

AValiação DA VARIABILIDADE GENÉTICA DOS GENÓTIPOS DO FEIJÃO CAUPI VIA MARCADORES MOLECULARES ISSR ¹

EVALUATION OF THE GENETIC VARIABILITY OF THE COWPEA BEAN GENOTYPES VIA ISSR MOLECULAR MARKERS

Layra Cortes da Silva²

Ana Paula Candido Gabriel Berilli³

RESUMO: O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é uma cultura de grande importância socioeconômica e apresenta alta variabilidade genética, que está presente nos diferentes genótipos cultivados no país. Marcadores moleculares possibilitam fazer a diferenciação a nível de DNA, acessando a variabilidade genética e identificando a diversidade disponível em espécies cultivadas. O objetivo do trabalho foi verificar a distância genética de diferentes genótipos do feijão-caupi através de marcadores moleculares do tipo ISSR para potencializar a seleção de genótipos superiores com base nos dados agronômicos. Para tanto, foram realizadas extrações de DNA de tecido foliar de 9 genótipos de feijão-caupi e utilizados 17 iniciadores de ISSR que revelaram um total de 801 bandas, sendo 305 polimórficas (38,07%). Pela análise de agrupamento os genótipos 2 e 4 apresentaram o maior grau de dissimilaridade entre os avaliados. Os marcadores ISSR foram eficientes em detectar o polimorfismo entre os genótipos de feijão-caupi.

Palavras-chave: Marcadores ISSR; *Vigna unguiculata*; Divergência genética.

ABSTRACT: Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) is a crop of great socioeconomic importance and presents high genetic variability, which is present in the different genotypes cultivated in the country. Molecular markers make it possible to differentiate at the DNA level, accessing genetic variability and identifying the diversity available in cultivated species. The objective of this work was to verify the genetic distance of different genotypes of cowpea using molecular markers of the ISSR type to enhance the selection of superior genotypes based on agronomic data. For that, DNA extractions were performed from leaf tissue of 9 cowpea genotypes and 17 ISSR primers were used, which revealed a total of 801 bands, 305 of which were polymorphic (38.07%). By cluster analysis, genotypes 2 and 4 showed the highest degree of dissimilarity among the evaluated. ISSR markers were efficient in detecting polymorphism between cowpea genotypes.

Keywords: ISSR markers; *Vigna unguiculata*; Genetic divergence.

¹ Trabalho Conclusão de Curso da Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas do Ifes Campus de Alegre.

² Graduanda do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas. E-mail: corteslayra@gmail.com

³ Professora do Ifes Campus de Alegre. E-mail: anapaulacg@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é uma leguminosa de origem africana amplamente cultivada ao redor do mundo, podendo ser comercializada na forma de grãos secos, grãos imaturos, farinha e sementes (SILVA et al., 2018). No Brasil, de acordo com a região, a espécie pode ser conhecida como feijão-de-corda, feijão-macassar, feijão de estrada, feijão miúdo, feijão catador e manteiguinha (FREIRE FILHO, 2011)

Sua classificação botânica o descreve como uma planta Dicotiledônea pertencente a ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseolae, subtribo Phaseolineae, gênero *Vigna*, subgênero *Vigna*, secção Catyang, espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. e subespécie *unguiculata*, que é subdividida em quatro cultigrupos: *Unguiculata*, *Sesquipedalis*, *Biflora* e *Textilis* (ALLANTOSPERMUM, 2016). Todavia, no Brasil, um dos mais cultivados é o *Unguiculata*, principalmente, para a produção de grãos secos e verdes (FREIRE FILHO, 2011).

Por ser uma cultura rústica e de ciclo curto, o feijão-caupi pode ser semeado em regiões de clima quente e pouca disponibilidade hídrica, sendo adaptada a solos de várzea e de terra firme, além de se desenvolver em solos de baixa a alta fertilidade (DE OLIVEIRA et al., 2019). Possui um elevado teor de proteínas, constituindo um dos principais componentes da dieta alimentar nas regiões norte e nordeste, particularmente na zona rural (SILVA et al., 2018). Mas, com o desenvolvimento de novas tecnologias que favorecem o cultivo mecanizado, a região Centro-Oeste vem crescendo neste segmento (BASTOS, 2016).

No contexto de região e produção agrícola anteriormente exposto, o feijão caupi no nordeste brasileiro é uma das culturas de subsistência mais exploradas, que se objetivam em garantir a segurança alimentar da população e que são incentivados nos programas sociais, pois além de apresentar muita importância na base alimentar dos moradores da região gera também na zona rural e urbana, emprego e renda (CÂMARA, 2020). Porém, são poucos os estudos referentes a cultura.

Investigar a variabilidade genética nos diferentes genótipos de feijão-caupi cultivados no país é importante, principalmente para selecionar linhagens mais adaptadas às condições climáticas das regiões em diferentes localidades (CORREA

et al., 2015; ARAUJO, 2019). Os primeiros marcadores genéticos tradicionalmente utilizados na caracterização de genótipos são os marcadores morfológicos, por apresentarem características herdáveis, visíveis e determináveis, que podem ser expressos em qualquer ambiente, selecionando as características desejáveis para cruzamentos (IPGRI, 1996; OLIVERIA et al., 2021). Entretanto, apresentam algumas limitações como o número reduzido de marcadores disponíveis, insuficiência de ligação com caracteres de importância econômica e efeitos deletérios das mutações (GUIMARÃES; MOREIRA, 1999).

Por definição, os marcadores moleculares são segmentos de DNA ligados a locos responsáveis pela determinação de características de interesse (TOPPA et al., 2013). Para a caracterização de genótipos os marcadores moleculares possuem destaque especial por não sofrerem influência do ambiente e serem mais reproduzíveis e estáveis, além de determinar de forma precisa as relações genéticas entre genótipos, ao contrário de outros marcadores (SCHUSTER et al., 2004; SOLLER et al., 1983). Várias técnicas envolvendo marcadores moleculares têm sido empregadas no estudo dos recursos genéticos vegetais, se tratando do feijão-caupi, os marcadores ISSR são um dos mais utilizados. Através de marcadores dominantes como os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) consegue-se obter dados importantes como estimativas de distâncias genéticas entre acessos (CORREIA et al., 2010).

Os marcadores ISSR apresentam ampla utilização por gerarem alto conteúdo de informação genética e serem altamente polimórficos em populações de plantas e possuírem menor custo (ALMEIDA et al., 2009; WANG et al., 2009). Com o estudo da diversidade genética, torna-se possível identificar as melhores combinações híbridas de maior efeito heterótico e maior heterozigose para a aquisição de genótipos superiores, distinguindo indivíduos divergentes e auxiliando na seleção de combinações mais promissoras aos cruzamentos (FALCONER, 1987; CRUZ; REGAZZI, 2001; SANTANA et al., 2019)

Dessa forma, o trabalho objetiva verificar a distância genética dos diferentes genótipos de feijão-caupi, que fazem parte do programa de incentivo ao cultivo de feijão-caupi da Embrapa Meio Norte, selecionando os genótipos mais adaptados às

condições edafoclimáticas da região sul capixaba e recomendar aos agricultores capixabas os melhores materiais genéticos a serem utilizados em suas lavouras.

2 METODOLOGIA

2.1 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

O experimento foi conduzido na área experimental do Instituto Federal do Espírito Santo, município de Alegre, região do Caparaó Capixaba. Constituído por nove cultivares de feijão-caupi, desenvolvidas pela Embrapa Meio-Norte.

A seleção dos iniciadores consistiu de testes preliminares de amplificação utilizando-se vinte iniciadores ISSR. Foram utilizados somente iniciadores que permitiram a obtenção de fragmentos de alta intensidade e reprodutibilidade. Ao fim, os nove genótipos foram avaliados por dezessete iniciadores.

Tabela 1. Identificação dos 9 genótipos de feijão-caupi avaliados por meio de marcadores ISSR.

Tratamento	Cultivar	Subclasse comercial
1	BRS Rouxinol	Sempre-verde
2	BRS Marataoã	Mulato
3	BRS Pajeú	Mulato
4	BRS Paraguaçu	Branco Liso
5	BRS Xiquexique	Branco Liso
6	BRS Guariba	Branco Liso
8	BRS Tumucumaque	Branco Liso
9	BRS Itaim	Fradinho
10	BRS Novaera	Branco Rugoso

Fonte: Embrapa Meio-Norte, Alegre (2022).

As extrações de DNA foram realizadas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do IFES – Campus de Alegre de acordo com o protocolo “mini-prep” de Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações. Após a quantificação as amostras de DNA foram armazenadas em freezer. As reações de ISSR foram preparadas para um volume total de 15 µL contendo 10 mg/µL de DNA molde, 2,5 mM de cada dNTP, 1,4 µL de H₂O, 50 mM de MgCl₂, 1X PCR Buffer, 4,0 mM do iniciador e 5,0 unidade da enzima Tag DNA Polimerase (Invitrogen).

Figura 1. Área experimental localizada no Instituto Federal do Espírito Santo, município de Alegre.



Fonte: a autora (2022)

Inicialmente, foram testadas as condições de temperatura de anelamento das reações. Após os testes, as condições de PCR utilizadas foram: 4 minutos a 94°C (desnaturação inicial), seguindo-se de 35 ciclos de desnaturação (94°C por 1 minuto), anelamento (45-50°C, dependendo do iniciador, por 2 minutos) e extensão (72°C por 7 minutos) seguindo-se de uma etapa de extensão final (24°C em ciclo infinito). Todas as reações de PCR foram realizadas em termociclador SimpliAmp (Applied Biosystems). Os produtos amplificados foram separados em gel de poli-acrilamida 1% corados com brometo de etídeo (0,5 µg µL⁻¹) e submetidos a 180 volts por 2 horas. Posteriormente, os géis foram visualizados sob luz UV e fotografados em fotodocumentador.

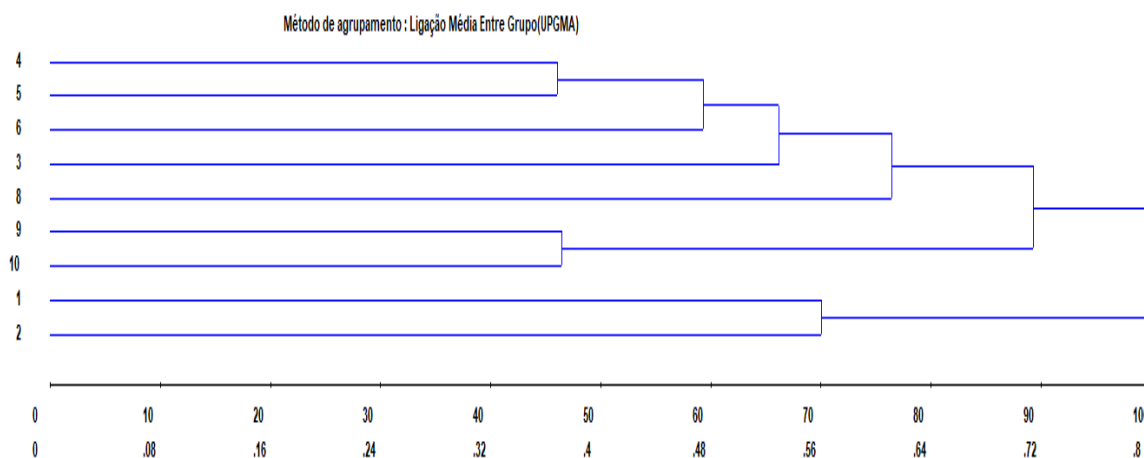
2.3 ANÁLISE DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA

Foi feita uma planilha de dados com informações referentes a avaliação visual da presença e ausência de bandas de cada iniciador para cada um dos genótipos. Em seguida, os dados foram usados para a construção de uma matriz de similaridade genética onde foi utilizado o coeficiente de similaridade de Jaccard, estimado de acordo com a expressão, a seguir:

Dias et al. (2015) trabalhando com feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce obteve 47 bandas polimórficas, tendo uma média polimorfismo de 75,81%, a partir da utilização de nove iniciadores ISSR. Já Dos Santos et al. (2013) ao trabalhar com 20 variedades de porte prostrado e semiprostrado de feijão-caupi utilizando cinco iniciadores obteve 27 marcas polimórficas, encontrando uma taxa de polimorfismo de 79,41%, similar ao de Araújo (2017) ao caracterizar 57 variedades tradicionais de feijão-caupi que apresentaram 76,25% de polimorfismo. Isso indica que os marcadores ISSR conseguem com boa eficiência identificar variabilidade genética na cultura do feijão-caupi, podendo ser recomendados para futuros estudos.

A representação gráfica das distâncias genéticas foi realizada a partir dos dados da matriz de similaridade, gerando um dendrograma pelo método UPGMA, representado na figura 1.

Figura 2. Dendrograma gerado pelas similaridades genéticas entre os 9 genótipos de feijão-caupi, utilizando o índice de similaridade de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA.



Fonte: a autora (2022).

Os marcadores permitiram a distinção genética, possibilitando a separação no dendrograma em dois grupos, um deles contendo os genótipos 1 e 2, e o outro grupo contendo os acessos 3, 4, 5, 6, 8, 9 e 10, que apresentam maior similaridade genética entre si. Os genótipos isolados presentes nesses grupos são as que apresentam maior distância genética em relação aos outros, se destacando os

genótipos 2 como sendo o mais divergente em relação ao genótipo 4 e os genótipos 1 e 2 com maior similaridade.

Importante destacar que quanto mais altas são as distâncias encontradas, mais promissores são os indicadores de maior variabilidade entre os genótipos, dessa maneira as possíveis combinações podem ser sugeridas como genitores para constituir uma população base em programas de melhoramento (SOUSA, 2016; SOUSA et al., 2017). Ou ainda, serem selecionadas para a obtenção de híbridos por meio de cruzamentos entre materiais genéticos elite e contrastantes geneticamente, favorecendo o fenômeno da heterose, mesmo numa espécie autógama.

De acordo com Dias (2009), o cruzamento de genótipos muito diferentes é bastante promissor, sendo mais significativos quando demonstram bom desempenho agrônômico. Assim, as combinações entre o genótipo 2 com 4 são consideradas boas opções para cruzamento e obtenção de populações promissoras.

4 CONCLUSÕES

- ✓ Há variabilidade genética entre os genótipos de feijão-caupi avaliados neste trabalho;
- ✓ Os marcadores ISSR são eficientes na identificação da variabilidade genética em feijão-caupi;
- ✓ Os genótipos 2 (BRS Marataoã) e 4 (BRS Paraguaçu) apresentaram a maior distância entre os genótipos avaliados, enquanto o 1 (BRS Rouxinol) e 2 (BRS Marataoã) a maior similaridade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Instituto Federal do Espírito Santo - Campus de Alegre, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, a família, amigos e a todos que estiveram envolvidos tornando possível a minha formação.

REFERÊNCIAS

ARAUJO, K. C. **Avaliação de linhagens melhoradas de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) na região noroeste fluminense para estudo de valor de cultivo.** 2019. 98 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2019.

ARAÚJO, Linda Brenna Ribeiro. Potencial genético de variedades tradicionais de feijão-caupi e avaliação para resistência à murcha-de-Fusarium. 2017.

BASTOS, E. A. A Cultura do feijão-caupi no Brasil. **Embrapa Meio-Norte-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 2016.

CÂMARA, Andressa de Oliveira et al. Zoneamento agroclimático de culturas de subsistência em região semiárida. 2020.

CORREA, Agenor Martinho et al. Variabilidade genética e correlações entre caracteres de feijão-caupi. **Revista Agro@ mbiente On-line**, v. 9, n. 1, p. 42-47, 2015.

CORREIA, C. N. et al. Diversidade genética em feijao-caupi de porte ereto e prostrado para seleção de genitores via marcadores moleculares EST-SSR. 62a Reunião Anual da SBPC. Ciências do mar: herança para o futuro. **Anais...Natal, RN:** 2010.

CRUZ, Cosme Damião. Genes Software-extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, p. 547-552, 2016.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. rev Viçosa. **UFV, Imprensa Universitária**, 390p, 2001.

DE OLIVEIRA, I. J. et al. Recomendações técnicas para o cultivo de feijão-caupi no Estado do Amazonas. **Embrapa Amazônia Ocidental-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2019.

DIAS, Francisco Tiago Cunha et al. Variabilidade genética de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce analisada por marcadores RAPD e ISSR. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, p. 563-572, 2015.

DIAS, Francisco Tiago Cunha. Utilização de técnicas multivariadas e moleculares na caracterização e seleção de genótipos de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce. 2009.

DOS SANTOS, Michelli Ferreira et al. Variabilidade genética de feijão-caupi de porte prostrado e semi-prostrado por marcadores ISSR. 2013

DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13–15, 1990.

FREIRE FILHO, Francisco Rodrigues et al. Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. 2011.

FALCONER, D. S. Introdução à genética quantitativa. 279 p. **Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil**, 1987.

GUIMARÃES, C. T.; MOREIRA, M. A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. **Melhoramento de espécies cultivadas**, 1999.

INTERNATIONAL COOPERATION CENTRE OF AGRICULTURAL RESEARCH FOR DEVELOPMENT. **Descriptors for banana (Musa spp.)**. Internat. Plant Genetic Resources Inst., 1996.

OLIVEIRA, Altacis Junior et al. Principais marcadores moleculares. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e562101523633-e562101523633, 2021.

SANTANA, SÉRGIO ROGÉRIO ALVES DE et al. Genetic divergence among cowpea genotypes by morphoagronomic traits. **Revista Caatinga**, v. 32, p. 841-850, 2019.

SCHUSTER, Ivan et al. Determinação da pureza varietal de sementes de soja com o auxílio de marcadores moleculares microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 247-253, 2004.

SILVA, Marina Borges de Oliveira; CARVALHO, Abner José De; BATISTA, Paulo Sérgio Cardoso; SANTOS JÚNIOR, Pedro Velasquez; OLIVEIRA, Simônica Maria De; AL, Et. Desempenho agronômico de genótipos de feijão-caupi. **Revista de Ciências Agrárias**, [S. l.], v. 41, n. 4, p. 1059–1066, 2018.

SOLLER, M.; BECKMANN, J. S. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 67, n. 1, p. 25-33, 1983.

SOUSA, Sérgio et al. Divergência genética de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) no sul do Tocantins. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. 2, p. 419-429, 2017.

SOUSA, Sérgio Alves de. Divergência genética e capacidade combinatória de feijão-caupi. 2016.

TOPPA, Eder Victor Braganti; JADOSKI, Cléber Junior. O uso de marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 1, p. 1-5, 2013.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
INSTITUTO FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CAMPUS ALEGRE

Rodovia BR-482 (Cachoeiro-Alegre), Km 47 – Distrito de Rive - Caixa Postal 47 –
29.500-000 – Alegre – ES - 28 3564-1800

**COORDENAÇÃO DO CURSO SUPERIOR DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS**

**ATA Nº 20/2022, DA DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO –
TCC**

Às nove horas e trinta minutos (09h30m) do dia vinte e nove (29) do mês de novembro do ano de dois mil e vinte e dois (2022), em conferência virtual, compareceu para defesa pública da monografia, requisito obrigatório para a obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas, o(a) acadêmico(a): **Layra Cortes da Silva**, tendo como Título da Monografia: **“Avaliação da variabilidade genética dos genótipos do feijão caupi via marcadores moleculares ISSR”** .

Constituíram a Banca Examinadora:

Professor(a) orientador(a): Ana Paula Candido Gabriel Berilli

Professor examinador: Monique Moreira Moulin

Professor examinador: Julio Cesar Fiorio Vettorazzi

Resultado final do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado:

- Aprovado sem restrições;
- Aprovado com recomendações e correções.
- Aprovado, mas deve refazer e reapresentar o TCC.
- Reprovado.

OBSERVAÇÕES:

_____ Realizar pequenas correções no sentido de melhorar o texto e promover maior qualidade dos dados obtidos.

Eu, Ana Paula Candido Gabriel Berilli (Presidente da Banca Examinadora), lavrei a presente ata que segue assinada por mim e pelos demais membros da Banca Examinadora.

Assinaturas:



Emitido em 29/11/2022

ATA DE DEFESA Nº 1/2022 - ALE-CCLCB (11.02.15.01.08.02.11)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 01/12/2022 16:09)

ANA PAULA CANDIDO GABRIEL BERILLI
PROFESSOR DO ENSINO BASICO TECNICO E TECNOLOGICO
ALE-CCLCB (11.02.15.01.08.02.11)
Matricula: 1812316

(Assinado digitalmente em 29/11/2022 19:10)

MONIQUE MOREIRA MOULIN
PROFESSOR DO ENSINO BASICO TECNICO E TECNOLOGICO
ALE - CBCB (11.02.15.01.08.02.08)
Matricula: 1751408

(Assinado digitalmente em 29/11/2022 18:50)

LAYRA CORTES DA SILVA
DISCENTE
Matricula: 9999306400

(Assinado digitalmente em 30/11/2022 07:44)

JULIO CÉSAR FIORIO VETTORAZZI
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ***.873.947-**

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ifes.edu.br/documentos/> informando seu número: 1, ano: 2022, tipo: ATA DE DEFESA, data de emissão: 29/11/2022 e o código de verificação: 7f0f319b53