

ANÁLISE DE DIVERSIDADE EM GENÓTIPOS DE FEIJÃO-CAUPI DO PROGRAMA DE MELHORAMENTO DA EMBRAPA MEIO-NORTE

Amanda Thamires B. do Nascimento¹; Carolina Basante Silva¹; Monique M. Rodrigues Costa¹; José R. C. Ferreira Neto²; Maurisrael de M. Rocha³, Kaesel J. Damasceno e Silva³; Ederson A. Kido²

¹Bióloga, graduanda, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros S/N, Recife, PE. E-mail: amanda.thamires@live.com

²Pesquisador, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rêgo S/N, Recife, PE.

³Pesquisador, Embrapa Meio-Norte, Av. Duque de Caxias, 5650, Teresina, PI.

Resumo – O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] se constitui em um dos principais componentes da dieta alimentar nas regiões Nordeste e Norte do Brasil, principalmente na zona rural, pois é pouco exigente em fertilidade de solos e apresenta certa tolerância a altas temperaturas e à seca. Seu melhoramento genético, no entanto, se faz necessário, em razão da produtividade ainda pequena quando comparada com o feijão comum. Neste contexto, marcadores moleculares podem ser de grande valia, quando usados como ferramentas no estudo da variabilidade genética dentro e entre espécies distintas, sendo essa informação de grande relevância para os programas de melhoramento. Dentre os diferentes tipos de marcadores existentes, os microssatélites (ou SSR, *Simple Sequence Repeats*) são uns dos mais utilizados devido ao seu alto potencial polimórfico e herança co-dominante. O objetivo do presente estudo foi verificar a variabilidade genética a partir de 39 genótipos, dentre materiais elite e em desenvolvimento de feijão-caupi oriundos e/ou utilizados no programa de melhoramento da EMBRAPA MEIO-NORTE, a partir de marcadores moleculares do tipo SSR. Em decorrência de dendograma gerado, a partir de 20 *primers* SSR, foi possível visualizar a formação de basicamente três grandes grupos, em contraste com um genótipo (BRS-Itaim) que permaneceu isolado em relação aos grupos citados, revelando sua acentuada divergência em relação ao *pool* gênico aqui avaliado. A associação de marcadores moleculares com características morfológicas desejadas, em uma análise conjunta, possibilitará a realização de escolhas de materiais mais promissores para os diferentes propósitos dos programas de melhoramento genético.

Palavras-chave: variabilidade genética, germoplasma, melhoramento genético

Introdução

O elevado valor nutritivo, ao nível proteico e energético, faz com que o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) se constitua em um dos principais componentes da dieta alimentar humana, principalmente nas regiões Nordeste e Norte do Brasil. Nosso país é o segundo maior produtor dessa leguminosa, cultivada predominantemente na região Nordeste e em pequenas áreas na região Norte, com penetração também, recente, na região Centro-Oeste. É considerada uma cultura extremamente rústica, pouco exigente em fertilidade de solos, com certa tolerância a altas temperaturas e à seca. Características valiosas para a agricultura. Devido à sua importância, a disponibilidade contínua de ferramentas para aplicação nos programas de melhoramento, abrangendo as mais diversas áreas, é imperativa. Marcadores moleculares podem ser empregados nestes programas de melhoramento, para atividades que vão desde análises de diversidade à seleção assistida por marcadores. Em termos de diversidade, o emprego dessas ferramentas possibilita a avaliação do *pool* gênico inter e intraespecificamente, contribuindo para evidenciar suas similaridades e diferenças. Tal

informação é de grande relevância, uma vez que a diversidade genética é a força motriz dos programas de melhoramento genético.

Dentre os diversos tipos de marcadores, os microssatélites ou SSRs (*Single Sequence Repeats*) são uns dos mais informativos. Tais marcadores se valem da variação em número de repetições de sequências (motivos compostos por dois a seis nucleotídeos), dispostas em série ou *tandem* (ex: AGAGAGAGAGAGAGA). Esses marcadores, de ampla distribuição nos genomas de eucariotos, amostrando regiões altamente polimórficas, apresentam herança co-dominante. Essas características tornam os SSR em uma das melhores opções para uso em estudos de diversidade e mapeamento genético. O objetivo do presente estudo foi verificar a diversidade genética existente em um grupo de 39 genótipos de feijão-caupi, dentre materiais elite e em desenvolvimento, oriundos e/ou utilizados em programas de melhoramento da EMBRAPA MEIO-NORTE, através de marcadores SSR.

Material e Métodos

1. Material Biológico e extração de DNA

Os 39 genótipos de feijão-caupi, oriundos do programa de melhoramento da EMBRAPA Meio-Norte, foram cultivados em casa de vegetação (Depto. de Genética, UFPE), por 30 dias. Após esse período, folhas foram coletadas e rapidamente congeladas em nitrogênio líquido, sendo estocadas em *freezer* (-80° C) até extração do DNA, o qual foi realizado de acordo com o método CTAB (DOYLE e DOYLE, 1987).

2. Desenvolvimento de marcadores moleculares SSR e construção de dendograma

Marcadores moleculares SSR foram desenvolvidos a partir de conjunto de 27 pares de *primers* SSR desenhados de sequências expressas (ESTs) de feijão-caupi, com um número mínimo de 9 e 6 repetições, respectivamente, para motivos de di e trinucleotídeos, sendo estes *primers* desenhados com ajuda da ferramenta *Primer3* (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) e seus parâmetros padrões, exceto para variação de conteúdo GC (40 a 70%, com ótimo de 50%), extensão (18 a 24 pb, com ótimo de 20 pb) e tamanho esperado do *amplicon* de, no máximo, 500 pb. As reações de PCR tiveram volume total de 20 µL, contendo 20 ng de DNA genômico, tampão de PCR 1 X (Fermentas[®]), 1,5 mM de MgCl₂, 100 µM de dNTPs, 0,15 µM de cada *primer* e 0,5 U de Taq DNA polimerase (Fermentas[®]), com desnaturação inicial de cinco min, a 95° C, seguida de 30 ciclos de 60 s a 95° C, 60 s a 54° C e 60 s a 72° C, e extensão final de 10 min a 72° C. Ao final, as amostras foram misturadas com igual volume de tampão de carregamento (formamida contendo 10 mM de EDTA e traços de xileno cianol e azul de bromofenol) e desnaturadas (95°C, por cinco min). Os fragmentos amplificados foram separados em eletroforese (2h 30 min, 60 W), em gel de acrilamida 7 % (p/v) em condição desnaturante (7 M de uréia), após pré-corrída do gel (20 min, 60 W), sendo a visualização dos *amplicons* realizada após coloração com solução de nitrato de prata, conforme descrito por Bassam *et al.* (1991). Polimorfismos foram analisados com ajuda do *software* POPGENE (ver. 3.5) para geração de dendograma e estimativas de distância genética de Nei, usando-se o método UPGMA modificado.

Resultados e Discussão

Os 27 pares de *primers* utilizados flanquearam motivos compreendendo di e trinucleotídeos (Tabela 1). Destes, sete pares, todos para motivos trinucleotídeos, amplificaram somente monomorfismos (Tabela 1) e foram desconsiderados da análise. Os vinte pares restantes apresentaram polimorfismos, tendo amplificado um total de 85 fragmentos de tamanhos variados (em média, de 150 a 750 pares de bases). O número médio de alelos amplificados por par de *primer* foi de quatro, mas variaram de dois a sete (Tabela 1).

Dos 24 pares de *primers* previstos para amplificarem motivos de trinucleotídeos, nove foram desenhados englobando motivo AAT, sendo que um deles só amplificou monomorfismos e oito deles, de dois a seis alelos em segregação (Tabela 1). Os demais motivos, número de repetições encontradas nas ESTs originais de feijão-caupi, que permitiram o desenho de *primers*, bem como o número de alelos observados, podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1. Resumos das características dos SSRs flanqueados pelos *primers* analisados, apresentando os motivos SSR e as composições em bases, número de repetições dos motivos nas ESTs originais de feijão-caupi, números de alelos amplificados nos genótipos analisados, número de pares de *primers* que amplificaram polimorfismos e monomorfismos por motivos SSR.

SSR	Motivo	Repetições do motivo nas ESTs originais	Alelos Observados	Nº de pares de <i>primers</i> com polimorfismos	Nº de pares de <i>primers</i> com monomorfismos
Dinucleotídeo	AT	13-15	2 a 3	2	0
	TA	19	6	1	0
Trinucleotídeo	AAC	10	3 a 7	2	0
	AAT	9 -16	1 a 6	8	1
	AAG	9 -12	1 a 7	2	1
	ACA	8	3	3	0
	TAA	12 -13	1 a 4	1	1
	CTT	8 -12	1	0	3
	GAC	10	1	0	1
	GAT	11	3	1	0
Total				20	7

A partir das leituras dos marcadores polimórficos em segregação foi possível gerar um dendograma, cuja árvore-guia evidenciou três grandes grupos e um genótipo (BRS-Itaim) isolado (Figura 1). Em um estudo anterior, com os mesmos propósitos (determinar a divergência genética entre genótipos de feijão-caupi) e basicamente os mesmos genótipos presentes neste estudo, Pires *et al.* (2012), relataram a formação de dois grandes grupos e o mesmo genótipo isolado BRS-Itaim, a partir de análises de variáveis multicatóricas de 40 descritores morfológicos, relacionados à flor, vagem, folha, semente, porte e hábito de crescimento da planta, pelo método de agrupamento de Tocher.

Logo, as análises com marcadores moleculares SSR, de modo diferente dos autores acima, expuseram a variabilidade ao nível de DNA dos genótipos, proporcionando uma maior capacidade de distinção entre eles. Desta forma, um primeiro grande grupo (GI; Figura 1) pode ser subdividido em dois subgrupos menores, sendo o subgrupo denominado GI.1 composto por nove acessos, em conjunto aos cultivares BRS-Juruá e BRS-Aracê, ambos de porte semi-ereto e grãos verdes. Um segundo subgrupo (GI.2) foi composto por três acessos em desenvolvimento, em conjunto com os cultivares BR17-Gurguéia e BRS-Marataoã, sendo estes de porte, respectivamente, enramador e semi-prostrado, e ambos de grãos esverdeados. Comparando os componentes do grupo GI formado a partir de marcadores moleculares SSR, esses compreenderam 14 dos 21 genótipos agrupados por Pires *et al.* (2012), por compartilharem descritores morfológicos, com exceção dos cultivares BRS-Juruá e BRS-Aracê.

Em relação ao grupo II (GII), este foi formado por doze acessos em desenvolvimento, em conjunto com os cultivares BRS-Tumucumaque, BRS-Guariba e BRS-Caumé, sendo estes de porte semi-ereto e grãos brancos. Novamente comparando os componentes do grupo, 13 dos 17 genótipos agrupados por descritores morfológicos

(PIRES *et al.*, 2012) permaneceram agrupados, com exceção dos acessos MN02-683F-1 e MN02-676F-3. O grupo III (GIII), por sua vez, agrupou seis acessos e o cultivar BRS-Xiquexique (de porte semi-prostrado e grãos brancos), sendo esse grupo composto por cinco genótipos agrupados por descritores morfológicos (PIRES *et al.*, 2012), com exceção dos acessos de MNC03-736F-2 e MNC03-736F-6. Ainda, de modo similar ao encontrado com a análise com descritores morfológicos (PIRES *et al.*, 2012), o cultivar BRS-Itaim, de porte ereto e grão tipo fradinho (tendo como característica um grande halo preto, tegumento rugoso e grãos brancos, subclasse da classe cor branco), mostrou ser o mais divergente geneticamente dos materiais estudados, permanecendo isolado dos demais.

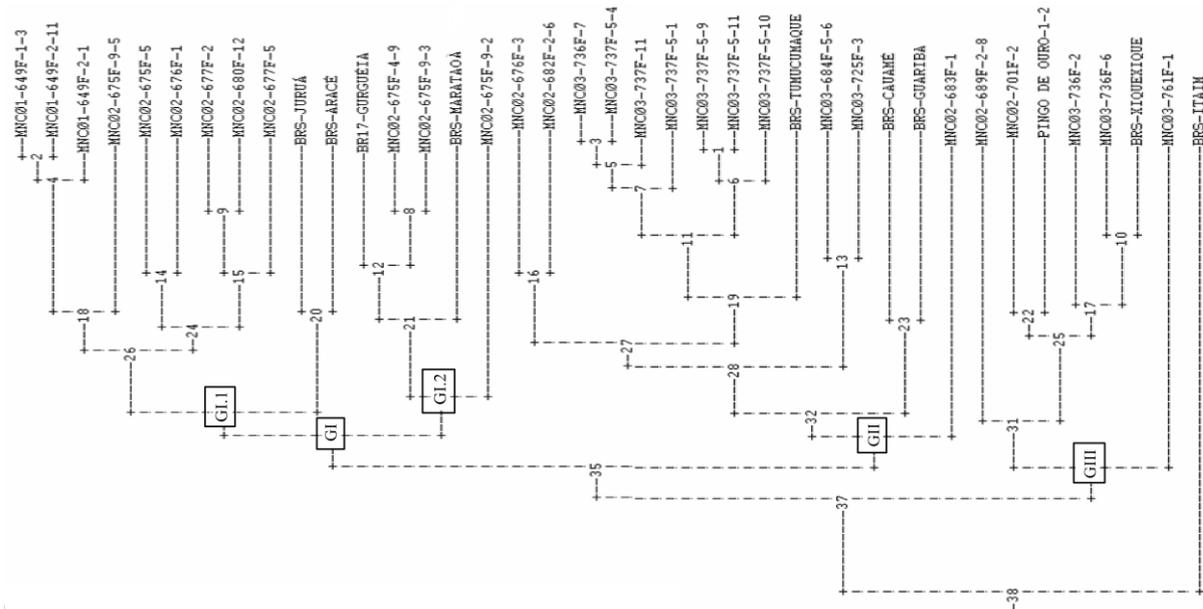


Figura 1. Dendrograma (UPGMA) gerado a partir de 85 marcadores SSR (software POPGENE, ver. 3.5), discriminando 39 genótipos elite do melhoramento de feijão-caupi da Embrapa Meio-Norte.

Conclusões

Os resultados observados no presente estudo mostraram a eficiência dos marcadores moleculares do tipo microsatélites, derivados de ESTs, em amostrar a diversidade genética, ao discriminar genótipos de feijão-caupi anteriormente agrupados por descritores morfológicos. Ao mesmo tempo, a análise permitiu que genótipos em desenvolvimento fossem agrupados com cultivares comerciais disponíveis aos produtores. Desta forma, a análise genética poderia ajudar na identificação de genótipos que pudessem ser úteis nos programas de melhoramento, considerando não somente os descritores morfológicos, mas as diferenças genéticas entre os materiais em questão.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Embrapa Meio-Norte, em especial à equipe de melhoristas do Programa de Melhoramento Genético do Feijão-caupi.

Referências

BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.E.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, v.196, n.1, p.80-83, 1991.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v.19, n.1, p.11-15, 1987.

PIRES, C.J.; SOUSA, M.B.; SILVA, J.D.L.; SOUSA, C.M.B.; LOPES, A.C.A.; SILVA, K.J.D.; ROCHA, M.M.; NEVES, A.C.D. Divergência genética entre acessos de feijão-caupi pertencentes ao banco ativo de germoplasma da Embrapa Meio-Norte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2012, Belém, PA. Anais... Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2012.