

Variabilidade genética de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce analisada por marcadores RAPD e ISSR¹

Genetic variability in early-cycle erect cowpea analysed with RAPD and ISSR markers

Francisco Tiago Cunha Dias^{2*}, Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini³, Ana Paula Moura da Silva² e José Jaime Vasconcelos Cavalcanti⁴

RESUMO - O conhecimento da variabilidade genética é de fundamental importância para a identificação de genótipos superiores no início de um programa de melhoramento genético das culturas em geral. Objetivou-se avaliar a variabilidade genética em 38 genótipos de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce por meio de marcadores RAPD e ISSR. O material foi proveniente do Banco de Germoplasma da Universidade Federal do Ceará e do programa de melhoramento genético de feijão-caupi da Embrapa Meio Norte. As extrações de DNA foram realizadas de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle. Dez iniciadores RAPD geraram 71 bandas polimórficas (88,75%) com 7,1 marcadores por iniciador, já nove iniciadores ISSR produziram 47 bandas polimórficas (75,81%) com 5,22 marcadores por iniciador. Pela análise de agrupamento, o genótipo CE-748 apresentou-se distinto dos demais e os genótipos AU 94-MOB-816 e UCR 95-701 apresentaram o maior grau de similaridade entre os avaliados. Os marcadores RAPD e ISSR foram eficientes em detectar o polimorfismo entre os genótipos de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce.

Palavras chaves: *Vigna unguiculata*. Divergência genética. Iniciadores ISSR.

ABSTRACT - Knowledge of genetic variability is of fundamental importance in the identification of superior genotypes when starting a breeding program for crops in general. The aim was to evaluate genetic variability in 38 genotypes of early-cycle, erect cowpea using RAPD and ISSR markers. The material came from the Germplasm Bank of the Federal University of Ceará and the cowpea breeding program of Embrapa Meio Norte. The DNA extractions were carried out following the Doyle and Doyle protocol. Ten RAPD primers generated 71 polymorphic bands (88.75%) with 7.1 markers per primer, whereas nine ISSR primers produced 47 polymorphic bands (75.81%) with 5.22 markers per primer. With cluster analysis, the EC-748 genotype was seen to be distinct from the others, and the AU 94-MOB-816 and UCR 95-701 genotypes showed the highest degree of similarity among those under evaluation. The RAPD and ISSR markers were efficient in detecting polymorphism between genotypes of early-cycle, erect cowpea.

Key words: *Vigna unguiculata*. Genetic divergence. ISSR primers.

DOI: 10.5935/1806-6690.20150039

*Autor para correspondência

¹Recebido para publicação em 11/02/2014; aprovado em 12/03/2015

Parte da Dissertação do primeiro autor; pesquisa financiada com bolsa de mestrado da CAPES

²Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia/UFC/CCA, Campus do Pici, Blocos 805 e 806, Fortaleza-CE, Brasil, 60.356-000, ftdcdias@gmail.com, anapaula.moura@gmail.com

³Departamento de Fitotecnia/CCA/UFC, Fortaleza-CE, Brasil, candida@ufc.br

⁴Embrapa Algodão, Campina Grande-PB, Brasil, jaimc@cpnpa.embrapa.br

INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma Fabaceae bastante cultivada por pequenos e médios produtores das regiões Norte e Nordeste do Brasil, e mais recentemente por grandes agricultores dessas regiões (XAVIER *et al.*, 2005) e também da região Centro-Oeste. Esses agricultores necessitam de cultivares adequadas à colheita mecanizada e com maturação uniforme, condições obtidas muitas vezes com o melhoramento.

A existência de variabilidade genética e a caracterização de germoplasma tornam-se necessário para o início de um programa de melhoramento genético visando à seleção de genótipos mais adaptados aos novos sistemas de produção. Tradicionalmente, a caracterização dos genótipos é feita baseando-se em marcadores morfológicos, herdáveis, facilmente visíveis e mensuráveis, que, a princípio, são expressos em todos os ambientes (IPGRI, 1996). Um dos grandes problemas da utilização dos marcadores fenotípicos é o número reduzido desses marcadores disponíveis, a ausência de ligação destes com caracteres de importância econômica e os efeitos deletérios das mutações que limitam sua utilização (GUIMARÃES; MOREIRA, 1999). Assim, a seleção de descritores com alta herdabilidade e estáveis são de grande importância para a caracterização genotípica do feijão-caupi.

Nesse sentido, o desenvolvimento dos marcadores moleculares apresenta uma grande contribuição para os estudos da genética de populações e melhoramento genético por tornar possível a análise de cada população, ou indivíduo, de interesse em um pequeno espaço de tempo, sendo possível a utilização de qualquer forma alélica (fragmento de DNA ou a expressão de uma proteína codificada por ele) originada de um genoma como marcador genético (SOUZA JUNIOR, 2001).

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), um marcador molecular é definido como todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondendo a regiões expressas ou não do genoma). Diversas técnicas moleculares estão disponíveis para a avaliação da diversidade genética utilizando-se a sequência de DNA.

Várias técnicas envolvendo marcadores moleculares têm sido empregadas no estudo dos recursos genéticos vegetais. Dentre essas técnicas está o polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP); o polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD); polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) e polimorfismo resultante da presença de diferentes números de elementos simples repetidos detectados por meio de marcadores microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeat). A escolha do marcador molecular depende da reprodutibilidade do marcador e simplicidade da técnica

para obtê-los. Os melhores marcadores para o mapeamento genômico, seleção assistida ou detecção do polimorfismo são os que apresentam baixo custo, facilidade de manipulação e alta reprodutibilidade (BORNET; BRANCHARD, 2001).

Dentre os vários tipos de marcadores moleculares, aqueles ditos como universais são amplamente utilizados em várias espécies vegetais para os mais diversos objetivos, tais como os estudos de divergência genética, filogenia molecular e seleção assistida. Entre estes os marcadores RAPD se baseiam na amplificação do DNA gerando informações com simplicidade e rapidez a baixos custos. Assim, grande quantidade de polimorfismo na forma de segmentos de DNA pode ser obtida em um curto espaço de tempo (CAMPOS-DE-QUIROZ; ORTEGA-KLOSE, 2001). Já os marcadores ISSR envolvem a PCR para amplificar regiões entre microssatélites idênticos orientados em direções opostas, ou seja, inversamente orientados (SOUFRAMANIEN; GOPALAKRISHNA, 2004), não requerendo informações prévias de sequências de DNA da espécie-alvo, produzem fragmentos com grande reprodutibilidade e, assim como os marcadores RAPD, requerem pouca infraestrutura em termos de equipamento de laboratório para execução dos experimentos.

Apesar dessas vantagens, poucos trabalhos têm sido feitos para averiguar a capacidade discriminatória dos marcadores RAPD e ISSR em genótipos de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce, sendo mais abundante a aplicação desses marcadores na avaliação da variabilidade genética dentro do gênero *Vigna* (BA *et al.*, 2004; MUTHUSAMY *et al.*, 2008; WHAUG *et al.*, 2014). Dessa forma, objetivou-se com esse trabalho estimar a variabilidade de genótipos de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce através de marcadores RAPD e ISSR.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal, extração de DNA e seleção de iniciadores

Trinta e oito genótipos de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce, provenientes do Banco de Germoplasma da Universidade Federal do Ceará e do programa de melhoramento genético de feijão-caupi da Embrapa Meio Norte (Tabela 1), foram avaliados por dez iniciadores RAPD (Operon Technologies Inc.) e nove iniciadores ISSR IDT Kit número 9 (Columbia University). A seleção dos iniciadores consistiu de testes preliminares de amplificação utilizando-se 60 iniciadores RAPD (Operon Technologies Inc.) e 20 iniciadores ISSR IDT Kit número 9 (Columbia University). A amplificação foi conduzida com DNA extraído de quatro genótipos escolhidos ao acaso. Foram utilizados somente iniciadores que permitiram a obtenção de fragmentos de alta intensidade e reprodutibilidade.

Tabela 1 - Identificação, nome do acesso, local de armazenamento e origem dos 38 genótipos de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce avaliados por meio de marcadores RAPD e ISSR

Identificação	Acesso	Local de Armazenamento	Origem
1	IT 82E 49	BAG PI1	Nigéria
2	IT 820 - 889	BAG PI	Nigéria
3	Costa Rica V10	BAG PI	EUA
4	IT 826 - 09	BAG PI	Nigéria
5	AU 94 - MOB - 816	BAG PI	EUA
6	UCR 95 - 701	BAG PI	EUA
7	IT 820 - 784	BAG PI	Nigéria
8	BRS Milênio	BAG PI	Brasil
9	MNC 01- 627 - 650 - 01	BAG PI	Brasil
10	MNC 01- 6250 - 10- 2- 3- 5	BAG PI	Brasil
11	TB 763-TVU-2206	BAG PI	Nigéria
12	IT 93K-93-10	BAG PI	Nigéria
13	IT-870-611-3	BAG PI	Nigéria
14	MNC-00-5190-1-1-5	BAG PI	Brasil
15	CB 27	BAG PI	EUA
16	MNC 99541-F8	BAG PI	Brasil
17	CB 3-AZ	BAG PI	EUA
18	BR Longá	BAG PI	Brasil
19	IT 82D-60	BAG PI	Nigéria
20	MNC 00553-D-8-1-2-3	BAG PI	Brasil
21	CE 206	BAG CE2	Brasil
22	CE 513	BAG CE	Nigéria
23	CE 542	BAG CE	Nigéria
24	CE 796	BAG CE	Brasil
25	CE 798	BAG CE	Brasil
26	CE 856	BAG CE	Brasil
27	CE 860	BAG CE	Brasil
28	CE 925	BAG CE	Nigéria
29	CE 46	BAG CE	Brasil
30	CE 73	BAG CE	Brasil
31	CE 76	BAG CE	Nigéria
32	CE 77	BAG CE	Brasil
33	CE 80	BAG CE	Nigéria
34	CE 81	BAG CE	Nigéria
35	CE 103	BAG CE	Brasil
36	CE 104	BAG CE	Brasil
37	CE 109	BAG CE	Brasil
38	CE 113	BAG CE	Brasil

1: Banco Ativo de Germoplasma do Piauí; 2: Banco Ativo de Germoplasma do Ceará

Na reação de amplificação utilizando os marcadores ISSR foram testadas diferentes concentrações de DNA genômico (30 ng ou 50 ng), de enzima Taq DNA polimerase (0,5 e 1,0 unidade), de $MgCl_2$ (1,5 mM, 2,0 mM e 2,5 mM), e de iniciadores do ISSR (0,1 μM , 0,2 μM e 0,4 μM). Após a etapa de otimização das reações, as condições que apresentaram os melhores resultados foram utilizadas com os iniciadores ISSR selecionados para todos os genótipos de feijão-caupi a serem avaliados.

As sementes foram semeadas em casa de vegetação em areia de rio lavada e quando as plântulas apresentaram os primeiros folíolos verdadeiros os mesmos foram coletados para as análises. As extrações de DNA foram realizadas de acordo com o protocolo estabelecido por Doyle e Doyle (1990), no Laboratório de Sementes da Universidade Federal do Ceará. Após as extrações, a qualidade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose 1% e a quantificação foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop 1000. Após a quantificação as amostras de DNA foram diluídas para a concentração de 10 ng/ μL e armazenadas em freezer a $-20\text{ }^\circ C$.

Análises RAPD

As reações RAPD foram realizadas no Laboratório de Análises de sementes da Universidade Federal do Ceará. Aquelas, ocorreram de acordo com o protocolo estabelecido por Xavier *et al.* (2005), utilizando 20 ng de DNA genômico, 2,5 mM de $MgCl_2$, 1X PCR Buffer, 0,2 mM de cada dNTP, 1 unidade da enzima Taq Polimerase e 0,4 mM do iniciador. O volume final da reação foi ajustado para 25 μL com água Mili-Q estéril. As condições de PCR para as reações RAPD consistiram da desnaturação inicial por 4 minutos a $94\text{ }^\circ C$ seguidos de 35 ciclos de desnaturação ($94\text{ }^\circ C$ por 1 minuto), anelamento ($37\text{ }^\circ C$ por 1 minuto) e extensão ($72\text{ }^\circ C$ por 2 minutos) finalizando com uma etapa de extensão final ($72\text{ }^\circ C$ por 5 minutos).

Análises ISSR

As reações de ISSR foram preparadas para um volume total de 20 μL contendo 50 ng de DNA molde, 0,2 mM de cada dNTP, 2,0 mM de $MgCl_2$, 1X PCR Buffer, 0,8 mM do iniciador, 20 μg de BSA e 1,0 unidade da enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen).

As condições de PCR utilizadas foram: 4 minutos a $94\text{ }^\circ C$ (desnaturação inicial), seguindo-se de 40 ciclos de desnaturação ($94\text{ }^\circ C$ por 1 minuto), anelamento ($47-55\text{ }^\circ C$, dependendo do iniciador, por 1 minuto) e extensão ($72\text{ }^\circ C$ por 1 minuto) seguindo-se de uma etapa de extensão final ($72\text{ }^\circ C$ por 5 minutos). As Reações ISSR foram conduzidas no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Agroindústria Tropical.

Todas as reações de PCR foram realizadas em termociclador TECHNETC-512. Os produtos amplificados

foram separados em gel de agarose (2%) corados com brometo de etídeo ($0,5\text{ }\mu g\ \mu L^{-1}$) e submetidos a 90 volts por 4 horas. Posteriormente, os géis foram visualizados sob luz UV e fotografados em fotodocumentador.

Análise da divergência genética

Foi construída uma planilha de dados com informações referentes à presença e ausência de bandas, características de cada iniciador para cada um dos genótipos. Em seguida, esses dados foram utilizados para construção de uma matriz de similaridade genética onde foi utilizado o coeficiente de similaridade de Jaccard, estimado de acordo com a expressão 1, a seguir:

$$I_{AB} = \frac{A}{(A + B + C)} \quad (1)$$

em que: A: presença da mesma banda em ambos os indivíduos; B: presença da banda no indivíduo 1 a ausência no indivíduo 2; C: ausência da banda no indivíduo 1 e presença no indivíduo 2.

A partir dessa matriz, o dendrograma foi obtido pelo método UPGMA (Método de média aritmética não ponderada). Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do aplicativo computacional Genes (CRUZ, 2006).

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada iniciador RAPD e ISSR foi determinado pela seguinte expressão 2:

$$PIC_i = 1 - \sum_j^n =_1 P_{ij}^2 \quad (2)$$

nesta expressão, P_{ij} é a frequência do alelo "j" no marcador "i" (a soma se estende por todos os alelos). O cálculo foi baseado no número de alelos detectados por marcador para um determinado loco e a frequência relativa de cada alelo no conjunto dos 38 genótipos analisados.

A partir das matrizes de similaridade obtidas dos marcadores RAPD, ISSR e a matriz integrada RAPD-ISSR foram realizadas correlações de Mantel, baseadas nos valores Z (MANTEL, 1967) para medir o grau de similaridade entre as matrizes obtidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 80 marcadores RAPD foi gerado utilizando os 10 iniciadores. O número de fragmentos por iniciador variou de 5 (OE 17) a 11 (ON 02) com uma média de 8 fragmentos por iniciador. O padrão de amplificação do iniciador RAPD OE 06 está apresentado na Figura 1. Dos 80 fragmentos amplificados, 71 (88,75%) foram polimórficos nos acessos testados, com a média de 7,1 fragmentos polimórficos por iniciador. Xavier *et al.* (2005), estudando a variabilidade genética entre acessos de feijão-caupi da Nigéria, EUA e Brasil, por meio de oito iniciadores RAPD verificaram a presença

de 48 bandas sendo 30 (62,5 %) bandas polimórficas. Essa diferença nos resultados obtidos, provavelmente se deve ao fato do estudo dos autores citados terem trabalhado somente com iniciadores do kit OPE, enquanto os iniciadores do presente trabalho foram provenientes de vários kits OP (Tabela 2), tendo a maior probabilidade de englobar grande parte do genoma da espécie estudada.

Por outro lado, nos resultados obtidos por Ba *et al.* (2004), verifica-se maior porcentagem de bandas polimórficas (91%) comparadas aos resultados apresentados anteriormente, constatando que a utilização de um maior número de iniciadores e maior variação na constituição do oligonucleotídeo, provavelmente, contemple maior parte do genoma da espécie estudada acarretando em uma porcentagem maior de bandas polimórficas.

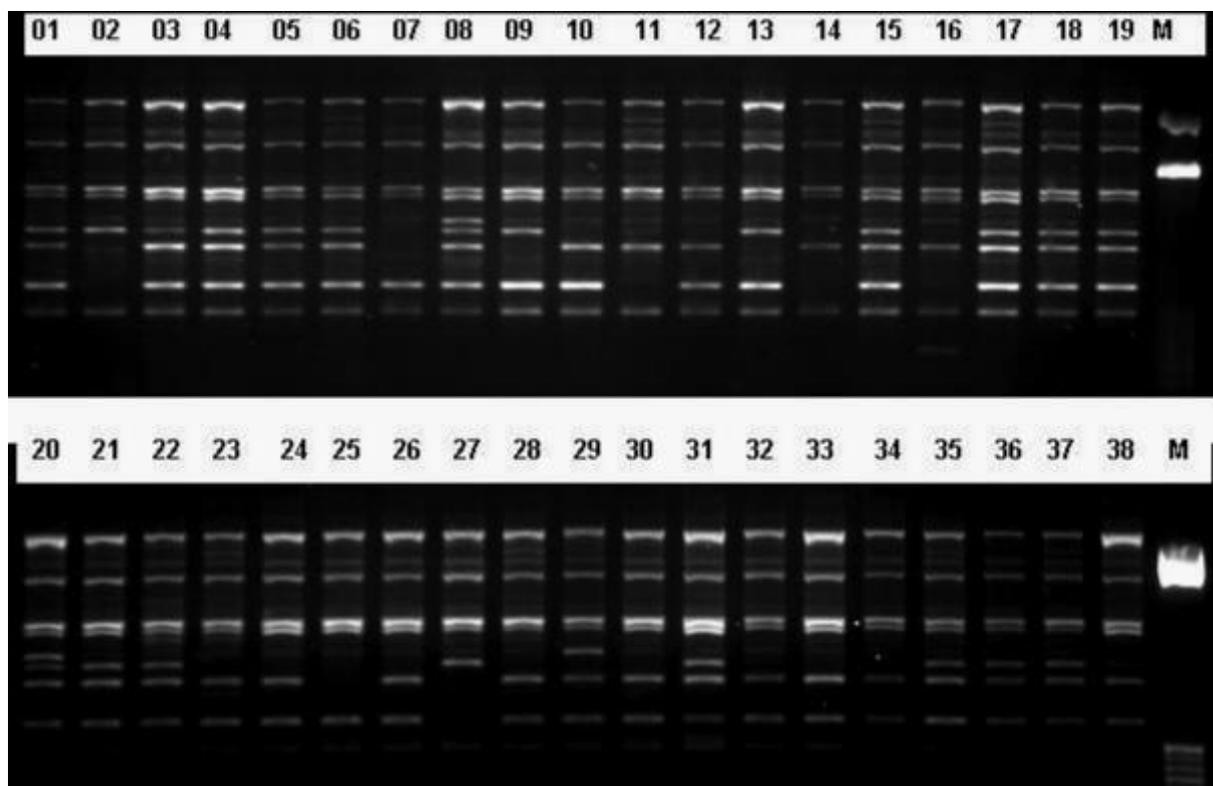
Quando se utilizou os marcadores ISSR nos genótipos avaliados, verificou-se que a partir da amplificação dos nove iniciadores ISSR utilizados foram gerados 47 bandas polimórficas (Tabela 2), perfazendo uma média de 5,22 bandas polimórficas por iniciador. Do total de 62 bandas, 47 (75,81%) foram polimórficas e 13 (24,19%) foram monomórficas. Sousa *et al.* (2008) estudando a diversidade genética em *Zabrotes subfasciatus* utilizando

marcadores ISSR obtiveram uma média de polimorfismo de 83,20%, resultado próximo ao encontrado neste trabalho.

O tamanho dos fragmentos obtidos com os marcadores ISSR variou de 300 a 1.400 pb. Ajibade *et al.* (2000), estudando as relações genéticas em genótipos do gênero *Vigna* através de marcadores ISSR obtiveram fragmentos com o tamanho de 200 a 1.500 pb estando de acordo com o tamanho de fragmentos obtidos neste trabalho. A pequena diferença no tamanho dos fragmentos amplificados pode ter ocorrido em virtude dos autores estarem trabalhando com varias espécies de *Vigna* e neste trabalho utilizaram-se apenas genótipos da espécie *Vigna unguiculata*. A Figura 2 contém o padrão de amplificação do iniciador ISSR 822.

A partir dos resultados obtidos, observa-se que os marcadores RAPD apresentaram um maior número de bandas polimórficas (7,10) e maior porcentagem de polimorfismo (88,75%) quando comparados aos marcadores ISSR (5,22 e 75,81%). Segundo McGregor *et al.* (2000) esse fato não chega a ser inesperado, em virtude dos marcadores ISSR atuarem em regiões microssatélites e possuem um iniciador composto por 20 pb sendo mais específico que os marcadores RAPD que possuem 10 pb na constituição do seu

Figura 1 - Resultado da eletroforese em gel de agarose 2%, apresentando o padrão de bandas de genótipos de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce, pela técnica RAPD utilizando o iniciador OE 06. **M**: marcador de peso molecular 1 Kb; **1 ao 38**: genótipos de feijão-caupi avaliados



oligonucleotídeo. Segundo Costa *et al.* (2008), apesar da rapidez e praticidade dos marcadores RAPD a sua natureza dominante e a baixa reprodutibilidade, podem levar à necessidade de alternativas como a conversão em marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions).

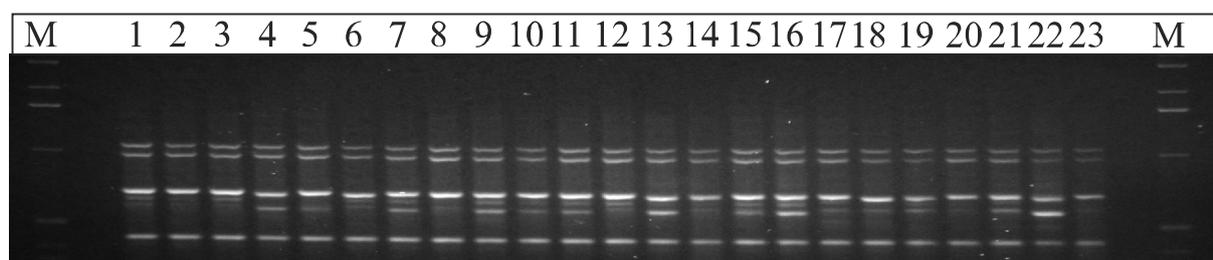
O valor do PIC varia de “0”, para perfis monomórficos, até “1”, para perfis altamente polimórficos. Assim, esse valor está relacionado com o número de alelos, que, por sua vez, está diretamente associado à divergência genética e ao número de genótipos em estudo (MALONE *et al.*, 2007).

Tabela 2 - Sequência dos iniciadores, bandas geradas e polimórficas de 10 iniciadores RAPD e nove iniciadores ISSR utilizadas na caracterização da variabilidade genética em feijão-caupi

Iniciador RAPD	Sequência (5' → 3')	Bandas geradas	Bandas polimórficas	PIC
OC 13	AAG CCT CGT C	10	10	0,766
OD 19	CTG GGG ACT T	6	6	0,697
OD 20	ACC CGG TAC C	6	6	0,758
OE 06	AAG ACC CCT C	8	4	0,270
OE 07	AGA TGC AGC C	7	5	0,093
OE 15	ACG CAC AAC C	8	8	0,624
OE 16	GGT GAC TGT G	5	4	0,543
OG 10	AGC GCC GTC T	9	9	0,660
ON 02	ACC AGG GGC A	11	10	0,534
ON 16	AAG CGA CCT G	10	8	0,426
Total		80	70	
Iniciador	Sequência (5' → 3')	Bandas geradas	Bandas polimórficas	PIC
810	5' GAG AGA GAG AGA GAG AT	9	9	0,478
822	5' TCT CTC TCT CTC TCT CA	6	2	0,666
826	5' ACA CAC ACA CAC ACA CC	7	6	0,360
841	5' GAC AGA GAG AGA GAG GT	7	6	0,404
857	5' ACA CAC ACA CAC ACA CYG	5	3	0,234
861	5' ACC ACC ACC ACC ACC ACC	8	5	0,376
880	5' GGA GAG GAG AGG AGA	8	6	0,323
885	5' BHB GAG AGA GAG AGA GA	7	5	0,473
888	5' BDB CAC ACA CAC ACA CA	5	5	0,287
Total		62	47	

B: S,G,T; H: A, C, T; Y: C,T

Figura 2 - Resultado da eletroforese em gel de agarose 2%, apresentando o padrão de bandas de genótipos de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce, pela técnica ISSR utilizando o iniciador 822. **M**: marcador de peso molecular 1 Kb; **1 ao 23**: genótipos de feijão-caupi avaliados



Comparando os valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC) dos dois sistemas de marcadores moleculares verificou-se que os valores provenientes dos iniciadores RAPD variaram de 0,093 (OE 07) a 0,766 (OC 13), com uma média de 0,537 e dos iniciadores ISSR variaram de 0,234 (ISSR 857) a 0,666 (ISSR 822) com uma média de 0,400. Segundo Botstein *et al.* (1980), marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, valores entre 0,25 e 0,5 mediantemente informativo e valores inferiores a 0,25 pouco informativos. Malone *et al.* (2007), comentam que o PIC está relacionado com o número de alelos, que, por sua vez, está diretamente associado à divergência genética e ao número de genótipos em estudo.

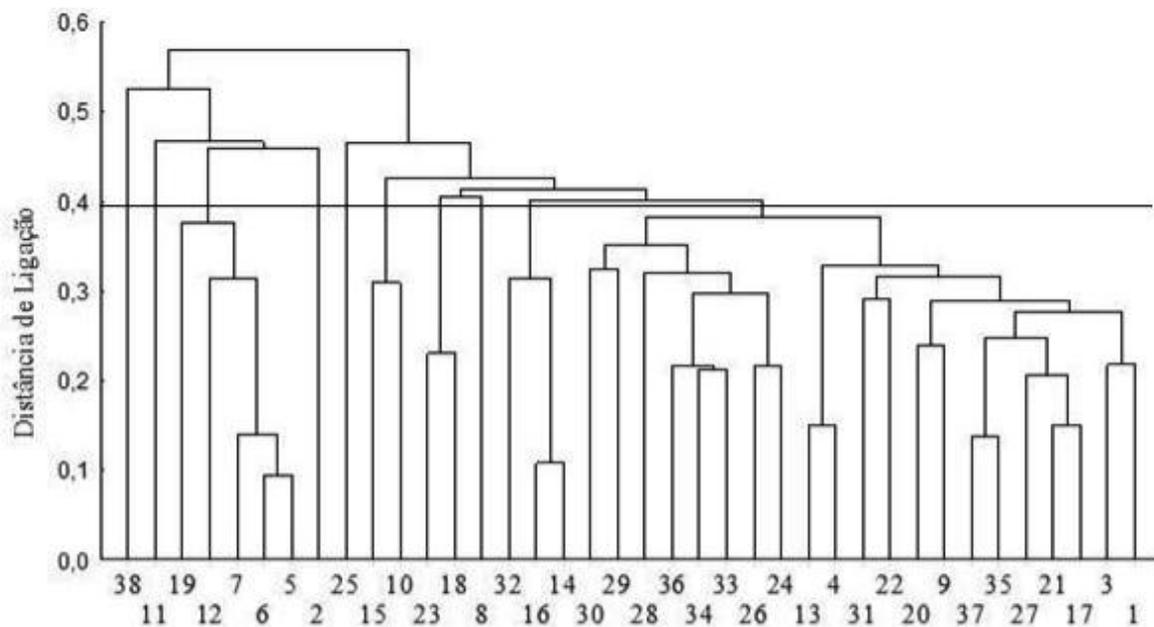
Resultados apresentando valores de PIC inferiores ao deste trabalho foram observados por Muthusamy *et al.* (2008). Esses autores estudaram a variabilidade genética em genótipos *Vigna umbellata* e verificaram valores de PIC para iniciadores RAPD variando de 0,045 (OPC14) a 0,0448 (OPBC2) e valores de 0,000 (UBC828 e UBC873) a 0,404 (UBC821) para iniciadores ISSR. Terzopoulos e Bebeli (2008) analisando a diversidade genética entre genótipos de *Vicia faba* com marcadores ISSR, obtiveram valores de PIC variando de 0,03 a 0,50 com uma média de 0,21.

Pela determinação da matriz de similaridade dos marcadores RAPD, foi possível observar que a distância genética entre os genótipos analisados variou de 0,08 a 0,57 onde a distância de ligação 0,4 foi suficiente para separar os indivíduos em 10 grupos (Figura 3). Souframanien e

Gopalakrishna (2004) examinando a diversidade genética em 18 genótipos de *Vigna mungo* através de marcadores RAPD realizaram o agrupamento em quatro grupos distintos com um coeficiente de similaridade variando de 0,83 a 0,95; sugerindo que os 38 genótipos estudados de *Vigna unguiculata* apresentam maior variabilidade que os 18 genótipos de *Vigna mungo* verificado pelos autores. Marcadores RAPD, também, foram utilizados por Ferreira *et al.* (2008) para agrupar 30 acessos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com maiores teores de beta-caroteno onde foi construído um dendrograma a partir da amplificação de 47 iniciadores RAPD. Nesse estudo foram verificados distâncias genéticas variando de 0,09 a 0,317, constatando um bom nível de variabilidade genética nos genótipos de feijão-caupi avaliados no presente trabalho.

A análise de agrupamento (Figura 4) realizada com base nas distâncias genéticas permitiu a divisão dos 38 genótipos de feijão-caupi em 17 grupos de similaridade genética considerando-se uma distância de 0,40. Verifica-se que a utilização dos marcadores RAPD possibilitou maior acesso à variabilidade genética dos genótipos de feijão-caupi estudados do que quando avaliados por marcadores ISSR, utilizando o mesmo ponto de corte dos marcadores RAPD. Dwivedi *et al.* (2001) trabalhando com 26 acessos de amendoim e oito iniciadores RAPD foram capazes de realizar o agrupamento desses genótipos em cinco grupos; já Xavier *et al.* (2005) estimando a variabilidade genética em feijão-caupi através de oito iniciadores RAPD verificaram o

Figura 3 - Dendrograma obtido a partir da amplificação de dez iniciadores RAPD para 38 genótipos de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce



agrupamento de 45 acessos de feijão-caupi em quatro grupos. Esses resultados demonstram a eficiência dos marcadores ISSR na detecção do polimorfismo genético. Segundo Esselman *et al.* (1999), os marcadores ISSR possuem a vantagem de gerar grandes quantidades de bandas, sendo abundantes ao longo do genoma de eucariontes, assim são bastante úteis na avaliação de populações em estudos genéticos, na detecção da diversidade genética e em estudos de mapeamento genético.

Examinando o dendrograma obtido a partir da integração dos dois sistemas de marcadores moleculares (Figura 5), observa-se que escolhendo o mesmo ponto de corte utilizado nos dendrogramas anteriores, obtêm-se a formação de 18 grupos distintos, sugerindo maior aproximação dos marcadores ISSR do que dos marcadores RAPD. No entanto, quando se analisa a correlação entre as matrizes obtidas e a matriz combinada, verifica-se uma correlação de maior magnitude entre a matriz obtida pelos marcadores RAPD ($r = 0,845$) do que os marcadores ISSR ($r = 0,629$) (Tabela 3). Resultados semelhantes foram obtidos por Muthusamy *et al.* (2008), onde esses autores verificaram correlações altamente significativas para as matrizes dos marcadores RAPD ($r = 0,955$) e ISSR ($r = 0,861$) quando correlacionadas com a matriz combinada.

Os genótipos AU 94 - MOB - 816 (5) e UCR 95 - 701 (6) apresentaram o maior grau de similaridade entre os genótipos avaliados. É importante ressaltar que estes dois

genótipos são oriundos dos Estados Unidos e apresentaram um alto grau de similaridade nos três dendrogramas avaliados. Indicando base genética semelhante para estes genótipos.

O genótipo CE-798 (25) apresentou-se como o mais divergente entre todos os genótipos avaliados nos três dendrogramas construídos. Segundo Dias (2009) este genótipo apresenta boas características agrônômicas tais como produtividade, uniformidade na maturação dos grãos e precocidade. Para Gupta *et al.* (2014) a identificação de genótipos superiores com base na divergência genética é a estratégia mais adequada para iniciar um programa de melhoramento. Sendo importante ressaltar que é mais efetivo realizar cruzamentos entre genótipos altamente divergentes, no entanto com um bom potencial produtivo.

O cruzamento entre os genótipos CE-798 (25) e MNC03-720-11 (28) e/ou TB 763-TVU-2206 (11) e MNC03-720-11, tornam-se opções interessantes a serem exploradas pelos melhoristas de feijão-caupi haja vista, que esses parentais apresentam boas características agrônômicas. Outra opção a ser considerada é o cruzamento dos genótipos CE-798 (25) e TB 763-TVU-2206 (11) com cultivares de feijão-caupi já estabelecidas no estado do Ceará, tais como Sempre verde, Setentão e Pitiúba. Para Alves *et al.* (1982), a cultivar Pitiúba apresenta boas características com relação à produtividade, adaptabilidade e estabilidade fenotípica, devendo esta cultivar ser referência para o melhoramento de feijão-caupi no estado do Ceará.

Figura 4 - Dendrograma obtido a partir da amplificação de nove iniciadores ISSR para 38 genótipos de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce

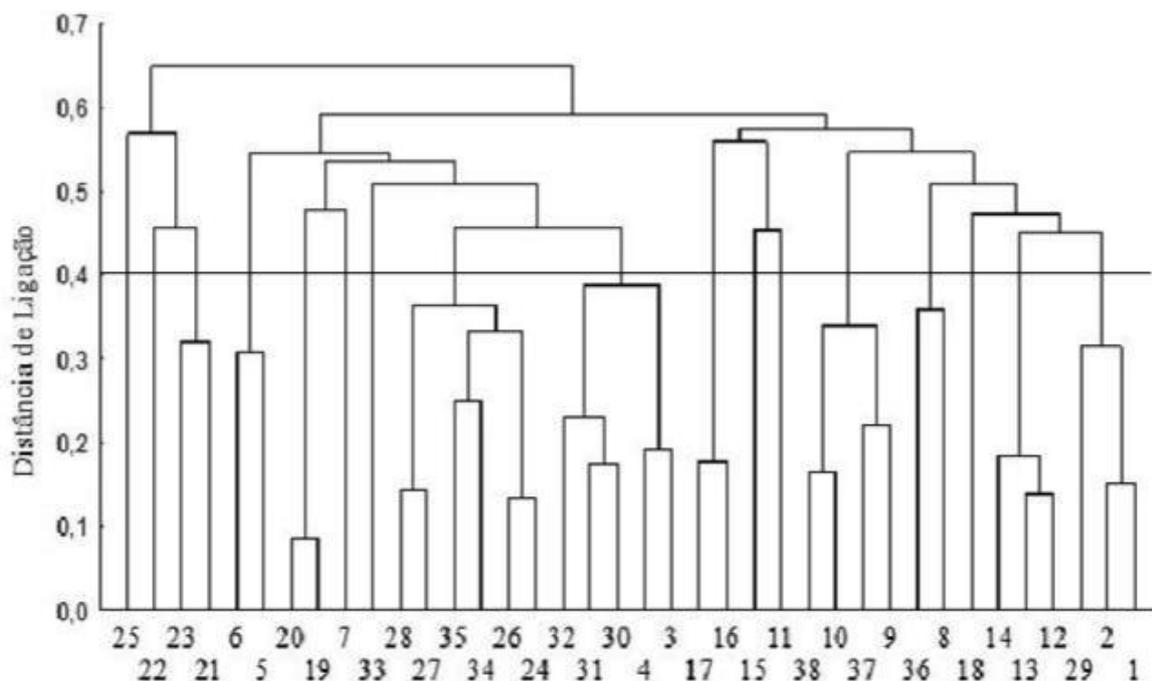


Figura 5 - Dendrograma obtido a partir da amplificação de 10 iniciadores RAPD e nove iniciadores ISSR para 38 genótipos de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce

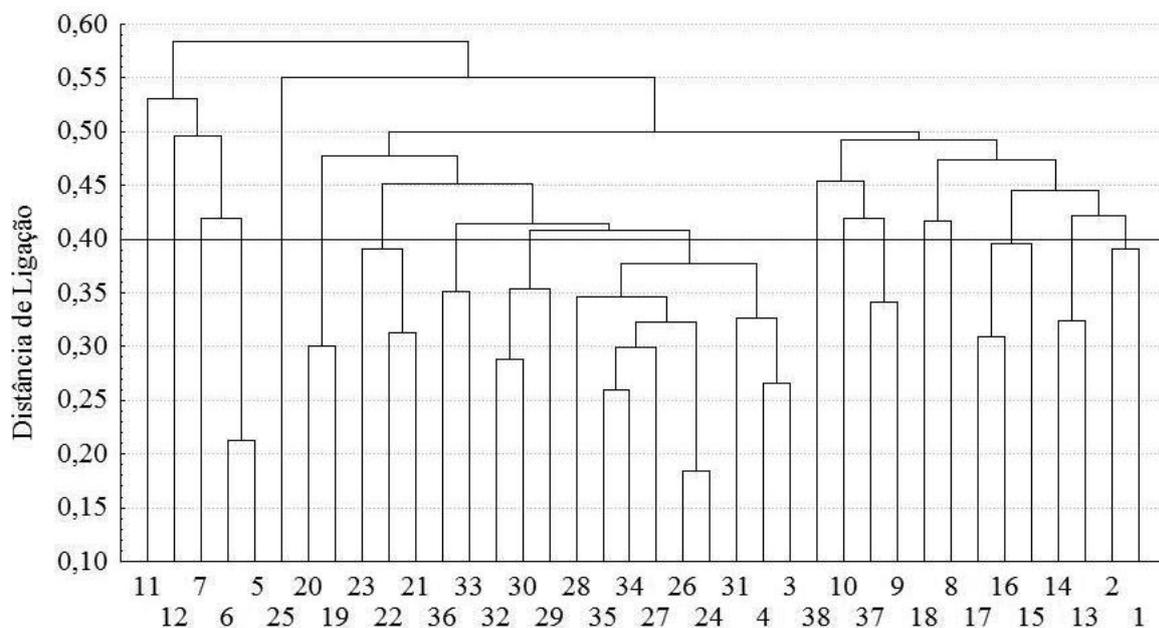


Tabela 3 - Correlação entre matrizes com teste de Mantel baseado em 10000 simulações

Marcador Molecular	Correlação
RAPD	0,845 ⁺⁺
ISSR	0,629 ⁺⁺

⁺⁺: Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de Mantel baseado em 10000 simulações

CONCLUSÕES

1. Há variabilidade genética entre os genótipos de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce avaliados neste trabalho;
2. Ambos os marcadores RAPD e ISSR são eficientes na identificação da variabilidade genética em feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce;
3. Os genótipos AU 94 - MOB - 816 e UCR 95 - 701 apresentaram o maior grau de similaridade entre os genótipos avaliados;
4. O genótipo CE-798 apresentou-se como o mais divergente entre todos os genótipos avaliados.

REFERÊNCIAS

- AJIBADE, S. R.; WEEDEN, N. F.; MICHITE, S. Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. **Euphytica**, v. 111, n. 1, p. 47-55, 2000.
- ALVES, J. F.; SANTOS, J. H. R.; PAIVA, J. B.; OLIVEIRA, F. J.; TEÓFILO, E. M. Estabilidade fenotípica e adaptação de cultivares de feijão-de-corda, *Vigna sinensis* (L.) Savi. **Ciência Agronômica**, v. 13, n. 2, p. 53-59, 1982
- BA, F.; PASQUET, R. S.; GEPTS, P. Genetic diversity in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] as revealed by RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 51, n. 5, p. 539-550. 2004.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, n. 3, p. 209-215, 2001.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLMICK, H. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.
- CAMPOS-DE-QUIROZ, H.; ORTEGA-KLOSE, F. Genetic variability among elite red clover (*Trifolium pratense* L.) parents used in Chile as revealed by RAPD markers. **Euphytica**, v. 122, n. 1, p. 61-67, 2001.
- COSTA, M. M. *et al.* Marcadores RAPD para detecção de resistência à ferrugem-asiática-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 12, p. 1733-1739, 2008.

- CRUZ, C. D. **Programa Genes** : biometria. 1.ed. Viçosa, MG: UFV, v.1(?). 2006, 382 p.
- DIAS, F. T. C. **Utilização de técnicas multivariadas e moleculares na caracterização e seleção de genótipos de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce**. 2009. 99 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15. 1990.
- DWIVEDI, S. L. *et al.* Assessment of genetic diversity among selected groundnut germplasm. 1: RAPD analysis. **Plant Breeding**, v. 120, n. 4, p. 345-359, 2001.
- ESSELMAN, E. J. *et al.* Clonal diversity in the rare *Calamagrotis porter* ssp. *Insperrata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 443-451, 1999.
- FERREIRA, C. F. *et al.* Molecular characterization of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) with yellow-orange roots for beta-carotene improvement. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 23-29, 2008.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3^o ed. Brasília: EMBRAPA- CENARGEN, 1998, 220 p.
- GUIMARÃES, C. T.; MOREIRA, M. A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 715-740.
- GUPTA, S. K.; BANSAL, R.; GOPALAKRISHNA, T. Development and characterization of genic SSR markers for mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). **Euphytica**, v. 195, n. 2, p. 245-258, 2014.
- INTERNATIONAL PLANT GENETIC RESOURCES INSTITUTE. **Descriptors for banana (*Musa* spp.)**. Roma: IPGRI, 1996, 55 p.
- MALONE, G. *et al.* Caracterização bioquímica e molecular de acessos de arroz vermelho coletados no estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, n. 2, p. 77-85. 2007.
- MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v. 27, n. 2, p. 209-220. 1967.
- McGREGOR, C. E. *et al.* A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. **Euphytica**, v. 113, n. 2, p. 135-144, 2000.
- MUTHUSAMY, S.; KANAGARAJAN, S.; PONNUSAMY, S. Efficiency of RAPD and ISSR markers system in accessing genetic variation of rice bean (*Vigna umbellata*) landraces. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 32-41, 2008.
- SOUFRAMANIEN, J. GOPALAKRISHNA, T. A. comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. **Theoretical Applied Genetics**, v. 109, n. 8, 1687-1693, 2004.
- SOUSA, G. A. *et al.* Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 7, p. 843-849, 2008.
- SOUSA JUNIOR, C. L. Melhoramento de espécies alógamas. In: NASS, L. L. *et al.* (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 159-2001.
- WANG, L. X. *et al.* Assessment of wheat variety stability using SSR markers. **Euphytica**, v. 195, n. 3, p. 435-452, 2014. (ordenar logo após TERZOPOULOS, P. J.; BEBELI, P. J.)
- TERZOPOULOS, P. J.; BEBELI, P. J. Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (*Vicia faba* L.) with ISSR markers. **Field Crops Research**, v. 108, n. 1, p. 39-44. 2008.
- XAVIER, G. R. *et al.* Variabilidade genética em acessos de caupi analisada por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 4, p. 353-359, 2005.