

**Fabiola E. C. Spiaggia**

***MARCADORES DE DNA NA CARACTERIZAÇÃO DE  
GERMOPLASMA DE FEIJÃO MACASSAR  
(VIGNA UNGUICULATA (L.) WALP.)***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**RECIFE**

**2003**

**MARCADORES DE DNA NA CARACTERIZAÇÃO  
DE GERMOPLASMA DE FEIJÃO MACASSAR (*VIGNA  
UNGUICULATA (L.) WALP.*)**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-  
Graduação em Genética da Universidade  
Federal de Pernambuco, para a obtenção do  
grau de Mestre em Genética.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Maria Benko-  
Iseppon**

**Mestranda: Fabiola Emanuela Clotilde Spiaggia**

**Recife  
2003**

**Banca Examinadora:**

**Dra. Maria do Carmo Catanho**

**Dr.Reginaldo de Carvalho**

**Dr.José Ferreira dos Santos**

**Orientador:**

**Dra. Ana Maria Benko Iseppon**

**Coordenador do Curso:**

**Dra. Ana Maria Benko Iseppon**

**Secretário:**

**Arismar Lobo da Silva**

*A todos que lutam para vencer seus próprios limites, dedico este trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro de Ciências Biológicas (CCB), Departamento de Genética, por ter permitido o uso de suas dependências;

Ao curso de pós-graduação em genética, em especial à coordenação e ao corpo docente, pela oportunidade de realizar e concluir este trabalho.

À Dra. Ana Maria Benko Iseppon, pela orientação, respeito e paciência a mim dispensada durante todas as etapas deste trabalho.

Aos professores Paulo Paes de Andrade (UFPE), Nara Suzi Freitas (UFPRE), Constância Ayres Flávia Junqueira (CPq. Aggeu Magalhães) e Osvaldo Pompílio de Melo Neto (CPq. Aggeu Magalhães) um agradecimento especial pela permissão de utilização de equipamentos e pelos valiosos conselhos técnicos.

Pelo apoio recebido durante os experimentos e amizade, agradeço aos colegas Nilmara Santana de Oliveira e Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho.

À técnica Claudete Marques, pelas palavras de incentivo e conforto tão importantes nos momentos difíceis.

Aos técnicos Marcos Lemos e Kleyena Arantes pelos serviços prestados durante o desenvolvimento das pesquisas.

Ao Dr. Francisco R. Freire Filho da Embrapa (CPAMN), Teresina, Piauí pelos importantes conselhos e constante disponibilidade, bem como pelas sementes do Banco Ativo de germoplasma de Caupi que nos enviou.

Ao Dr. Jeff Ehlers da Universidade da Califórnia, Riverside, pelo envio de sementes de acessos importantes para nosso estudo.

Aos queridos colegas de Laboratório Jailson Gitaí, Mário Corrêa e Maria Rita C. Sales de Melo agradeço pelo companheirismo, alegria e, principalmente, amizade durante todo o transcorrer do projeto.

Ao colega de turma e laboratório, David A. de L. Moraes pela orientação nas análises bioinformáticas dos resultados obtidos.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa concedida.

Aos meus pais, Gabriella Ingrassia e Umberto Spiaggia, por respeitarem minhas escolhas e pelo amplo apoio.

Aos meus amigos Ana Paola Arena, Christiana Wanderley, Daniela Gouveia, Mack Wilson e Petrus Freyre pelos conselhos, estímulo e momentos inesquecíveis compartilhados durante todos estes anos de amizade.

**Muito Obrigada!**

## SUMÁRIO

	Página
<i>Lista de Tabelas</i>	5
<i>Lista de Figuras</i>	6
<i>Lista de abreviações</i>	7
Resumo	8
<b>1. Introdução</b>	9
<b>2. Revisão da literatura:</b>	11
2.1. Feijão Caupi - Classificação Botânica	11
2.1.1. Nomes Populares	11
2.2. Evolução do gênero <i>Vigna</i>	12
2.3. Centro de Origem e Diversidade Genética do Caupi	12
2.4. Introdução na América do Sul e no Brasil	13
2.5. Doenças do Caupi	13
2.6. Melhoramento Genético do Caupi	14
2.7. Marcadores no Melhoramento do Caupi	15
2.7.1. Marcadores Morfológicos	15
2.7.2. Marcadores Isoenzimáticos	16
2.7.3. Marcadores de DNA	16
2.7.3.1. Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma	17
2.7.3.2. Tipos de Marcadores de DNA e Aplicações	17
<b>3. Referências Bibliográficas</b>	20
<b>4. Manuscrito de Artigo Científico:</b>	
Caracterização Preliminar de Acessos de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. pela Metodologia de DAF (Impressão Genômica da Amplificação do DNA)	26
<b>5. Conclusões</b>	45
<b>6. Abstract</b>	46
<b>7. Apêndice</b>	47
6.1. Instruções para Autores do Periódico <i>Genetics and Molecular Biology</i>	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
<b>Tabela 1.</b> List of analysed <i>Vigna</i> genotypes including name of species, accession number or cultivar name, germplasm bank and original area of cultivation.	41
<b>Tabela 2.</b> Primers used in the DAF reactions including sequence composition, total number of generated bands and number of polymorphic bands.	42

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
<b>Figura 1.</b> A representative picture of DAF products including a very informative primer (OPG-06) and a primer that displayed few bands (OPA-14).	43
<b>Figura 2.</b> Consensus tree generated from DAF data using bootstrap method with the program MEGA V 2.0.	44



### LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados
BAC	Banco Ativo do Caupi
bp	Pares de Bases
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPGMV	Vírus do Mosaico Dourado do Caupi
CPSMV	Virus do Mosaico Severo do Caupi
DAF	<i>DNA Amplification Fingerprinting</i> Impressão Digital do DNA Amplificado
DFG	Deutsche Forschung Gemeinschaft
DNA	<i>Desoxiribonucleic Acid</i> Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Didesoxinucleotideo Trifosfato
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FACEPE	Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Pernambuco
ha	Hectare
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IITA	International Institute of Tropical Agriculture
IPA	Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária
IPK	Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben
kb	kilo bases
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetic Analysis</i>
nt	Nucleotídios
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> Reação em Cadeia da Polimerase
Primers	Iniciadores
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphism of DNA</i> Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição
RGA	Resistance Genes Analogs
SSR	<i>Simple Sequence Repeat</i> Seqüência Simples Repetida
STMS	<i>Sequence Tagged Microsatellite Site</i> Etiquetas de Identificação de Sítios de Microsatélites
Taq	DNA polimerase de <i>Thermophylus aquaticus</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
UPGMA	Unwheited Pair Group Method Using Arithmetic Average

## RESUMO

O presente estudo descreve os resultados obtidos a partir da aplicação da metodologia de DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*; Impressão Digital da Amplificação do DNA) na discriminação de alguns acessos de feijão macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) depositados em bancos de germoplasma. O estudo avaliou um total de 30 genótipos, incluindo 28 acessos de feijão macassar, um acesso de *V. angularis* (Willd.) Ohwi et Ohashi e um acesso de *V. umbellata* (Thumb.) Ohwi et Ohashi. Nove primers aleatórios (todos decâmeros) foram usados na análise, gerando em média 7,8 bandas e 5,2 bandas polimórficas por primer. A matriz de dados resultante incluiu 69 bandas analisadas com um total de 1342 caracteres. O dendrograma gerado pela análise UPGMA agrupou os acessos de caupi e das duas espécies restantes, revelando também alguns grupamentos a nível intraespecífico. As implicações da presente análise e as futuras perspectivas para o melhoramento do caupi no Brasil são discutidas no presente estudo.

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Vigna* pertence à família Fabaceae (Leguminosae), apresentando distribuição pantropical. Inclui cerca de 200 espécies, dentre as quais sete espécies são cultivadas extensivamente. Por sua vez, o feijão macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) destaca-se dentre estas espécies devido à sua capacidade ímpar de adaptação e rusticidade, crescendo em solos pobres, sem necessidade de suplementação de nitrogênio, o que o torna particularmente vantajoso para a agricultura de subsistência (Santalla *et al.*, 1998).

O feijão macassar – também conhecido como feijão caupi – constitui a base alimentar de milhões de pessoas em todo o mundo (Fery, 2002). Embora seja largamente cultivado no mundo, sua importância é maior em países em desenvolvimento da América do Sul, da África e da Ásia, onde as proteínas de origem vegetal perfazem 83% do total de proteínas da dieta padrão (Mahe *et al.*, 1994), representando uma das maiores esperanças no combate à escassez de suprimentos alimentares (Ehlers e Hall, 1997).

O Brasil é o segundo produtor mundial de caupi (Santalla *et al.*, 1998). Segundo Freire *et al.* (1999) a produtividade média do caupi (130-500 kg/ha) é menor que a do feijão *Phaseolus* (565-630 kg/ha) cultivado em outras regiões brasileiras. Nos Estados Unidos e em perímetros irrigados do Nordeste foi possível se obter produtividade de 4t/ha e 2t/ha, respectivamente (EMBRAPA, 1982).

Apesar da importância desta cultura para as populações em desenvolvimento de regiões semi-áridas do Brasil, o seu melhoramento tem sido limitado a métodos convencionais de cultivo e seleção visando adaptá-las às condições locais. Conseqüentemente, em áreas mais férteis e com maior potencial, o caupi tem sido substituído por cana-de-açúcar ou por culturas forrageiras, resultando num déficit de produção e no aumento nos preços de mercado (May *et al.*, 1988).

Poucos são os estudos prévios do germoplasma disponível de caupi com marcadores moleculares. No Brasil destaca-se o trabalho de Simon (2002) que analisou 68 acessos de feijão macassar, comparativamente a 17 acessos de outras cinco espécies cultivadas de *Vigna* através da metodologia de DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*; Impressão Digital da Amplificação do DNA). O citado estudo revelou uma significativa variabilidade genética ao nível intra e inter-específico, agrupando distintivamente os acessos de caupi daqueles das outras cinco espécies

Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.

cultivadas. Porém, alguns acessos importantes para o melhoramento do caupi no Brasil, incluindo importantes fontes de resistência a patógenos, não encontravam-se disponíveis à época do estudo.

O presente estudo teve como objetivo geral auxiliar na caracterização e distinção de acessos de bancos de germoplasma do feijão macassar (*V. unguiculata*) através da geração de polimorfismos pela técnica de DAF, incluindo fontes importantes de resistência às principais doenças, subsidiando programas de melhoramento da citada cultura. Os objetivos específicos foram:

1. Selecionar os marcadores polimórficos a nível intra-específico;
2. Desenvolver marcadores do tipo DAF em feijão macassar;
3. Auxiliar na caracterização e distinção de acessos, cultivares e variedade de *Vigna unguiculata*;
4. Subsidiar programas de melhoramento para a citada cultura;

## **2- REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1- Feijão Caupi - Classificação Botânica**

O caupi (*V. unguiculata* (L.) Walp.) é uma planta da classe Dicotyledoneae, pertencente à ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolinae e gênero *Vigna*, seção Catiang (Verdecourt, 1970; Marechal *et al.*, 1978; Padulosi *et al.*, 1997). Atualmente se aceita a classificação da espécie e subespécies proposta por Marechal (1978) que se baseia naquela adotada por Verdcourt (1970). A proposta de Marechal admite formas variadas dentro da mesma subespécie e distingue cultivadas e selvagens através das categorias cultigrupo (cv-gr) e variedade (var.), respectivamente. Na espécie *V. unguiculata*, a subespécie *unguiculata* inclui as formas cultivadas de quatro cultigrupos: ‘Unguiculata’ que é a forma mais comum nas culturas fornecedoras de grãos; ‘Biflora’ ou ‘Catjang’ são forrageiras cultivadas mais freqüentemente na Ásia como forrageiras; ‘Sesquipedalis’, comum na Ásia onde se consomem as vagens longas e tenras (conhecidas como feijão de metro) em saladas e ‘Textilis’ cultivado no oeste africano para produção de fibras, a partir dos longos pedúnculos (Marechal *et al.*, 1978).

#### **2.1.1- Nomes Populares**

Muitos são os nomes populares do caupi no Brasil: feijão-de-corda e macassar ou macaçar (Nordeste), feijão de praia e de estrada (Norte), feijão miúdo (Sul), catador e geruba (Bahia e Norte de Minas), feijão-fradinho (Rio de Janeiro) e ainda, caupi, feijão-pardo, feijão-verde, feijão-manteiga e ervilha-de-vaca, entre outros (Araújo *et al.*, 1984).

## **2.2- Evolução do gênero *Vigna***

Apesar da classificação proposta por Marechal ser a mais aceita atualmente, Lush (1979) e Ng (1990) concordam ao afirmar que esta classificação não considera alguns pontos importantes. Pasquet (1996), baseado em dados morfológicos e biogeográficos, isoenzimáticos e no estudo de sistema de cultivo, propôs uma nova hipótese evolutiva para o caupi. Os dados sugerem que antes do pleistoceno, devido à necessidade de umidade, teria ocorrido a primeira diversificação. Logo depois um proto-taxon mais adaptado para áreas secas se espalhou em áreas que vão do Congo à Etiópia e da região do Transvaal até a fronteira entre Congo e Zambesi. Mudanças de clima isolaram os taxons em subespécies e o último evento parece ter sido a evolução do sistema reprodutivo de polinização cruzada para autopolinização. O provável progenitor do caupi cultivado é *V. unguiculata* ssp. *unguiculata* var. *spontanea*, taxon que se encontra bem distribuído no continente africano.

## **2.3- Centro de Origem e Diversidade Genética do Caupi**

O gênero *Vigna* inclui cerca de 170 espécies de distribuição pantropical, das quais 120 ocorrem na África (66 endêmicas), 22 na Índia e sudeste da Ásia (16 endêmicas) e umas poucas espécies nas Américas e na Austrália (Faris, 1965; Ghafou *et al.*, 2001).

Os estudos não são conclusivos, mas há fortes evidências que apontam para as variedades *mensensis* e *dekindtiana* como prováveis ancestrais da espécie *V. unguiculata* ssp. *unguiculata*. Smartt (1985) acredita ser razoável propor que a variedade *mensensis* seja a progenitora da subespécie *unguiculata*, considerando que a mesma apresenta-se mais distante das formas cultivadas, constituindo-se em um tipo intermediário.

Quanto ao local de origem, Faris (1965) e Rawal (1975) indicam o Oeste da África. Posteriormente, Steele e Mehra (1980) assim como Ng e Maréchal (1985) confirmam esta suposição e delimitam mais precisamente a Nigéria como sendo o centro primário de diversidade de *V. unguiculata*. Atualmente o feijão de corda está disseminado praticamente em todo o mundo, contudo cerca de dois terços da safra e mais de três quartos da área de produção estão espalhados pela África, do Senegal indo para Leste passando pela Nigéria e Niger até o Sudão, Quênia e Tanzânia e cruzando Botswana e Moçambique até chegar a Angola (Ng e Maréchal, 1985).

Na Índia, o caupi teria sido introduzido no período Neolítico (Pant *et al.*, 1982; Arora, 1985). Neste país, o qual é o segundo centro em diversidade, ocorrem 14 espécies de

Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.

*Vigna* pertencentes aos subgêneros *Ceratopteris*, *Vigna*, *Pterotropis*, *Macrorhynchus* e *Dolichovigna*. Contudo não há exemplares selvagens do subgênero *Vigna*, só ocorrendo uma grande variedade das formas cultivadas. No Sul dos Estados Unidos, o caupi é usado nas mais diversas formas (verde, grão seco, forragem e rotatividade nas plantações), mas devido à sua crescente importância e vantagens frente a outros grãos, Ehlers e Hall (1997) acreditam que esta será uma das maiores culturas em poucos anos.

## **2.4- Introdução na América do Sul e no Brasil**

Alguns autores datam o século XVI como a provável época de entrada do feijão de corda na América do Sul, juntamente com os colonizadores espanhóis e portugueses (Watt, 1978; Ng e Marechal, 1985; Freire-Filho *et al.*, 1981). Contudo, Steele (1986) considera que o caupi foi trazido por escravos no século XVII. Não há evidências a favor de uma ou outra hipótese. Talvez ambas sejam válidas, pois tanto os colonizadores como os escravos conheciam o valor deste grão na África, onde o mesmo constitui a base alimentar de várias populações nativas. No Brasil, supõe-se que o Caupi entrou pelo Estado da Bahia, disseminou-se pela zona da mata de Alagoas e Pernambuco e então, chegou aos sertões semi-áridos e ao agreste. No século XVIII foi introduzido na região Norte por colonizadores nordestinos e atualmente o feijão de corda também pode ser encontrado nas outras regiões do Brasil (Guazelli, 1988).

## **2.5- Doenças do Caupi**

Vários são os patógenos e as pragas que afetam a produção do caupi, incluindo bactérias, fungos, nematoídes e predação por insetos (especialmente na fase pós-colheita). Porém, o ataque por vírus apresenta-se como o mais amplamente limitante. Existem mais de 600 vírus de plantas catalogados. No caso específico do caupi, o Vírus do Mosaico Severo do Caupi (CPSMV, *Cowpea Severe Mosaic Virus*), da família Comoviridae, e o Vírus do Mosaico Dourado do Caupi (CPGMV, *Cowpea Golden Mosaic Virus*) da família Geminiviridae, são os que têm reduzido mais drasticamente a produção de caupi no Brasil (Gonçalves e Lima, 1982; Araújo *et al.*, 1984; Lima e Santos, 1988; Freire-Filho *et al.*, 1999; Barreto, 1999) com perdas de até 81% em outros países da América Latina (Araújo *et al.*, 1984; Umaharan *et al.*, 1997).

Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.

Segundo Stace-Smith (1981), o grupo Comovírus é composto por 12 representantes. No entanto, somente o CPSMV infecta naturalmente o caupi no Brasil (Watt e Araújo, 1988). O vírus dificilmente é transmitido através da semente que, quando oriunda de planta infectada, apresenta por vezes o embrião morto ou mesmo inexistente, além de manchas marrons no tegumento, comprometendo a germinação (Gonçalves, 1983 *apud* Watt e Araújo, 1988).

Freire-Filho et al. (1978) estudaram 25 cultivares de caupi do Estado do Piauí para posterior uso dos dados em programas de melhoramento. Os autores observaram que as cultivares ‘Cowpea-535’ e ‘Mamoninha II’ foram as menos afetadas pelo vírus do mosaico severo e entraram no grupo de maior rendimento, superior a 800 kg/ha tanto em cultivo isolado quanto consorciado. As cultivares ‘Macaíbo’ e ‘CNC 0434’, também selecionadas como cultivares imunes ao vírus do mosaico severo, não obtiveram, contudo, características agronômicas interessantes (no caso de ‘macaíbo’) ou boa aceitação comercial (no caso de ‘CNC 0434’) no Nordeste brasileiro (Lima & Nelson, 1977; Rios & Watt, 1980; Rios *et al.*, 1980; 1982 *apud* Watt e Araújo, 1988).

## **2.6- Melhoramento Genético do Caupi**

Embora seja uma cultura tradicional, somente a partir do final da década de 60 houve um considerável número de pesquisas com o feijão macassar, com vistas a seu melhoramento genético no Brasil. Os primeiros trabalhos de melhoramento desta cultura tinham como objetivo básico o aumento de sua produtividade (Krutman *et al.*, 1968; Paiva *et al.*, 1970)

A I Reunião Nacional de Programação de Pesquisa do Caupi (Paiva *et al.*, 1977) constituiu-se no primeiro passo para a realização de um projeto integrado de melhoramento do caupi, através do levantamento de problemas e definição de prioridades de pesquisa do caupi. Posteriormente essas prioridades foram redefinidas por Estado, durante a III Reunião Nacional de Programação de Pesquisa do Caupi (Embrapa, 1979), sendo incluídas no Programa Nacional de Pesquisa do Feijão (Embrapa, 1981), o qual compreendeu o feijão comum e o caupi.

A partir dos anos 80, os projetos com caupi tiveram como principais objetivos desenvolver tecnologias que aumentassem a produtividade, a eficiência do uso do solo e que permitissem o controle de pragas, doenças e ervas invasoras com o uso mínimo de insumos químicos (Freire-Filho *et al.*, 1999).

No momento os principais objetivos dos projetos de melhoramento do caupi são: **(I)** o desenvolvimento de cultivares com alta qualidade de grãos; **(II)** resistência múltipla a vírus,



Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.

doenças fúngicas e bacterianas; (III) porte mais compacto e ereto, que possibilite a colheita mecânica e o processamento industrial (Freire-Filho *et al.*, 1999).

Comparativamente a outras culturas, pode-se considerar o feijão macassar como ainda pouco melhorado, apesar da sua ampla variabilidade genética para praticamente todos os caracteres de interesse agrônômico (Teófilo *et al.*, 1989; 1990; Embrapa, 1990).

## **2.7- Marcadores no Melhoramento do Caupi**

### **2.7.1- Marcadores Morfológicos**

O uso de marcadores morfológicos com a finalidade de selecionar caracteres quantitativos e qualitativos de interesse em plantas constitui-se em uma estratégia tradicionalmente usada por melhoristas para obtenção de novas variedades adequadas às necessidades do mercado (Millach, 1991).

O método de descritor morfológico foi primordialmente proposto em 1923 e continua sendo amplamente usado até hoje, apesar de suas limitações. A principal limitação enfrentada no uso deste tipo de marcador diz respeito à dificuldade de caracterização quando as bases genéticas dos cultivares são muito próximas (Smith e Smith, 1992) Limitações adicionais relacionadas ao número reduzido de marcadores fenotípicos disponíveis e na ausência de ligações destes com os caracteres de interesse econômico (Pecchioni *et al.*, 1996).

### **2.7.2- Marcadores Isoenzimáticos**

Apesar de possuírem muitos dos atributos necessários a um bom marcador, os marcadores isoenzimáticos não se apresentam em número suficientemente grande para auxiliar no mapeamento de todo o genoma, o que impossibilita um mapeamento de alta densidade (Winter e Kahl, 1995).

Usando marcadores isoenzimáticos em *V. unguiculata* var. *unguiculata*, Pasquet (2000) conseguiu melhores resultados quanto ao número de loci polimórficos, quando

Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.

comparado aos dados dos trabalhos de Panella e Gepts (1992) e Vaillancourt *et al.* (1993). Tal ocorrência pode ser explicada pela maior quantidade e diversidade de acessos utilizados, como também por um maior número de loci polimórficos estudados. Mesmo assim, o polimorfismo isoenzimático foi baixo comparado ao de outras espécies (Doebley, 1989 *apud* Menéndez *et al.*, 1997), particularmente considerando outras culturas de leguminosas tropicais. Talvez a ocorrência de um único evento de domesticação (Pasquet, 1999) como a adoção do sistema de cultivo onde a reprodução se efetue através da autopolinização, tenha ocasionado o baixo nível de bandas polimórficas sugerindo baixa variabilidade genética (Steele, 1972; Kumar *et al.*, 1976; Ladeinde e Bliss, 1977; Williams e Chambliss, 1980).

Mesmo assim, nem todos os marcadores isoenzimáticos nem sempre conseguem detectar polimorfismos intra-específicos quando a base genética é muito estreita. Para algumas culturas, como o grão-de-bico, foi preciso recorrer a um cruzamento com uma espécie selvagem próxima para aumentar o grau de polimorfismo para fins de estudos mais elaborados, como um mapa genético de alta resolução (Winter *et al.*, 2000).

### **2.7.3- Marcadores Moleculares de DNA**

Borém (1998) salienta a importante contribuição que os marcadores moleculares prestam ao melhoramento de plantas no sentido de agregar maiores informações ao estudo Mendeliano e quantitativo das espécies de interesse. Isto decorre do fato de que a genética quantitativa, mesmo sendo até hoje a ferramenta mais usada para o melhoramento de plantas, informa somente superficialmente sobre a estrutura do genoma.

#### **2.7.3.1- Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma**

A análise genética da diversidade e da relação entre ou dentro diferentes espécies, populações e indivíduos é um tema central de várias disciplinas das Ciências Biológicas. Especialmente durante a última década, estratégias clássicas de avaliação da variabilidade genética, como anatomia comparativa, morfologia, embriologia e fisiologia, foram complementadas por técnicas moleculares com grande sucesso. Essas incluem a análise de compostos químicos e especialmente de macromoléculas. Os chamados marcadores moleculares, os quais são baseados em polimorfismos encontrados em proteínas ou no DNA, facilitaram

Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.

grandemente as pesquisas em várias disciplinas, como a taxonomia, filogenia, ecologia, genética e melhoramento vegetal (Weising *et al.*, 1995; Kumar, 1999; Hedrick, 2001).

Em função da crescente necessidade de um maior empenho na resolução de problemas no melhoramento genético de plantas cultivadas, existe a necessidade de obtenção de uma melhor caracterização de germoplasma dessas plantas, incluindo o conhecimento da organização genômica e cromossômica, de forma a associar marcadores genéticos às características fenotípicas importantes para o melhoramento vegetal, um trabalho de extrema importância (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

### **2.7.3.2- Tipos de Marcadores de DNA e Aplicações**

Weising *et al.* (1995) efetuaram uma ampla revisão bibliográfica dos marcadores classificados como impressão digital do DNA (*Fingerprinting* de DNA). Tais marcadores são considerados altamente informativos, em vista da complexidade de locos que acessam concomitantemente, prestando-se para distinguir inclusive indivíduos proximamente relacionados. Os autores destacam que além do uso de enzimas de restrição, a metodologia de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), associada à hibridização de fragmentos com microsátélites, tem em muito colaborado para o refinamento das análises, resultando em um considerável aumento no número de polimorfismos e em reprodutibilidade considerável.

Vários exemplos de aplicação de impressão digital de DNA na genética de populações, bem como na ecologia e sistemática, têm sido descritos na literatura. Entre estes se destacam estudos com a metodologia de RAPD (*Random Amplified Polymorphism of DNA*), ou polimorfismos de DNA amplificado ao acaso (Weising *et al.*, 1995). Este tipo de marcadores foi usado, por exemplo, para detectar as variações existentes entre indivíduos e populações de duas espécies leguminosas arbóreas (*Gliricidia sepium* e *G. maculata*) nativas da América Central e do México, parcialmente influenciadas pelo homem em vista do seu extrativismo e cultivo para extração de madeira (Chalmers *et al.*, 1992). Os resultados evidenciaram populações notadamente monomórficas para todos os iniciadores (*primers*) avaliados na região de cultivo-extrativismo, enquanto as populações naturais apresentavam altos níveis de polimorfismo, confirmando avaliações morfológicas e estudos morfométricos previamente realizados. Aparentemente, a área que sofreu influência antrópica foi selecionada unidirecionalmente, decorrendo em um decréscimo da diversidade.

Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.

A análise de impressão digital de DNA (DAF ou DNA Amplification Fingerprinting) também pode esclarecer alguns aspectos sobre a origem das plantas ocorrentes em alguns ambientes. Um exemplo clássico encontra-se na espécie *Microseris pygmaea*, a qual ocorreria espontaneamente no Chile, havendo a hipótese de que sua introdução teria se dado a partir de uma única semente trazida da América do Norte. Enquanto isoenzimas revelaram apenas baixos níveis de variabilidade, hibridização pós-restrição do DNA com o microsátelite GATA resultou em impressão digital altamente polimórfica, contrariando a hipótese anterior (Houten *et al.*, 1991).

A metodologia de DAF tem sido empregada em outras culturas, sendo considerada uma poderosa ferramenta na identificação individual, avaliação do grau de parentesco entre indivíduos, construção de mapas de ligação e nas análises do genoma humano (Caetano-Anollés *et al.*, 1991), aplicando-se também ao estudo da variabilidade em diversas culturas, incluindo leguminosas como o grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) (Winter *et al.*, 2000; Benko-Iseppon *et al.*, 2003), destacando-se como vantajosos sobre o método de RAPD, uma vez que geram um grande número de bandas polimórficas de inquestionável reprodutibilidade.

O DAF foi proposto por Caetano-Anollés *et al.*, (1991) e se caracteriza pela utilização de primers curtos com até cinco nucleotídeos para a amplificação de fragmentos através da PCR. Estes fragmentos são separados por eletroforese em gel de poliacrilamida ou agarose e, posteriormente, as bandas são reveladas através da coloração por nitrato de prata ou brometo de etídio.

O resultado final é a visualização de um padrão de DNA característico e altamente informativo. Depois, em Caetano-Anollés (1994) há a proposta de se agregar um mini-grampo ao primer na posição 5' com a finalidade de aumentar o nível de polimorfismo e permitir a visualização até mesmo daquelas bandas que aparecem muito fracas quando usado o primer linear simples. Foi detectado que estes mini-grampos associados a primers curtos (3 nt) ajudam na detecção de polimorfismo, uma vez que possuem influência na amplificação e, conseqüentemente, na complexidade da impressão digital. Apesar da incrível mobilidade eletroforética alcançada pelos produtos da amplificação quando usados primers com mini-grampos, não há relação entre esta e a eficiência da amplificação na análise DAF (Caetano-Anollés e Gresshoff, 1996).

Menéndez *et al.* (1997) construíram um mapa genético do feijão-de-corda a partir do cruzamento de duas linhagens domesticadas provenientes dos EUA e da África. Neste cruzamento a metodologia de RAPD detectou duas vezes mais polimorfismos que as feitas com AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) ou polimorfismo de tamanho de fragmentos

Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.

amplificados e RFLP. No entanto, nenhum estudo foi efetuado até o momento visando a aplicação de marcadores moleculares na construção de um mapa genético a partir de um cruzamento de linhagens adaptadas às condições do Nordeste brasileiro. Na construção de um mapa de ligação mais eficiente, se faz necessária uma combinação adequada dos parentais para a população que servirá de base para o mapeamento (Winter *et al.*, 2000).

Para o Nordeste brasileiro ainda há poucas espécies analisadas com a metodologia de impressão digital de DNA. Destaca-se um estudo prévio com a metodologia de DAF em cultivares selvagens e domesticados de feijão *Vigna*, incluindo o feijão de corda, supostamente introduzido da África e domesticado em várias regiões pelos sertanejos nordestinos. O estudo em questão revelou uma variabilidade acima da esperada para o nível intra-específico (Simon *et al.*, 2002), provavelmente devido às pressões de seleção exercidas pelo diferentes grupos de pequenos produtores, associadas às condições extremas do ambiente (Simon *et al.*, 2002; Benko-Iseppon, 2001).

Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.

#### **4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Araújo JPP, Rios GP, Watt EE, Neves BP, Fageria NK, Oliveira IP, Guimarães CM and Silveira-Filho A (1984) Cultura do Caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp; descrição e recomendações técnicas de cultivo. EMBRAPA, Circular Técnica. pp 18-82.

Arora RK (1985) Diversity and collection of wild *Vigna* Species in India. Plant Genetic Resources Newsletter 63:26-33.

Barreto PD (1999) Recursos genéticos e programa de melhoramento de feijão-de-corda no Ceará: Avanços e perspectivas. In: De Queirós MA, Goedert CO e Ramos SRR (eds) *Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro*. EMBRAPA, CPATSA, Petrolina.

Benko-Iseppon AM, Winter P, Huettel B, Staginnus C, Muehlbauer FJ, Kahl G (2003) Molecular markers closely linked to fusarium resistance genes in chickpea show significant alignments to pathogenesis related genes located on *Arabidopsis* chromosomes 1 and 5. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 379-386.

Benko-Iseppon AM (2001) Estudos moleculares e citogenéticos no caupi em espécies relacionadas: Avanços e perspectivas. 1:327-332. V Reunião Nacional do Caupi - V RENAC. Piauí, Brasil.

Borém A (1998) Melhoramento de plantas. 2ª edição. Editora UFV. Viçosa, 453 pp.

Caetano-Anollés G, Bassam BJ and Gresshoff PM (1991) DNA amplification fingerprinting using short arbitrary oligonucleotide primers. *BioTechnology* 9: 553-557.

Caetano-Anollés G and Gresshoff PM (1994) DNA amplification fingerprinting using arbitrary mini-hairpin oligonucleotide primers. *BioTechnology* 12: 619-623.

Caetano-Anollés G and Gresshoff PM (1996) Generation of sequence signatures from DNA amplifications fingerprinting with mini-hairpin and microsatellite primers, *BioTechnics* 20:1044-1056.

Chalmers KJ, Waugh R, Sprent L, Simons AJ, Powel W (1992) Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity* 69: 465-472.

Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.

Ehlers JD and Hall AE (1997) Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). Field Crops Research 53: 187-204.

EMBRAPA, Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual de Teresina (PI). (1979). In: *Relatório as III reunião anual de avaliação e programação de pesquisa com feijão Vigna (Região Norte e Nordeste)*. Teresina, não paginado.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (1981). *Programa Nacional de Pesquisas de Feijão*. EMBRAPA - DID, Brasília, pp. 117.

EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (1982) Variabilidade de cultivares de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) para resistência à seca. Comunicado Técnico 32:1-5.

EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (1990) Catálogo descritivo de germoplasma de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). EMBRAPA-CNPAP. Documentos 31:16, Goiânia, Brasil.

Faris DG (1965) The origin and evolution of the cultivated forms of *Vigna sinensis*. Canadian Journal of Genetics and Cytology 7: 433-452.

Ferreira ME e Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª. Ed. EMBRAPA-CENARGEM, Brasília, 220 pp.

**Fery FL (2002) New opportunities in *Vigna*. In: Janick J and Whipkey A (eds) Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA, pp 424–428.**

Freire-Filho FR, dos Santos AA, Mesquita RC, Ribeiro VQ e da Silva PHS (1978) Comportamento de 25 cultivares de feijão caupi (*Vigna sinensis* (L.) Savi.) no estado do Piauí. EMBRAPA - UEPAE Comunicado Técnico 6:1-15.

Freire-Filho FR, Cardoso MJ, de Araújo AG, dos Santos AA e da Silva PHS (1981) Características botânicas e agronômicas de cultivares de feijão macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). EMBRAPA-UEPAE Boletim de Pesquisa 4:40.

Freire-Filho FR, Ribeiro VQ, Barreto PD and Santos CAF (1999) Melhoramento genético do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) na região Nordeste. In: De Queirós MA, Goedert CO

Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.

and Ramos SRR (eds.) Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro. EMBRAPA - CPATSA, Petrolina, Brasil.

Ghafoo A, Sharif A, Ahmad Z, Zahid MA and Rabbani MA (2001) Genetic diversity in blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper). Field Crops Research 69: 183-190.

Gonçalves MFB and Lima JAA (1982) Efeitos do "Cowpea Severe Mosaic Virus" sobre a produtividade do feijão-de-corda. Fitopatologia 7: 547.

Guazelli RJ (1988) Histórico das pesquisas com caupi no Brasil. In: De Araújo JPP e Watt EE (eds) O caupi no Brasil. IITA, EMBRAPA – CNPAF, Brasília, pp 26-46.

Hedrick PW (2001) Conservation genetics: where are we now. Trends Ecol. & Evolution 16(11): 629.

Krutman S, Vital AF and Basto, EG (1968) Variedades de feijão macassar "Vigna sinensis": características e reconhecimento. IPEANE. 46 pp.

Kumar P, Prakash R and Haque MDF (1976) Floral biology of cowpea (*Vigna sinensis* L.). Trop Grain Legume Bull 6:9- 11.

Kumar LS (1999) DNA markers in plant improvement: an overview. Biotechnology Advances 17: 143-182.

Ladeinde TAO and Bliss FA (1977) Identification of the bud stage for pollinating without emasculation in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Niger J. Science 11:183-194.

Lima JAA and Nelson MR (1977) Etiology and epidemiology of mosaic of cowpea in Ceará, Brazil. Plant. Dis. Rep. 61: 864-867.

Lima JAA and Santos AA (1988) Viral diseases of cowpea in Brazil. In: Watt EE and De Araújo JPP (eds) Cowpea research in Brazil. IITA, EMBRAPA, Brasília, pp 213-232.

Lush WM (1979) Floral morphology of wild and cultivated cowpeas. Econ. Bot. 33:442-447.

Maréchal R, Mascherpa JM and Stainier F (1978) Étude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces de genres *Phaseolus* et *Vigna* (*Papilionaceae*) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. Boissiera 28: 1-273.

May PH, Teixeira SM and Santana AC (1988) Cowpea production and economic importance in Brazil. In: Watt EE and De Araújo JPP (eds) Cowpea research in Brazil. IITA, EMBRAPA, Brasília, pp 31-62.



- Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.
- Menéndez CM, Hall AE and Gepts P (1997) A genetic linkage map of cowpea (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between two inbred domesticated lines. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 1210-1217.
- Millach SCK (1991) Marcadores Moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. 91: 481-488.
- Ng NQ and Maréchal R (1985) Cowpea taxonomy, origin and germplasm. In: Singh SR e Rachie KO (eds) *Cowpea research, production and utilization*. John Wiley Chichester, pp 11-21.
- Ng NQ (1990) Recent developments in cowpea germoplasm collection, conservation, evaluation and research at the genetic resources unit, IITA. In Ng NQ & Monti LM (eds) *Cowpea genetic resources*, pp13-28. IITA, Ibadan.
- Padulosi S, Ng QN and Perrino P (1997) Origin, taxonomy and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: Sigh BB and Raj M (eds) *Advances in cowpea research*.
- Paiva JB, Carmo CM, Tavora FJA, Almeida FG, Sampaio S, de Moura WP, Sales JC, Palhano JG, Oliveira FI, Sampaio A and Santos JAR (1970) Melhoramento, experimentação e fitossanidade com feijão (*Vigna simensis*), realizadas no estado do Ceará (1967/68). *Pesquisa Agropecuária do Nordeste* 2: 99-113.
- Paiva JB, dos Santos JR, de Oliveira FJ and Teófilo EM (1977). 1ª Reunião regional de programação de pesquisa de caupi. CCA/UFC, Fortaleza, pp 39.
- Panella L and Gepts P (1992) Genetic Relationships with *Vigna unguiculata* (L.) Walp. based on isozyme analyses. *Genet Res Crop Evol* 39:71-88.
- Pant KC, Chandel KPS and Joshi BS (1982) Analysis of diversity in India Cowpea Genetic Resources. *SABRO J.* 14:103-111.
- Pasquet RS (1996) Cultivated cowpea (*Vigna unguiculata*): genetic organization and domestication. In: *Advances in Legume Systematics 8: Legumes of Economic Importance*. Royal Botanic Gardens, Kew, eds. pp 101-108.
- Pasquet RS (1999) Genetic relationships among subspecies of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. based on allozyme variation. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1104-1119.
- Pasquet RS (2000) Allozyme diversity of cultivated cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 211-219.
- Pecchioni N, Faccioli P, Moneti A, Stanca AM and Terzi V (1996) Molecular markers for genotype identification in small grain cereals. *J. Genet. Breed.* 50: 203-219.

- Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.
- Rawal KM (1975) Natural hybridization among wild, weedy and cultivated *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Euphytica* 24: 699-707.
- Rios, G.P. and Watt, E.E. (1980). Identificación de fuentes de resistencia a las principales enfermedades de caupi, (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Fitopatologia* 15: 24.
- Rios GP, Watt EE, Araújo JPP and Neves BPD (1982) Identification of sources of resistance to the principal disease of Southern pea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) in Brazil. *Ann. Rep. Bean. Inprov. Coop.* 23: 106.
- Santalla M, Power JB and Davey MR (1998) Genetic diversity in mung bean germplasm revealed by RAPD markers. *Plant Breeding* 117: 473-478.
- Simon MV, Resende LV, Iseppon AMB, Winter P e Kahl G (2002) Aplicabilidade do fingerprinting de DNA na determinação da diversidade genética intra e interespecífica do gênero *Vigna*. *Horticultura Brasileira* 20(2): 1-5.
- Smartt J (1985) Evolution of grain legumes. III. Pulses in the genus *Vigna*. *Exp. Agric.* 21: 87-1000.
- Smith JSC and Smith OS (1992) Fingerprinting crop varieties. *Advances in Agronomy* 47: 85-140.
- Stace-Smith R (1981) Comovirus. IN: Kurstak, E. (ed) *Handbook of Plant Virus Infection Comparative Diagnosis*. Elsevier, Amsterdam, pp 171-895.
- Steele WM (1986) Cowpea: *Vigna unguiculata* (Leguminosae-Papilionatae). In: Simonds NW (ed) *Evolution of Crop Plants*. Longmans, London, pp. 183-185.
- Steele WM (1972) Cowpea in Nigeria. PhD Thesis. University of Reading, UK.
- Steele WM and Mehra KL (1980) Structure, evolution and adaptation to farming systems and environment in *Vigna*. In: Summerfield RJ and Bunting AH (eds) *Advances in Legume Science*. Royal Botanic Gardens, pp 459-468.
- Teófilo EM, Paiva JB and Vidal MJ (1989) Estudo de caracterização e renovação de estoque de 143 cultivares de feijão-de-corda, *Vigna sinensis* (L.) Savi. In: Relatório de Pesquisa 1987: criação e difusão de novos cultivares de feijão-de-corda para o estado do Ceará. Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias UFC/CCA/FCPC (eds), Fortaleza, pp 1-18.

Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.

Teófilo EM, Paiva JB and Vidal MJ (1990) Renovação de estoque e caracterização de 94 cultivares de feijão-de-corda (*Vigna sinensis* (L.) Savi). In: Relatório de pesquisa 1988: Criação e difusão de novos cultivares de feijão-de-corda para o estado do Ceará. Universidade Federal do Ceará. Centro de Ciências Agrárias UFC/CCA/FCPC (eds), Fortaleza, pp 1-5.

Umaharan P, Ariyanayagan RP and Haque SQ (1997) Genetic analysis of pod quality characteristics in vegetable cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Scientia Horticulturae* 70: 281-292.

Vaillancourt RE, Weeden NF and Barnard J (1993) Isozyme diversity in the cowpea species complex. *Crop. Sci.* 33 : 606-613.

Verdcourt B (1970) Studies in the *Leguminosae-Papilionoideae* for the flora of tropical East Africa. IV. *Kew Bulletin* 24: 507-569.

Watt EE (1978) First annual report on the Embrapa/IITA. In: Cowpea Program in Brasil, Embrapa-CNPAF (ed), Goiânia, pp 55.

Watt EE and Araújo JPP (1988) Cowpea research in Brazil, IITA, Embrapa, Brasília, pp 79-92.

Weising K, Nybom H, Wolff K and Meyer W (1995) DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press Ind., Florida, pp 322.

Willians CB and Chambliss OL (1980) Outcrossing in southernpea. *Hortscience* 15:179.

Winter P, Benko-Iseppon AM, Hüttel B, Ratnaparkhe M, Tullu A, Sonnante G, Pfaff T, Tekeoglu M, Santra D, Kahl G and Muehlbauer FJ (2000) An integrated map of the chickpea genome. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 1155-1163.

Winter P & Kahl G (1995) Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11: 438-448.

## 5. Manuscrito

### **Preliminary Characterisation of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Accessions by DAF (DNA Amplification Fingerprinting)**

### **Caracterização Preliminar de Acessos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. pela metodologia de DAF (Impressão Genômica da Amplificação do DNA)**

A ser submetido à revista

***Genetics and Molecular Biology***

Ribeirão Preto, SP, Brasil

---

# **Preliminary Characterisation of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Accessions by DAF (DNA Amplification Fingerprinting)**

**Fabiola Spiaggia and Ana Maria Benko-Iseppon**

Universidade Federal de Pernambuco, CCB, Dept. Genetics, 50732-970, Recife, PE. E-mail: [celisep@hotmail.com.br](mailto:celisep@hotmail.com.br)

---

## **Abstract**

Genetic characterisation of germplasm accessions is very important for gene bank managers, since it allows more efficient sampling of the available resources, improved identification of the genetic variation for breeders and also a better management of the available gene pool. Here we describe our findings by application of DAF (DNA Amplification Fingerprinting) methodology to discriminate cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) germplasm accessions. A total of 30 genotypes have been analysed, including 28 accessions of cowpea, one accession of *V. angularis* (Willd.) Ohwi et Ohashi and one accession of *V. umbellata* (Thumb.) Ohwi et Ohashi, all from germplasm banks in Brazil (27 accessions), Germany (two accessions) and USA (one accession). Nine random (10-mers) primers were used, with an average of 7,8 bands and 5,2 polymorphisms per primer. The resulting data-matrix included 69 analysed bands with a total of 1342 characters. The dendrogram generated by the UPGMA analysis was able to distinguish cowpea from the remaining species and also to evidence some diversity at the intraspecific level. The implications of the present evaluation and future prospects for cowpea breeding are discussed in the present work.

---

**Keywords:** Cowpea · *Vigna* · Molecular markers · Crop evolution · Genetic diversity · Germplasm characterisation

## **1. Introduction**

Molecular studies of cultivated plants and their wild relatives bring important evidences to the establishment of breeding strategies, specially when interspecific crosses are necessary for mapping purposes or for the incorporation of new features (Benko-Iseppon, 2001).

Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.

Cowpea (*V. unguiculata* L. Walp.) is widely cultivated throughout the world. Particularly in the developing countries of South America, Africa and Asia, where plant proteins comprise 83 % of total dietary protein (Mahe et al., 1994), it represents one of the best hopes for combating shortage in food supply.

Called "*feijão-macassar*" or "*feijão-de-corda*" in Northeastern Brazil, cowpea is an important component of Brazilian diet and agricultural production (May et al., 1988; Freire-Filho et al., 1999). Having superior nutritional qualities to dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.), it is the main constituent of the daily diet of the economically depressed rural class in North and Northeastern Brazil (Freire-Filho et al., 1999). Especially in the semiarid regions of Northeast Brazil, where dry beans do not grow, cowpea constitutes the most important food legume (Freire-Filho, 1988; Freire-Filho et al., 1999), representing 73 % of all beans consumed and nearly 10 % of total agronomic production value.

DAF methodology is a simple and powerful method for generating molecular markers, with the additional advantage of being relatively low-priced and highly reproducible (Winter et al., 2000; Benko-Iseppon et al., 2003; Rakshit et al., 2003).

Since countries in development need to embrace new technologies to overcome consumer needs for better food with accessible prices, we started testing DAF methodology and its applicability to characterise 28 cowpea genotypes as compared with two other *Vigna* species (*V. angularis* (Willd.) Ohwi et Ohashi and *V. umbellata* (Thumb.) Ohwi et Ohashi).

## **2- Materials and Methods**

### **Plant Material and DNA extraction**

The plants have been cultivated in pots with 5-kg soil capacity containing a mixture of two parts of soil and one part of manure. Prior to their sowing the seeds have been disinfected with 4% sodium hipocloride.

Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.

After germination four plants per pot have been maintained, which remained in the glasshouses until their processing. DNA was isolated from young leaflets using a modified CTAB (cetyl-trimethyl-amoniumbromide) protocol (Weising et al., 1995). Contaminating polysaccharides were selectively precipitated (Michaels et al., 1994). Since high amounts of RNA have been detected, an additional step of DNase digestion was carried out as described by Sambrook et al. (1989). DNA concentrations were determined electrophoretically using known amounts of phage  $\lambda$ -DNA as a reference.

### **DNA amplification fingerprinting and electrophoresis**

DAF followed the procedure of Caetano-Anollés et al. (1991) with some modifications introduced by Winter et al. (2000) as follows: PCR was carried out using random primers procured from Eurogentec (Cologne, Germany), Operon Technologies (Alameda, USA) or Roth (Karlsruhe, Germany), respectively. Each 15  $\mu$ l PCR reaction contained 1.5  $\mu$ l 10x PCR buffer (Eurogentec, Cologne, Germany), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM dNTP-mix; 0.4 U "Silverstar" *Taq* DNA polymerase (Eurogentec Cologne, Germany), 40 pmol oligonucleotide primer, and 1 ng/ $\mu$ l of template DNA. The DNA was first denatured for 2 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s denaturation at 95°C, 1 min annealing at 35°C and 2 min elongation at 72°C, with a final elongation at the same temperature for 2 min. The reaction products were separated on 1.8% agarose gels stained with ethidium bromide and viewed under ultraviolet light.

### **Data analysis**

A data matrix was constructed from the analysis of the bands generated by DAF and visualised after agarose gel electrophoresis. For this purpose, we considered the presence (a) or absence (b) of each analysed band for each of the studied individuals. Dubious or faint bands have been excluded of the analysis, being designated by the letter "n" in order to not influence evaluation.

Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.

The UPGMA analysis was carried out with aid of the software MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) version 2.0 for Windows, kindly provided by the authors (Kumar et al., 1993). The bootstrap option of the program was used in order to assess reliability of the tree obtained. The generated tree was viewed with the program TREEVIEW32 for Windows (Page 1996), kindly provided by Dr. Robert Page of the Glasgow University, Scotland.

### **3- Results**

The analysed genotypes included 30 accessions of three different *Vigna* species (one of *V. angularis*, one of *V. umbellata*, and 28 accessions of *V. unguiculata*) received from four different germplasm banks as described in Table 1.

The most informative primers considering total number of bands and total number of polymorphisms were OP-C03 (12 bands, nine polymorphic) and OP-G06 (14 bands, six polymorphic). The primer OP-A14 revealed the lower number of amplicons, generating three bands and only two polymorphisms. Figure 1 shows two representative pictures of amplification products including a very informative primer (OP-G06) and a less informative one (OP-A14). Table 2 presents a list of the primers used, including their sequence, number of generated and polymorphic bands.

A total of 70 bands have been generated, from which 47 beared polymorphisms. In average, the primers generated a total of 7,8 bands and 5,2 polymorphisms per primer.

The resulting data-matrix included 69 analysed bands with a total of 1342 characters. The dendrogram generated by the UPGMA analysis is presented in Figure 2. The generated tree presented two major branches with cultivar the 'Vita 7' as outgroup.



## 4- Discussion

The present work represents the first molecular evaluation regarding 21 Brazilian germplasm accessions of *V. unguiculata* (Table 1) and includes important material for local breeding programs.

Despite the low number of primers used, the DAF methodology was very efficient in generating molecular markers for this first evaluation, a result that confirms previous evidences presented by Simon (2002).

Since Simon used a higher number of primers (26) selected from a total of 262, the average number of polymorphism per primer was superior with 13,6 bands/primer, against 7,9 in the present work.

Santalla et al. (1998) analysed 22 *Vigna* genotypes of three different taxa (*V. mungo* L. Hepper, *V. luteola* (Jacq.) Benth. and *V. radiata* L. Wilcz ssp. *sublobata* (Roxb.) Verdc.) by RAPD (Random Amplified Polymorphism do DNA). From the 60 primers they used 32 were monomorphic and only 26 generated polymorphisms in an average of 8,2 markers per primer, a similar result to the present work. Considering the low number of primers we used and the previous results of Simon (2003) it is clear that DAF is more effective for generating markers in the genus *Vigna*, as compared with RAPD.

The same conclusion was presented in previous works with Chickpea (*Cicer arietinum* L.) a cultivated leguminous of the same family as *Vigna* (Fabaceae). In mapping studies of this crop RAPD showed most pronounced segregation distortion as compared with DAF and other five types of molecular markers. Additionally segregation of markers was not completely reproducible with RAPD, opposite to the observation of the authors regarding DAF markers (Winter et al., 2000; Benko-Iseppon et al., 2003; Rakshit et al., 2003). On the basis of our observations and previous reports, we consider DAF to be the marker of choice for future cowpea breeding programs.

Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.

Previously to the present work and the study of Simon (2002) the only approach to evaluate genetic diversity of cowpea germplasm banks with molecular markers was based on isoenzymatic polymorphisms carried out by Pasquet (1996a, 1996b, 2000) that analysed wild and cultivated accessions. Despite the application of many enzymatic systems, the author found few polymorphisms between cultivated accessions and only discrete variability among geophaphic clusters. Comparing these results with both studies carried out with DAF by our group, it is also clear that this type of markers is advantageous, since it allowed the distinction of some accessions from their near relatives, as it is the case of the accessions IPA 204, 205 and 206 that remained in the same branch but could be distinguished from each other. The same can be affirmed regarding the cultivars 'BR5-Maratoa' and 'BR5-Rouxinol', two related cultivars that differ on the basis of selection for different agronomical features.

A most complex and laboured type of marker are microsatellite markers. Li et al. (2001) used 46 primer pairs developed to microsatellites to discriminate 90 cowpea breeding lines developed at IITA (International Institute for Tropical Agriculture, Nigeria). They generated a total of 27 polymorphisms that, despite the low number of features, generated a cladogram able to distinguish most of the lines. Considering the time consumption of this method and the number of features generated we consider more advisable to recommend this type of marker for mapping purposes, especially considering their co-dominant segregation pattern that generate very robust markers.

Freire-Filho (1988) suggests that cowpea was introduced to Brazil from Europe and West Africa by European colonizers and African slaves during the 16<sup>th</sup> and 17<sup>th</sup> centuries. Simon (2002) suggested that the considerable levels of polymorphisms found in her work could have arisen during the last four centuries of recurrent selection and the influence of local environmental conditions. We agree with both hypothesis, but one should also consider the genotypes introduced from other countries for breeding purposes in the course of the decade of 1970 and later. Some of the most important cowpea

Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.

cultivars have been obtained from crossing procedures to introduced material from IITA, contributing to an increase of diversity in the locally used gene pool.

Despite the considerations above, considering the present approach and the previous work of Simon (2002), it is clear that the intraspecific diversity of *V. unguiculata* is higher than that observed in other legume crops, as for example Chickpea ((Winter et al., 2000; Benko-Iseppon et al., 2003; Rakshit et al., 2003) or Soybean (*Glycine max* L.) (Anollés and Gresshof, 1994).

Comparing the branching pattern of both dendrograms generated by approaches of our group, i.e., present work and that of Simon (2002) it is clear that the dendrogram of Simon is most robust, especially considering the higher number of features (bands) analysed by the author.

Even considering this limitation and the preliminary nature of the present work, some similarities can be recognized comparing both works, regarding the branching pattern. For example both species *V. angularis* (accession PHA 8023/79) and *V. umbellata* (PHA 8126/76) remained together in the same branch in both evaluations, even though in the evaluation of Simon (2002) they occupied a basal position as compared with the remaining cowpea genotypes. Also similar grouping of genotypes can be observed for the cowpea accessions IPA-204, 205 and 206.

Considering the cowpea genotypes analysed here for the first time, some interesting observations can be done regarding the branching. Both African accessions from IITA (IT82G9 and IT91K1182) remained close together in a basal position in the main branch where most of the Brazilian cultivars and accessions grouped, confirming the influence of introduced material in Brazilian recent breeding programs. On the opposite, the Californian accession RiPIT8452049 (received from the University of California, Riverside) was positioned in a higher position in the same branch, what can be explained by the advanced stage that breeding programs on this crop have been carried out by the group of Riverside, especially considering that the field selection of the Californian group is directed to features and

Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.

environmental conditions very different from that existing in tropical countries.

It is also interesting to discuss the position of the cultivar 'Manaus' in a basal position of the main branch generated by the present evaluation. It has been considered that cowpea was first introduced to Brazilian coast region and that it was introduced later to the Amazonian region by migrating people from Brazilian northeastern region (Guazelli, 1988). Meanwhile cowpea is a very important crop in that region, especially for subsistence agriculture, since *Phaseolus* beans do not grow in the environmental conditions of the Amazonian region (EMBRAPA, 1979). The position of this cultivar in a basal position as compared with the remaining accessions and almost intermediary to both branches may suggest that its introduction occurred very early and that its original features have been maintained throughout the years.

Many cultivars obtained from small communities as it seem to be the case of 'Monteiro', 'Cacheado', 'Canapu', 'Capela' and 'Corujinha' grouped in a most basal branch together with some accessions derived from crossing procedures, as CE315, MNC15141 and TE97321G8. We have requested the pedigrees of the analysed genotypes and it is to suppose that this knowledge will support the present branching, since many crosses have been carried out using such cultivars, especially in the search for sources of resistance to pathogens.

The present work is a further step to support cowpea-breeding projects in Brazil with molecular markers. The perspectives seem very promising and shall be still more successful with the integration of morphological features to the data matrix. Additionally it is intended to saturate the existing matrix with further molecular markers and also to link the present work to that carried out by Simon (2002) to achieve a most complete picture of the existing cowpea gene pool for breeding purposes.

## **5- Acknowledgements**

Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.

**This project was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Volkswagen Foundation (Bonn, Germany), DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) and FACEPE (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Pernambuco)**. The authors are grateful to Dr. Francisco Rodrigues Freire-Filho (EMBRAPA MEIO-NORTE) and Jeff Ehlers (University of California) for supplying the seed material used in this study. For Dr. Reginaldo de Carvalho and Ms. Anderson de Lima-Morais we thank for important advices and interesting discussions.

## **6- References**

Caetano-Anollés, G. and Gresshoff, P.M. (1994). DNA amplification fingerprinting of plant genomes. *Methods In Molecular and Cellular Biology* 5:62-70(1994).

Benko-Iseppon, A.M., Winter, P., Huettel, B., Staginnus, C., Muehlbauer, F.J., Kahl, G. (2003). Molecular markers closely linked to fusarium resistance genes in chickpea show significant alignments to pathogenesis related genes located on Arabidopsis chromosomes 1 and 5. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 379-386.

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (1979). Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual de Teresina (PI). In: Relatório as III Reunião Anual de Avaliação e Programação de Pesquisa com Feijão Vigna (Região Norte e Nordeste). Documentos 31, 16pp.

Rakshit, S., Winter, P., Tekeoglu, M., Juarez Muñoz, J., Pfaff, T., Benko-Iseppon, A.M., Muehlbauer, F.J., Kahl, G. DAF marker tightly linked to a

Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.

major locus for Ascochyta blight resistance in chickpea (*Cicer arietinum* L.).  
*Euphytica* 132: 23-30.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3 (1989).

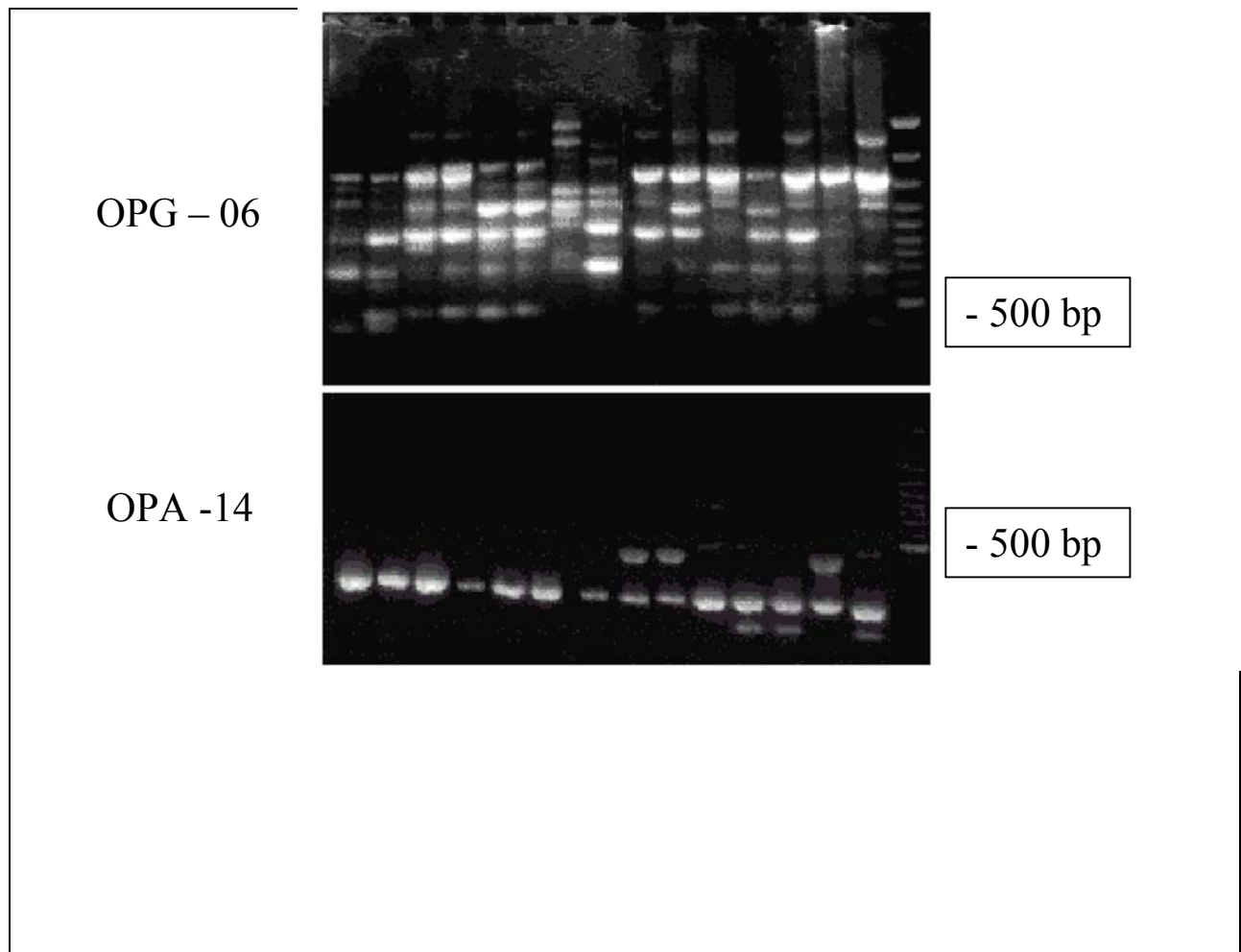
**Table 1:** List of analysed *Vigna* genotypes including name of species, accession number or cultivar name, germplasm bank and original area of cultivation. Legend for collaboration germplasm banks: **EMBRAPA/CPQMN** = Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias, Centro de Pesquisas do Meio Norte, Teresina, Piauí, Brasil; **IPA** = Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife, Pernambuco, Brazil; **IPK** = Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben, Germany; **UCA** = University of California, Riverside, USA. Cultivar names or numbers indicated as “**A**” were studied previously by Simon (2002). Remaining material (indicated as “**B**” are studied here for the first time.

Ord.	Species	Name of Cultivar or Accession Number	Germplasm Bank	Original source or area of cultivation
1.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	AR-87-435 <sup>B</sup>	EMBRAPA/CPQMN	Brazil
2.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	BR-17 Gurguéia <sup>A</sup>	EMBRAPA/CPQMN	Brazil
3.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	BR-2 Bragança <sup>B</sup>	EMBRAPA/CPQMN	Brazil
4.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	BR-5 Maratão <sup>B</sup>	EMBRAPA/CPQMN	Brazil
5.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	BR-5 Rouxinol <sup>B</sup>	EMBRAPA/CPQM	Brazil
6.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	Cacheado <sup>B</sup>	EMBRAPA/CPQMN	Brazil
7.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	Canapu 02 <sup>B</sup>	EMBRAPA/CPQMN	Brazil
8.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	Capela <sup>B</sup>	EMBRAPA/CPQMN	Brazil
9.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	Corujinha <sup>B</sup>	EMBRAPA/CPQMN	Brazil
10.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	Manaus <sup>A</sup>	EMBRAPA/CPQMN	Brazil
11.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	Monteiro <sup>B</sup>	EMBRAPA/CPQMN	Brazil
12.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	Princess Ann <sup>B</sup>	EMBRAPA/CPQMN	Brazil
13.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	Vagem Roxa – Piripiri <sup>B</sup>	EMBRAPA/CPQMN	Brazil
14.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	CE-315 <sup>B</sup>	EMBRAPA/CPQMN	Brazil
15.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	IT-82G-9 <sup>B</sup>	EMBRAPA/CPQMN	Brazil
16.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	IT-91K-118-2 <sup>B</sup>	EMBRAPA/CPQMN	Brazil
17.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	MNC-1514-1 <sup>B</sup>	EMBRAPA/CPQMN	Brazil
18.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	TE97-299G-24 <sup>B</sup>	EMBRAPA/CPQMN	Brazil
19.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	TE97-309G-4 <sup>B</sup>	EMBRAPA/CPQMN	Brazil
20.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	TE97-321G-8 <sup>B</sup>	EMBRAPA/CPQMN	Brazil
21.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	TE97-323G-4 <sup>B</sup>	EMBRAPA/CPQMN	Brazil
22.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	VITA-7 <sup>B</sup>	EMBRAPA/CPQMN	Brazil
23.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	IT-845-2049 (UCR 430) <sup>B</sup>	UCR	USA
24.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	CNC-0434 <sup>A</sup>	IPA	Brazil
25.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	IPA-204 <sup>A</sup>	IPA	Brazil
26.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	IPA-205 <sup>A</sup>	IPA	Brazil
27.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	IPA-206 <sup>A</sup>	IPA	Brazil
28.	<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.	Sempre Verde <sup>A</sup>	IPA	Brazil
29.	<i>V. angularis</i> (Willd.) Ohwi et Ohashi	PHA 8023/79 <sup>A</sup>	IPK	Asia
30.	<i>V. umbellata</i> (Thumb.) Ohwi et Ohashi	PHA 8126/76 <sup>A</sup>	IPK	Indonesia

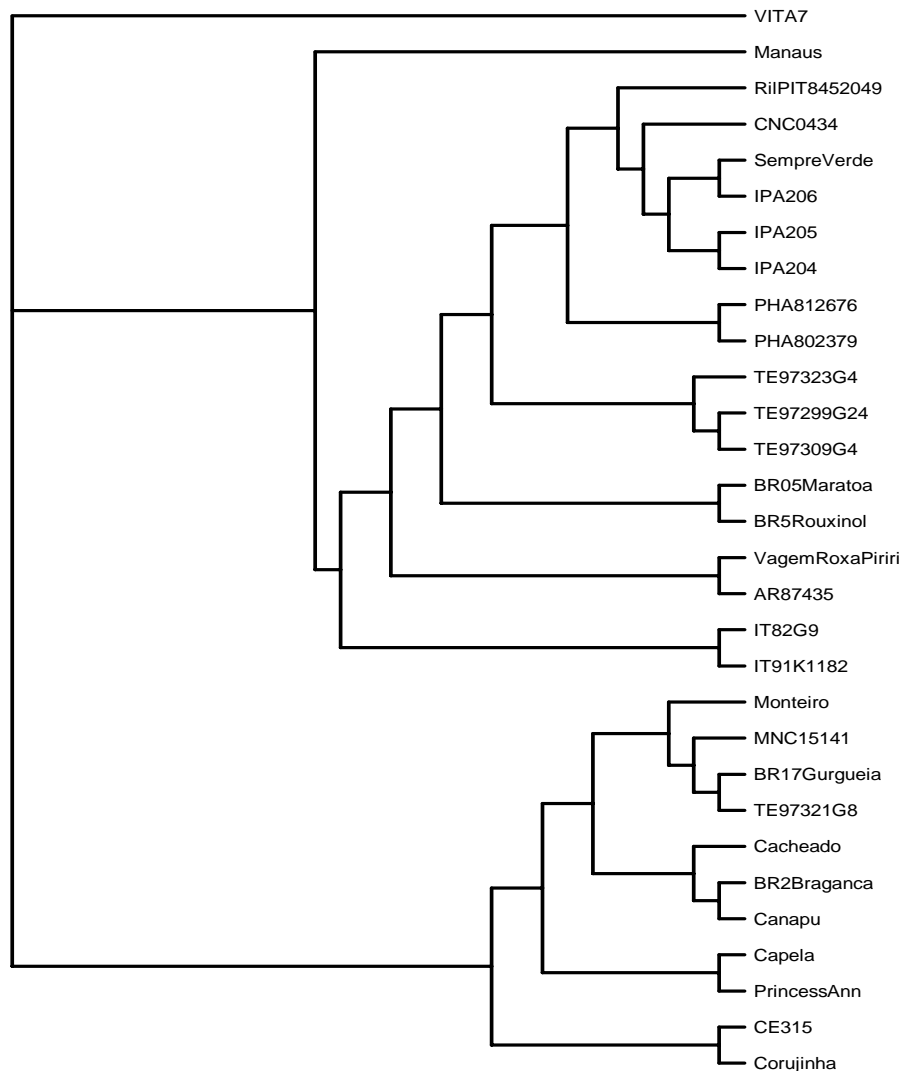
**Table 2.** Primers used in the DAF reactions including sequence composition, total number of generated bands and number of polymorphic bands.

Primer		Total Nr. of Bands	Number of Polymorphisms
Designation	Sequence (5' → 3')		
OP-A04	AATCGGGCTG	05	04
OP-A14	TCTGTCCTGG	03	02
OP-C03	GGGGGTCTTT	12	09
OP-C08	TGGACCGGTG	05	05
OP-C15	GACGGATCAG	11	05
OP-G05	CTGAGACGGA	06	06
OP-G06	GTGCCTAACC	14	06
OP-G10	AGGGCCGTCT	08	06
OP-G12	GAGCTCACGA	06	04
Average number of bands generated per primer		7,8	5,2





**Figure 1.** A representative picture of DAF products including a very informative primer (OPG-06) and a primer that displayed few bands (OPA-14). Order of the genotypes: Cowpea 1-6 and 9-15. *V. umbellata* (7) and *V. angularis* (8). Accession Numbers: **1**=IT-845-2049(UCR 430); **2**=CNC-0434; **3**=Sempre Verde; **4**=IPA-206; **5**=IPA-205; **6**=IPA-204; **7**=PHA 8126/76; **8**=PHA 8023/79; **9**=BR-5 Maratoã; **10**=BR-5 Rouxinol; **11**=IT-82G-9; **12**=IT-91K-118-2; **13**=TE97-299G-24; **14**=TE97-321G-8; **15**=TE97-323G-4. Fragment sizes for polymorphic bands (in bp) are indicated on the right, as calculated from a 100 bp ladder (last lane, M).



**Figure 2.** Consensus tree generated from DAF data using bootstrap method with the program MEGA V.2.0. For further information regarding the analysed genotypes see Table 1.

## 6. Conclusões

1. A metodologia de DAF mostrou-se eficiente na distinção de genótipos, mesmo considerando-se o limitado número de primers amostrados.
2. As duas espécies *V. angularis* e *V. umbellata* apresentaram-se proximamente relacionadas, confirmando estudos prévios.
3. Os acessos IPA 204, 205 e 206 são proximamente relacionados, confirmando dados anteriormente reportados.
4. O cultivar 'Manaus' posicionou-se em um clado basal em relação à maioria dos cultivares e acessos melhorados de caupi, sugerindo que seja pouco selecionado e que tenha sido introduzido na região relativamente cedo na introdução do material no Brasil.
5. Ao contrário do que ocorre com outras leguminosas cultivadas como o grão-de-bico e a soja, os acessos brasileiros do caupi apresentam uma diversidade genética significativa.
6. A diversidade genética observada nos genótipos locais do caupi apresenta características propícias para a condução de programas de melhoramento e mapeamento genético com o auxílio de marcadores moleculares do tipo DAF.

## **7. Apêndice**

Instruções para autores

Revista ***Genetics and Molecular Biology***

Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

## *Notice to contributors*

### ***Scope and Policy***

**Genetics and Molecular Biology** (formerly named Revista Brasileira de Genética/Brazilian Journal of Genetics -ISSN 0100-8455) is published quarterly by the Sociedade Brasileira de Genética (Brazilian Society of Genetics).

The Journal considers contributions that present the results of original research in genetics, evolution and related scientific disciplines.

Although **Genetics and Molecular Biology** is an official publication of the Brazilian Society of Genetics, contributors are not required to be members of the Society.

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been and will not be published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries.

The use of registered names and trademarks does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt from the relevant protective laws and regulations and therefore free for general use.

### ***Submission of papers***

#### **1. Manuscripts should be submitted to:**

**Fábio de Melo Sene, Editor-in-Chief**

*Genetics and Molecular Biology  
Rua Capitão Adelmio Norberto da Silva, 736  
14025-670 Ribeirão Preto, SP -Brasil*

#### **2. A submission package sent to the Editorial Office must contain:**

- a)** A cover letter signed by all authors stating that they have approved the submission of the manuscript and that the findings have not been published or are not under consideration for publication elsewhere;
- b)** Three copies of the manuscript and figures.
- c)** Two copies of any unpublished or in-press companion articles referred to in the submission.
- d)** A copy of the text, tables and figures on a disk. Be sure that the disk is adequately protected; if a disk arrives damaged, a new disk will be requested, causing delays in publication. Formats for text are Word or RTF, in Windows platform. Images in TIF or JPG formats should be sent in separate files (For Figures, see detailed instructions in 3.1.g). Disk must be labeled with the first author's last name, platform and software. (See detailed instructions below). Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution, and manuscripts may be returned before being reviewed.

#### **3. Categories of Contribution**

##### **3.1. Research Articles**

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout, including the References Cited section, appendices,

Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.

tables and legends; printed on one side only of A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

**a) The title page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, and city, state or province, and country; different affiliations indicated with superscript numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address. The corresponding author is the person responsible for checking the page proofs, and arranging for the payment of color illustrations and author's alteration charges.

**b) The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

**c) The text** must be as succinct as possible. Text citations: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use "et al". Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (et al should not be used). Numbers: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number. Binomial Names: Latin names of genera, species and intraspecific taxa in the text must be printed in italics; names of orders and families should be in the Title.

The text includes the following elements:

*Introduction* -Description of the background that led to the study.

*Material (or Subjects) and Methods* -Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

*Results* -Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

*Discussion* -The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation. Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.

**d) The Acknowledgments** must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

**e) The References Section:** citations must be ordered alphabetically by the first author; only articles that are published or in press should be included; personal communications must be cited within the text; journal titles must be abbreviated according to Medline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi>).

*Sample journal article citation:*

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angela* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Bertollo LAC, Takahashi CS and Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Rev Bras Genet* 1:103-120.

*Sample book citation:*

Salzano FM and Freire-Maia N (1967) *Populações Brasileiras*. Companhia Editora Nacional and EDUSP, São Paulo, 178 pp.

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

*Sample chapter-in-book citation:*

Carvalho A, Monaco LC and Krug CA (1966) Melhoramento genético das plantas e sua repercussão econômica. In: Pavan C and da

Cunha AB (eds) *Elementos de Genética*. 2nd ed. EDUSP and Companhia Editora Nacional, São Paulo, pp 587-653.

*Sample abstracts in meeting citation:*

Basile R (1973) Cromossomos Politénicos em células nutritivas de ovócitos de ovário atrofiado de *Rhynchosciara*. *Ciênc e Cult* 25

(suppl): 248. XXV Reunião Anual da SBPC, Rio de Janeiro, Brazil.

*Sample Thesis/Dissertation citation:*

Frota-Pessoa O (1953) Revision of the *Tripunctata* group of *Drosophila* with description of fifteen new species. PhD Thesis, Universidade

do Brasil, Rio de Janeiro.

**f) Tables** each table must start on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively

in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes, typed directly below the table, should be indicated in

Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.

lowercase superscript numbers.

**g) Figures** must be numbered consecutively in Arabic numerals. Legends should be typed on a separate sheet. Three sets of illustrations

of the highest quality must be provided, one original and two copies in glossy paper. If you have created figures electronically, submit them

also as hard copies. Scanned figures should not be submitted. Images should be in TIF or JPG format and provided in separate files. Figures

in Word format cannot be published. Journal quality reproduction will require grayscale and color at resolution yielding 300 ppi. Authors

should submit bitmapped line art at resolution yielding 600-1200 ppi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated

that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Identify each illustration by affixing on the back a

label containing: the number of the figure, the name of the first author, and an arrow indicating top of illustration. Illustrations supplied on

disks must follow instructions in item 2 (Submission package). Color illustration can be accepted, but authors are asked to defray the cost.

For costs of color figures, check with the Editorial Office.

**h) Nomenclature:** current standard international nomenclature should be adhered to.

**i) Sequences** may appear in text or in figure. DNA must be sequenced on both strands. DNA, RNA, or protein sequences equal to or

greater than 50 units must be entered into appropriate data bank and the accession number must be provided before publication of the article.

Long sequences requiring more than two pages to reproduce will not be published unless the Editorial decision is that the publication is

necessary. Complete mtDNA sequence will not be published.

**j) Data access:** reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

**k) Ethical issues:** Reports of experiments on live vertebrates must include a brief statement that the work was approved by the institu-

tional review board. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained

from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

**3.2 Short Communications** present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered prelimi-

nary communications. Their format is that of full-length article. The text must be kept to a minimum.

**3.3 Letters to the Editor** relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of

interest to geneticists are also welcome in this form.



Spiaggia., F.C.E. (2003). **Marcadores de DNA na Caracterização de Germoplasma de Feijão Macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**.

**3.4 Review Articles** are welcome.

**3.5 Book Reviews:** publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal.

**3.6 History, Story and Memories:** accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

#### **4. Proofs**

Page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from printer's errors, will be charged to the

authors. Notes added in proof require Editorial approval.

#### *Subscription*

Membership to the Brazilian Society of Genetics entitles subscription to **Genetics and Molecular Biology**. For nonmembers and

institutions, the annual subscriptions rates (4 issues/year) are:

Brazil and other South American Countries (Air Mail): Institutional- R\$ 300,00; Personal: R\$ 150,00

Other Countries (Air Mail): Institutional -US\$ 300.00; Personal -US\$ 50.00