603-610, 2000
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*, v.55, p.335-350, 1987.
- MURRAY, H. G.; THOMPSON, W. F. **Rapid isolation of high molecular weight plant DNA**. *Nucleic Acids Research*, v.8, p.4321-4325, 1980.
- PHILLIPS, R.L.; VASIL, I.K. **DNA-based markers in plants**. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1994. 384p.
- SAMBROOK, J.; FRITCSH, E. F.; MANIAST, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v. 1, p. 63-66.
- SHARMA, P. C.; GUPTA, P. K. Karyotypes in some pulse crops. *Nucleus*, v.25, p.181-185, 1982.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, v.18, p.7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. G.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful RAPD markers. *Nucleic Acids Research*, v.18, p.6531-6535, 1990.