

Área: Biotecnologia

VARIABILIDADE GENÉTICA DE FEIJÃO-CAUPI DE PORTE ERETO E SEMI-ERETO POR MEIO DE MARCADORES ISSR

Massaine Bandeira e Sousa¹; Michelli Ferreira dos Santos²; Carolline de Jesús Pires¹; Kaesel Jackson Damasceno e Silva³; Maurisrael de Moura Rocha³

¹Bióloga, Mestranda, Universidade Federal do Piauí, Bairro Ininga, Teresina - PI.

²Bióloga, Doutoranda, Universidade Federal do Piauí, Bairro Ininga, Teresina-PI.

³Eng^o Agrônomo, Pesquisador, Embrapa Meio-Norte, Av. Duque de Caxias, 5650 Buenos Aires, Teresina-PI. E-mail:

kaesel.damasceno@embrapa.br

Resumo – O feijão-caupi é cultivado em diversas partes do mundo, em consequência da sua importância como fonte de proteína vegetal, por possuir um baixo teor relativo de gordura, além de ser uma rica fonte de minerais e vitaminas. Objetivou-se neste trabalho avaliar a variabilidade genética de genótipos de feijão-caupi de porte ereto e semi-ereto, provenientes do Programa de Melhoramento de Feijão-Caupi da Embrapa Meio-Norte, utilizando marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Foram realizadas extrações de DNA de tecido foliar de 20 genótipos de feijão-caupi. Para análise da diversidade genética foram utilizados os 5 *primers* com melhor polimorfismo. Foram gerados 34 marcadores, sendo 24 polimórficos (70,59%). Foi observada uma variação de 4 a 9 locos polimórficos e média de 4,8 bandas por *primer*. A matriz de similaridade 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 0,48 a 1,0 e apresentou média de 0,74. O par mais similar ocorreu entre os genótipos MNCO3-737F-5-11 e MNCO3-737F-11, enquanto o par mais dissimilar foi registrado entre os genótipos MNCO2-675F-9-3 e MNCO2-683F-1.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*, diversidade genética, coeficiente de Jaccard.

Introdução

O feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] também conhecido como feijão regional, feijão-de-corda ou feijão-de-moita é uma leguminosa que constitui uma das principais alternativas sociais e econômicas de suprimento alimentar e geração de emprego. É cultivado em diversas partes do mundo, em consequência da sua importância como fonte de proteína vegetal, por possuir um baixo teor relativo de gordura, além de ser uma rica fonte de minerais e vitaminas (FREIRE FILHO, 2011).

Diversas técnicas moleculares estão disponíveis para a detecção da variabilidade genética ao nível de sequência de DNA, permitindo a obtenção de um número ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) possuem alta reprodutibilidade e são rápidos e fáceis de trabalhar além de gerarem uma grande quantidade de fragmentos polimórficos. O grande número de fragmentos gerados por uma PCR usando esses marcadores pode auxiliar no processo de exploração da variabilidade genética de uma espécie.

Este trabalho teve como objetivo determinar a variabilidade genética entre 20 genótipos de feijão-caupi de porte ereto e semi-ereto, por meio de marcadores ISSR, visando à formação de grupos baseados em similaridade genética.

Material e Métodos

Foram realizadas extrações de DNA de tecido foliar de 20 genótipos de feijão-caupi de porte ereto e semi-ereto, provenientes do Programa de Melhoramento de Feijão-Caupi da Embrapa Meio-Norte (Tabela 1).

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

Genótipo	Porte	Parentais/Procedência
MNC02-675F-4-9	Semi-ereto	TE97-309G-24 X TE96-406-2E-28-2
MNC02-675F-4-2	Semi-ereto	TE97-309G-24 X TE96-406-2E-28-2
MNC02-675F-9-2	Semi-ereto	TE97-309G-24 X TE96-406-2E-28-2
MNC02-675F-9-3	Semi-ereto	TE97-309G-24 X TE96-406-2E-28-2
MNC02-676F-3	Semi-ereto	TE97-309G-24 X EVx91-2E-2
MNC02-682F-2-6	Semi-ereto	TE96-282-226 X MNC00-519-7-1-1
MNC02-683F-1	Semi-ereto	BR9-LONGÁ X TE96-282-22G
MNC02-684F-5-6	Semi-ereto	TE96-282-22G X TE96-406-2E-28-2
MNC03-725F-3	Semi-ereto	MNC01-627D-65-1XTE99-499-1F2-1
MNC03-736F-7	Semi-ereto	(TE97-309G-24 X IT90N-284-2) X TE96-282-22G
MNC03-737F-5-1	Semi-ereto	TE96-282-22G X IT81D-1332
MNC03-737F-5-4	Semi-ereto	TE96-282-22G X IT81D-1332
MNC03-737F-5-9	Semi-ereto	TE96-282-22G X IT81D-1332
MNC03-737F-5-10	Semi-ereto	TE96-282-22G X IT81D-1332
MNC03-737F-5-11	Semi-ereto	TE96-282-22G X IT81D-1332
MNC03-737F-11	Semi-ereto	TE96-282-22G X IT81D-1332
BRS-Tumucumaque	Ereto	TE96-282-22G X IT87D-611-3
BRS-Cauamé	Ereto	TE93-210-13F X TE96-282-22G
BRS-Itaim	Ereto	MNC01-625E-10-1-2-5 X MNC99-544D-10-1-2-2
BRS-Guariba	Ereto	IT85-2687 X TE87-98-8G

A extração do DNA foi realizada obedecendo-se as recomendações dos kits de purificação Invitek (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 água de PCR, na concentração de 15 ng.μL⁻¹, para serem usadas nas reações de PCR.

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) com modificações. O volume final utilizado nas reações foi de 10 KL, 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 μM de *primer*, 1U de *Taq* DNA polimerase (New England), 1 KL de DNA genômico (~15 ng) e H₂O 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 dos fragmentos amplificados ao acaso foram codificadas como caracteres binários, 0 e 1, correspondendo à 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} corresponde à similaridade genética entre cada par de indivíduos e N é o número de pares obtidos.

Resultados e Discussão

Os *primers* ISSR: UBC-810, UBC-888, UBC-856, UBC-828 e UBC-826 revelaram-se polimórficos para os 20 acessos de feijão-caupi avaliados e foram selecionados para análises de variabilidade genética na espécie. Foram gerados 34 marcadores, sendo 24 polimórficos (70,59%) (Tabela 2). Foi observada uma variação de 4 a 9 locos polimórficos e média de 4,8 bandas por *primer*.

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	6
UBC 888	5' BDB CAC ACA CAC ACA CA 3'	9	9
UBC 856	5' ACA CAC ACA CAC ACA CYA 3'	7	4
UBC 828	5' TGT GTG TGT GTG TGT GA 3'	7	4
UBC 826	5' ACA CAC ACA CAC ACA CC 3'	4	1
Total		34	24

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

Xavier et al. (2005), estudando a variabilidade genética em acessos de feijão-caupi por meio de marcadores RAPD, obtiveram um total de 48 bandas, sendo 30 polimórficas e o número de bandas variando entre três e nove.

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 0,48 a 1,0 e apresentou média de 0,74. O par mais similar ocorreu entre os genótipos MNCO3-737F-5-11 e MNCO3-737F-11, enquanto o par mais dissimilar foi registrado entre os genótipos MNCO2-675F-9-3 e MNCO2-683F-1.

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

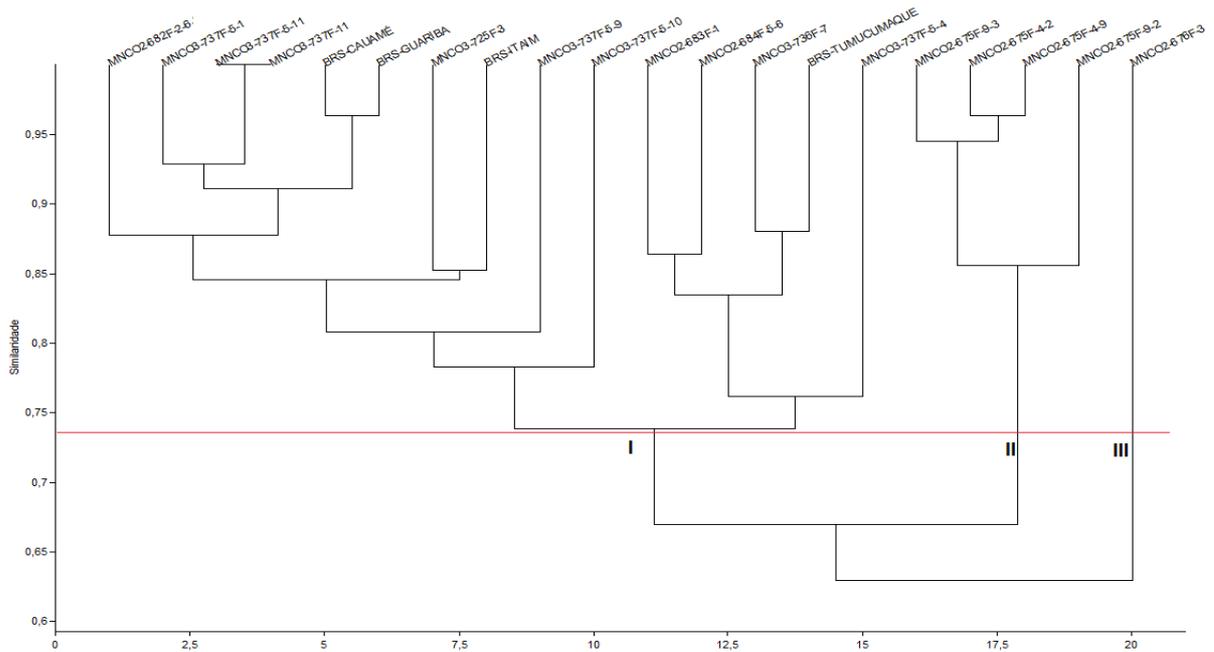


Figura 1 - Dendrograma gerado pelas similaridades genéticas entre os 20 genótipos de feijão-caupi utilizando o índice de similaridade de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA.

A análise de agrupamento permitiu a divisão dos 20 genótipos de feijão-caupi em três grupos. O grupo I foi formado pela maioria dos genótipos, englobando genótipos de porte ereto e semi-ereto. O grupo II agrupou os genótipos de porte semi-ereto MNC02-675F-4-9, MNC02-675F-4-2, MNC02-675F-9-2 e MNC02-675F-9-3 por serem descendentes dos parentais TE97-309G-24 e TE96-406-2E-28-2. O genótipo MNC02-676F-3 apareceu isolado no grupo III, provavelmente por apresentar um parental distinto dos demais genótipos.

Conclusões

O polimorfismo identificado nos *primers* selecionados demonstra haver variabilidade genética entre os genótipos de feijão-caupi do Programa de Melhoramento da Embrapa Meio-Norte. Os genótipos mais similares são MNC03-737F-5-11 e MNC03-737F-11 e os mais dissimilares são os genótipos MNC02-675F-9-3 e MNC02-683F-1.

Referências

- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998, 220 p.
- FREIRE FILHO, F. R. Produção, melhoramento genético e potencialidades do feijão-caupi no Brasil. In: IV Reunião de Biofortificação no Brasil. Anais... Embrapa Meio-Norte, Teresina, 2011.
- 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.
- INVISORB. Spin Mini Kit for DNA extractions, *Invitex*, 2008.
- 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. 04, p. 353-359, 2005.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.K.; LIVAK, J.L.; RAFASLA, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, v. 18, p. 6531-5, 1990.