

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Diversidade genética associada à tolerância do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) ao caruncho *Callosobruchus maculatus* (Fabr.)
por meio de marcadores moleculares**

NATHÁLIA GABRIELLE DE ARAÚJO LEITE

Recife, Fevereiro de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Diversidade genética associada à tolerância do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*
L. Walp.) ao caruncho *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) por meio de
marcadores moleculares**

Nathália Gabrielle de Araújo Leite

Orientadora: Professora Doutora Ana Maria Benko Iseppon (UFPE)

Co-orientador: Doutor Antonio Félix da Costa (IPA)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Recife, Fevereiro de 2012

Leite, Nathália Gabrielle de Araújo

Diversidade genética associada à tolerância do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) ao caruncho *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) por meio de marcadores moleculares/ Nathália Gabrielle de Araújo Leite– Recife: O Autor, 2012.

88 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Ana Maria Benko Iseppon

Coorientador: Antonio Félix da Costa

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Feijão-de-corda 2. Feijão-melhoramento genético 3. Feijão- doenças e pragas I. Iseppon, Ana Maria Benko II. Costa, Antonio Félix da III. Título.**

583.74

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-092

Diversidade genética associada à tolerância do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) ao caruncho *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) por meio de marcadores moleculares

Dissertação de Mestrado aprovada por:

Profª Drª Ana Maria Benko Iseppon (Depto. de Genética, UFPE)

Presidente da Banca Examinadora (Orientadora)

Dr. Francisco Rodrigues Freire Filho (EMBRAPA Meio-Norte)

Membro titular da Banca Examinadora

Drª Valesca Pandolfi (Depto. de Genética, UFPE)

Membro titular da Banca Examinadora

Profª Drª Maria Tereza dos Santos Correia (Depto. de Bioquímica, UFPE)

Membro suplente da Banca Examinadora

Profª Drª Márcia Vanusa da Silva (Depto. de Bioquímica, UFPE)

Membro suplente da Banca Examinadora

Recife, 29 de fevereiro de 2012.

Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem, e a segunda, é vivê-la como se tudo fosse milagre.

Albert Einstein

A minha querida avó Marlene Maria Bezerra de Araújo

OFEREÇO

A minha amada mãe Margarete Suely Bezerra de Araújo

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Deus Altíssimo, pela dádiva da vida e pelo privilégio de poder servi-lo.

A minha mãe Margarete Suely Bezerra de Araújo, por todo amor demonstrado ao longo desses 23 anos de minha existência.

A minha avó Marlene Maria Bezerra de Araújo, por sempre me apoiar nas horas em que mais preciso.

Aos meus tios Edson Bezerra de Araújo e Andrea Lílian Camilo de Araújo, por todo amor, paciência e conselhos sábios dos quais nunca esquecerei.

A minha tia Márcia Maria de Araújo Falcão, por todo apoio e por permanecer sempre disposta a me escutar quando preciso.

A Prof^a Dr^a Ana Maria Benko Iseppon, pela orientação, paciência, compreensão, e ensinamentos indispensáveis desde a graduação.

Ao Dr. Antonio Félix da Costa, pela orientação e confiança exercida desde a Iniciação Científica, assim como pela abundante paciência e por todos os conselhos incomparáveis.

A Rodrigo Cavalcanti e Adriana Freitas, do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), sem os quais este trabalho com toda certeza não teria iniciado.

A Lidiane Amorim e Alberto Vinícius Onofre, co-autores deste trabalho, por terem me ajudado a trilhar pelos caminhos do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV).

A todos aqueles que fazem parte do LGBV: Vanessa Souza, Emanuelle Vasconcelos, Ana Rafaela, Karla Santana, Pollyana Karla, Ana Félix, Silvany Araújo, Rodrigo César e muitos outros. Somos uma família!

Ao Dr. Francisco Rodrigues Freire Filho, por aceitar prontamente nosso convite e vir de Teresina-PI exclusivamente para a defesa desta dissertação. Sem dúvida sua colaboração vai além disso!

A Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia, a Prof^a Dr^a Márcia Vanusa da Silva e a Dr^a Valesca Pandolfi, por participarem na defesa deste trabalho com sugestões sem dúvida valiosas.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, pelo apoio e oportunidade.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos aqueles que porventura tenha esquecido de mencionar, mas que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

O presente estudo foi realizado com os objetivos de identificar acessos de feijão-caupi tolerantes ao caruncho (*C. maculatus*) e caracterizar esses acessos a nível molecular, em conjunto a acessos de *V. unguiculata* ssp. *cylindrica* e *V. radiata*, por meio de marcadores DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), visando identificar parentais promissores para futuros trabalhos de melhoramento, bem como para mapeamento, pela associação com o nível de resposta ao caruncho. Para identificação da tolerância ao caruncho em feijão-caupi, 27 acessos foram avaliados em ensaios de laboratório, utilizando-se o Delineamento Experimental Inteiramente Casualizado. Para cada acesso, uma amostra com 30 grãos de feijão-caupi foi infestada com cinco casais de caruncho com até 24 h de idade, sendo os resultados obtidos submetidos à análise estatística e suas médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para as duas variáveis estudadas, o acesso INHUMA comportou-se como suscetível, enquanto os acessos PATATIVA e MNC99-537F-4 apresentaram-se tolerantes para ambas as variáveis. Os demais acessos testados apresentaram comportamento intermediário, o que não os diferencia em relação à INHUMA, PATATIVA e MNC99-537F-4. Na caracterização molecular dos acessos, 25 primers geraram um total de 239 amplicons, dos quais 163 foram polimórficos. Os fragmentos amplificados foram incluídos em uma matriz de dados para análise pelo método de *Neighbor-Joining*. No fenograma obtido, *V. radiata* e *V. unguiculata* ssp. *cylindrica* assumiram uma posição basal isolada dos subgrupos formados, enquanto que os acessos de *V. unguiculata* subdividiram-se em dois grupos, nos quais os acessos contrastantes quanto à tolerância ao caruncho se distribuíram em subgrupos distintos, o que evidencia a existência de diferenças genéticas significativas entre alguns candidatos. Nesse sentido, os resultados obtidos demonstraram que os ensaios de tolerância ao caruncho associados à aplicação de marcadores moleculares foram capazes de identificar genótipos contrastantes de feijão-caupi promissores para aplicação em trabalhos de melhoramento vegetal, bem como para a geração de populações segregantes adequadas ao mapeamento genético.

Palavras-chave: Tolerância a pragas, ISSR - *Inter Simple Sequence Repeat*, DAF - *DNA Amplification Fingerprinting*, marcadores moleculares.

ABSTRACT

Genetic diversity associated with the tolerance of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) against the weevil *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) using molecular markers

The present evaluation aimed to identify cowpea accessions with tolerance against the cowpea weevil (*C. maculatus*) and characterize those accessions at molecular level as compared to accessions of *V. unguiculata* ssp. *cylindrica* and *V. radiata*, using DAF (DNA Amplification Fingerprinting) and ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) markers, aiming to identify promising materials for future breeding and mapping purposes in association with their response against the weevil attack. To identify the cowpea tolerant sources against the weevil, 27 accessions were evaluated in laboratory assays using a Completely Randomized Design. 30 grains of each cowpea accession were infested with five weevil couples with ages up to 24 h. The results were submitted to a statistical evaluation with means compared by the Tukey test at 5% probability. For both evaluated variables the accession INHUMA demonstrated to be susceptible, while the accessions PATATIVA and MNC99-537F-4 presented tolerance. The remained tested accessions demonstrated intermediary behavior that not differentiates those accessions in relation to INHUMA, PATATIVA and MNC99-537F-4. The molecular characterization of the cowpea accessions, using 25 primers, produced 239 amplicons of which 163 were polymorphic. Those amplicons were used to generate a data matrix for analysis using the Neighbor-Joining method. In the obtained phenogram *V. radiata* and *V. unguiculata* ssp. *cylindrica* assumed a basal position in relation to the subgroups formed, while the *V. unguiculata* accessions were subdivided into two groups in which the accessions were distributed in distinct subgroups with differences also regarding their tolerance to the weevil, highlighting the existence of genetic diversity between some of them. The results are promising, since tolerance testing associated with the application of molecular markers were able to identify contrasting cowpea accessions potentially important for application in plant breeding programs, as well as for the generation of segregating populations suitable for gene mapping.

Keywords: Tolerance against pests, ISSR - Inter Simple Sequence Repeat, DAF - DNA Amplification Fingerprinting, molecular markers.

LISTA DE FIGURAS

Páginas

Revisão Bibliográfica

Figura 1.

Distribuição aproximada das regiões produtoras de feijão-caupi no Brasil. 25

Figura 2.

O caruncho *Callosobruchus maculatus* na forma adulta. 31

Figura 3.

Sementes de feijão-caupi com ovos de *C. maculatus* e orifícios de emergência. 32

Manuscrito de Artigo Científico

Figura 1.

Recipientes de vidro contendo grãos da cultivar SEMPRE VERDE, para criação de *C. maculatus*. 53

Figura 2.

Representação gráfica do número médio de ovos, obtido no presente estudo, para os 27 acessos de feijão-caupi analisados. 62

Figura 3.

Representação gráfica do número médio de insetos emergidos, obtido no presente estudo, para os 27 acessos de feijão-caupi analisados. 62

Figura 4.

Representação gráfica da média geral para ambas as características analisadas (número médio de ovos e número médio de insetos emergidos), obtida no presente estudo, para os 27 acessos de feijão-caupi avaliados. 63

Figura 5.

Fenograma construído a partir do método *Neighbor-Joining* (bootstrap 1.000 replicações), indicando a similaridade genética, baseada em DAF e ISSR, entre os 29 acessos estudados. 68

Anexos

Figura 1.

Eletroforese em gel de agarose, revelando os fragmentos amplificados pelo primer ISSR 823 em 29 acessos do gênero *Vigna*. 75

Figura 2.

Eletroforese em gel de agarose, revelando os fragmentos amplificados pelo primer DAF J20 em 29 acessos do gênero *Vigna*. 75

LISTA DE TABELAS

Páginas

Manuscrito de Artigo Científico

Tabela 1.

Acessos de *Vigna* analisados, incluindo informações disponíveis sobre o porte da planta, peso de 100 sementes (g), procedência, genealogia, tolerância, tempo para maturação e cor do grão. **56**

Tabela 2.

Médias do número de ovos e do número de insetos emergidos, comparadas pelo teste de Tukey (5%), de 27 acessos de feijão-caupi, submetidos a infestação pelo caruncho. **60**

Tabela 3.

Primers utilizados nas reações de DAF e ISSR, com suas respectivas sequências de bases, número de fragmentos totais e polimórficos, porcentagem de polimorfismo total, interespecífico e intraespecífico. **66**

LISTA DE ABREVIATURAS

A.C.	Antes de Cristo
AFLP	Do inglês <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados)
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DAF	Do inglês DNA Amplification Fingerprinting (<i>Impressão Baseada na Amplificação do DNA</i>)
DNA	Do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
CPAMN	EMBRAPA Meio Norte
CPACT	EMBRAPA Clima Temperado
Fabr.	Fabricius
GC	Guanina-Citosina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPA	Instituto Agrônomo de Pernambuco
IPK	The Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) em Gatersleben (Alemanha)
ISSR	Do inglês <i>Inter Simple Sequence Repeat</i> (Repetições Entre Sequências Simples)
L.	Linnaeus
LGBV	Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEGA 5	Do inglês <i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i> (Version 5.0)
µL	Microlitro
mL	Mililitro
ng	Nanograma

NJ	Do inglês <i>Neighbor-Joining</i> (Agrupamento de Vizinhaça)
pb	Pares de Bases
PCR	Do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
RAPD	Do inglês <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso)
RFLP	Do inglês <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo de Comprimento por Fragmentos de Restrição)
SSR	Do inglês <i>Simple Sequence Repeat</i> (Repetições de Sequência Simples)
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
Walp.	Walpers

SUMÁRIO

1. Introdução	16
2. Objetivos	18
3. Revisão Bibliográfica	19
3.1 Nomenclatura do Feijão-Caupi.....	19
3.2 Origem do Feijão-Caupi	19
3.3 Introdução do Feijão-Caupi no Brasil	20
3.4 Sistemática e Taxonomia do Feijão-Caupi	21
3.5 Aspectos Morfológicos do Feijão-Caupi	22
3.6 O Consumo do Feijão-Caupi.....	23
3.7 Aspectos Socioeconômicos do Feijão-Caupi	24
3.8 Principais Doenças e Pragas do Feijão-Caupi	25
3.9 Tolerância de Plantas a Insetos.....	29
3.10 Aspectos Biológicos de <i>Callosobruchus maculatus</i> (Fabr.)	31
3.11 O Caruncho <i>Callosobruchus maculatus</i> e o Feijão-Caupi	33
3.12 Estudos Genéticos do Feijão-Caupi	34
3.13 <i>Inter Simple Sequence Repeat</i> (ISSR)	36
3.14 <i>DNA Amplification Fingerprinting</i> (DAF)	37
5.1 Introdução	50
5.2 Material e Métodos.....	52
5.3 Resultados e Discussão	58
5.4 Referências Bibliográficas.....	68
6. Conclusões.....	74
7. Anexos	75

1. Introdução

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) pertence à tribo Phaseoleae, na qual também se incluem diversas espécies economicamente importantes, como a soja (*Glycine max* L.), o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e o feijão mungo (*Vigna radiata* L.) (TIMKO et al., 2007). Devido ao alto conteúdo proteico dos grãos (AKANDE, 2007), essa espécie tem destaque como componente essencial na dieta da população de países em desenvolvimento, especialmente no continente Africano, onde se encontram alguns dos países considerados como maiores produtores e consumidores mundiais, a exemplo da Nigéria e do Niger (SINGH et al., 2002; LANGYINTUO et al., 2003). Após Nigéria e Niger, o Brasil pode ser considerado o terceiro maior produtor e consumidor mundial de feijão-caupi, tendo sido cultivada no País, no período de 2005-2009, uma área de aproximadamente 1.391.386 ha, com produção estimada em 513.619 t (FREIRE FILHO et al., 2011).

O feijão-caupi tem considerável adaptação ao clima quente e à seca, em comparação a outras espécies cultivadas (HALL et al., 2002; HALL, 2004). Desta forma, no Brasil, especialmente nas regiões Norte e Nordeste, esta leguminosa se constitui em uma das principais alternativas socioeconômicas para as populações rurais (FIGUEIRAS et al., 2009), sendo importante gerador de emprego e renda, visto que essas regiões são caracterizadas por condições de estresse hídrico, térmico e salino (FREIRE FILHO et al., 2005 In: FREIRE FILHO et al., 2005).

Mesmo sendo adaptado a diversas condições ambientais, o acometimento por uma série de pragas é constante, visto que durante todo seu ciclo de desenvolvimento o feijão-caupi é atacado por diversas espécies de insetos. No período de armazenamento, as pragas de maior destaque são aquelas que têm preferência pelos grãos, como *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae) e *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera: Chrysomelidae) (MARSARO Jr., 2007). O caruncho *C. maculatus* é responsável pela redução da qualidade e do valor comercial do produto, causando danos que chegaram a destruir cerca de metade da safra brasileira anual de feijão-caupi, sendo também capaz de provocar perdas consideráveis (variando de 30% a 40%) em outras espécies de valor comercial além do feijão-caupi, como milho, trigo, soja e arroz (MARANGONI, 2002; SOUSA et al., 2005).

O controle do caruncho, assim como dos demais insetos-praga associados aos grãos armazenados, tem sido realizado em larga escala por meio de produtos químicos (inseticidas), no entanto, relatos sobre o surgimento de mecanismos de tolerância a tratamentos químicos em várias

espécies de insetos-praga têm sido cada vez mais frequentes (MARTINAZZO et al., 2000). Dessa forma, nos países produtores de feijão-caupi, o emprego de cultivares tolerantes tem se constituído em uma alternativa promissora, visando à redução dos danos e perdas durante a armazenagem, embora tais cultivares nem sempre apresentem todas as características comerciais desejáveis (LIMA et al., 2002).

Diversos estudos têm procurado identificar genótipos de feijão-caupi tolerantes ao caruncho, a exemplo de Carvalho et al. (2011) e Marsaro Jr. & Vilarinho (2011). Carvalho et al. (2011) avaliaram a resistência de nove genótipos de feijão-caupi a *C. maculatus*, tendo escolhido dentre as variáveis para análise o número de ovos viáveis e inviáveis, e o número de insetos emergidos, da mesma forma que Marsaro Jr. & Vilarinho (2011), ao avaliarem 26 cultivares de feijão-caupi, optaram pelo número de insetos emergidos como uma de suas variáveis. Vale salientar que ambos foram capazes de identificar acessos com níveis consideráveis de tolerância ao caruncho.

Entretanto, apesar do feijão-caupi apresentar grande variabilidade fenotípica (NECHET & HALFELD-VIEIRA, 2007), o que tem permitido a identificação de genótipos tolerantes a diversas pragas e adaptados a regiões específicas, a introdução de técnicas de genética molecular, em meados da década de 80, tem possibilitado, em paralelo, a avaliação da variabilidade genética entre os acessos, além de permitir que esses estudos sejam realizados com maior segurança e rapidez (XAVIER et al., 2005). Nesse sentido, o uso de métodos modernos de biologia molecular, a exemplo dos marcadores moleculares, tornou-se então fundamental para uma seleção eficiente dos recursos genéticos. O emprego desses métodos facilita a detecção da real variabilidade genética para fins de melhoramento convencional ou para fins biotecnológicos, além disso, os mesmos são mais informativos e estáveis que os marcadores morfológicos (BENKO-ISEPPON et al., 2005), os quais podem variar conforme as condições ambientais, revelando limitações quanto à sua reprodutibilidade e uso eficiente (BRAMMER, 2000).

Dentre os marcadores moleculares mais utilizados em estudos com feijão-caupi, o ISSR (Do inglês *Inter Simple Sequence Repeat*; Repetições Entre Sequências Simples) e DAF (Do inglês *DNA Amplification Fingerprinting*; Impressão Baseada na Amplificação do DNA) são de considerável importância por apresentarem vantagens em relação aos demais métodos. Os ISSRs se constituem em uma técnica simples, rápida e que dispensa o uso de radioatividade, sendo capaz de revelar altos níveis de polimorfismo (SEMAGN et al., 2006). Enquanto os marcadores moleculares do tipo DAF são capazes de gerar padrões de bandas complexos, contendo um grande número de

fragmentos polimórficos com boa reprodutibilidade (BENKO-ISEPPON et al., 2003; SEMAGN et al., 2006).

Entretanto, mesmo havendo estudos que avaliem diferentes acessos de feijão-caupi quanto à tolerância ao ataque pelo caruncho, trabalhos que associem esses acessos a aspectos moleculares ainda são escassos. Dessa forma, o presente estudo objetivou realizar uma análise da variabilidade genética de acessos de feijão-caupi, com diferentes respostas ao ataque por *C. maculatus*, por meio de marcadores moleculares ISSR e DAF, visando inferir sobre a diversidade genética dos acessos analisados e seu possível uso no melhoramento convencional, bem como para a seleção de parentais contrastantes quanto à tolerância ao caruncho que possam ser empregados em cruzamentos para fins de mapeamento.

2. Objetivos

Geral

- Analisar a variabilidade genética de acessos de feijão-caupi cultivados na região nordeste, com relação à resposta de seus grãos ao ataque do caruncho (*C. maculatus*), relacionando os dados obtidos à variabilidade genética através de marcadores moleculares.

Específicos

- Avaliar 27 acessos de feijão-caupi (incluindo cultivares e linhagens) quanto à tolerância ao caruncho, seguida pela análise estatística dos dados obtidos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade;
- Analisar a variabilidade genética dos 27 acessos de feijão-caupi, incluindo acessos de táxons relacionados (*Vigna unguiculata* L. Walp. ssp. *cylindrica* L. Verdc. e *V. radiata* L.) para comparação, utilizando-se marcadores moleculares ISSR e DAF;
- Construir um fenograma pelo método de agrupamento *Neighbor-Joining* (Agrupamento de Vizinhaça), a partir dos resultados das reações de amplificação pelos marcadores ISSR e DAF;
- Associar a distribuição dos acessos analisados no fenograma obtido com os níveis de tolerância observados;
- Identificar acessos promissores para inclusão em programas de melhoramento vegetal e mapeamento genético.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Nomenclatura do Feijão-Caupi

Acredita-se que o nome feijão-caupi, derivado do inglês cowpea (ervilha de vaca), originou-se do fato de que a planta era comumente utilizada como importante fonte de feno para animais, no Sudeste dos Estados Unidos da América, bem como em outras partes do mundo. Essa leguminosa apresenta muitos nomes populares, o que por vezes acaba por dificultar seu reconhecimento (TIMKO et al., 2007).

Assim como em diversos países produtores da cultura, no Brasil, o feijão-caupi é conhecido por nomes que variam de região para região. No Nordeste, os nomes mais usados são: feijão macássa e feijão-de-corda. No Norte: feijão-de-praia, feijão-da-colônia e feijão-de-estrada. Na região Sul: feijão-miúdo. Na região Norte existe ainda uma variedade de feijão-caupi conhecida por manteiguinha, com grãos pequenos na cor creme, a qual é bastante utilizada na culinária local. Em algumas regiões da Bahia e norte de Minas-Gerais, a espécie também é conhecida como feijão-gurutuba e feijão-catador. Vale salientar também, que há um tipo de feijão-caupi, com grãos de cor branca e hilo circundado por um grande halo preto, conhecido como feijão-fradinho nos estados da Bahia, Sergipe e Rio de Janeiro. O feijão-fradinho é famoso por ser o preferido para o preparo do acarajé, comida típica da Bahia, conhecida e apreciada em todo o país (FREIRE FILHO et al., 2011).

3.2 Origem do Feijão-Caupi

Embora seja algo de difícil determinação, pesquisadores acreditavam que o centro de origem das espécies cultivadas de feijão-caupi localizava-se no continente Asiático, entretanto, a ausência de espécies selvagens na Ásia, como possíveis genitores, gerou questionamentos sobre a validade dessa afirmação (TIMKO & SINGH, 2008). Nesse sentido, evidências sugerem que a espécie teria surgido no continente Africano, pois, espécies selvagens de feijão-caupi são encontradas apenas na África e em Madagascar, sendo o Sudeste africano o maior centro de diversidade de espécies silvestres de *Vigna* (TIMKO et al., 2007).

Pasquet & Baudoin (2001) revelaram que a espécie selvagem *V. unguiculata* ssp. *unguiculata* var. *spontanea* é provavelmente o genitor do feijão-caupi cultivado, ao passo que Coulibaly et al. (2002) afirmaram ter encontrado alguma evidência de domesticação no Nordeste africano, com base em estudos por AFLP (Do inglês *Amplified Fragment Length Polymorphisms*;

Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos Amplificados). Entretanto, em estudo com marcadores moleculares DAF incluindo várias espécies do gênero, Simon et al. (2007) enfatizaram a clara origem asiática do gênero *Vigna*, sugerindo que a África poderia ser considerada o centro de diversificação do feijão-caupi e não seu centro de origem, especialmente levando-se em conta que a maioria de suas espécies-irmãs ocorrem na Ásia.

3.3 Introdução do Feijão-Caupi no Brasil

Embora existam indícios que sugerem que o feijão-caupi seja cultivado desde os tempos pré-históricos, alguns pesquisadores preferem afirmar que o cultivo da espécie começou apenas no século VIII A.C., ao passo que sua introdução nos Estados Unidos teria ocorrido aproximadamente no ano de 1700, época em que o feijão-caupi também teria sido introduzido na América do Sul (TIMKO et al., 2007). Entretanto, Gandavo (2001) relatou que no ano de 1568 já haviam indícios do cultivo de diversos tipos de feijão no Brasil, assim como Souza (2011) mencionou que em meados de 1587, vários tipos de feijões e favas eram cultivados no estado da Bahia. Apesar de não haver confirmação que o feijão-caupi estivesse presente entre as espécies cultivadas no país naquela época, muitos pesquisadores acreditam que sim. Segundo Barraclough (1995), em 1549 a Bahia mantinha comércio intenso com o oeste da África, esse fato fortalece a hipótese, consolidando a idéia de que o feijão-caupi já estava sendo cultivado no país antes de 1700.

Nesse sentido, a introdução do feijão-caupi no Brasil deve ter ocorrido na segunda metade do século XVI, por colonizadores portugueses e espanhóis, assim como por africanos trazidos como escravos, visto que no período colonial, cerca de 3,6 milhões deles foram trazidos ao Brasil, a maioria chegando ao país pelos portos de Recife, Salvador, Rio de Janeiro e São Luiz, vindos diretamente de Angola, Moçambique e Congo, de acordo com registros históricos. Além de trazerem muito de sua cultura, esses povos trouxeram também sementes de plantas utilizadas em pratos típicos africanos, ou em seus rituais sagrados, como foi o caso do feijão-caupi (CURTIN, 1969 In: SIMON et al., 2007).

A existência de uma variedade de cultivares no estado da Bahia, bem como de diversos pratos típicos com feijão-caupi, a exemplo do acarajé e do abará, ambos de origem africana, são indícios que também suportam a hipótese. Acredita-se então, que a partir da Bahia, acompanhando a colonização, essa leguminosa tenha se disseminado por todas as regiões do país, tendo maior destaque nas regiões Norte e Nordeste, onde ocupa grande porcentagem (cerca de 90%) das áreas

plantadas com feijão nos estados do Maranhão, Piauí e Ceará (ARAÚJO, 1984; ARAÚJO, 1988; FREIRE FILHO, 1988).

3.4 Sistemática e Taxonomia do Feijão-Caupi

O feijão-caupi (*V. unguiculata* L. Walp.) é uma dicotyledonea, pertencente à ordem Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolineae, gênero *Vigna*, seção *Catyang*, espécie *Vigna unguiculata* L. Walp. e subespécie *unguiculata* (PADULOSI & NG, 1997; FREIRE FILHO et al., 2005; VIJAKUMAR et al., 2010). O gênero *Vigna*, considerado pantropical e altamente variável, abriga outras espécies economicamente importantes, a exemplo de *V. radiata* (feijão-mungo), *V. angularis* (feijão-azuki), *V. mungo* (gramanegra) e *V. subterranea* (amendoim de bambara). O gênero é composto por mais de 80 espécies, as quais se agrupam dentro de seis subgêneros: *Vigna*, *Ceratotropis*, *Plectotropis*, *Sigmoidotropis*, *Lasiosporon*, e *Haydonia*. *Vigna* abrigava ainda um sétimo subgênero, *Macrorhynchus*, que recentemente foi transferido para o gênero *Wajira* (VIJAYKUMAR et al., 2010; TIMKO & SINGH, 2008).

A espécie *V. unguiculata* se divide ainda em 11 subespécies, das quais, 10 incluem as formas selvagens, ao passo que a subespécie *unguiculata* inclui as formas cultivadas. *V. unguiculata* ssp. *unguiculata* se subdivide ainda em quatro cultigrupos, nomeados: *biflora* (ou *cylindrica*), *textilis*, *sesquipedalis* e *unguiculata* (TIMKO & SINGH, 2008; VIJAKUMAR et al., 2010).

Membros do grupo *biflora* são comuns na Índia e caracterizam-se por suas sementes relativamente pequenas e lisas, nascidas em vagens de tamanho pequeno que são mantidas na posição vertical até a maturidade. O grupo *textilis* inclui formas raras de feijão-caupi, com pedúnculos muito longos, que são utilizados na África como fonte de fibra. *Sesquipedalis* abriga tipos de feijão-caupi que crescem amplamente na Ásia, para produção de vagens verdes muito longas (40 a 100 cm) que são usadas como feijões de estalo. Em comparação com os demais, *unguiculata* é o maior cultigrupo, incluindo a maioria dos feijões africanos de tamanho médio a grande, bem como os feijões tipo forragem (TIMKO et al., 2007).

Segundo Padulosi & Ng (1997), após a adoção dessa nomenclatura, as discussões sobre a classificação botânica do feijão-caupi cessaram. É importante ressaltar também, que no Brasil, somente os cultigrupos *unguiculata* e *sesquipedalis* são cultivados, *unguiculata* compreende quase a totalidade das cultivares locais e melhoradas, enquanto que *sesquipedalis* inclui o comumente

conhecido feijão de metro ou feijão-chicote (FREIRE FILHO et al., 2005 In: FREIRE FILHO et al., 2005).

3.5 Aspectos Morfológicos do Feijão-Caupi

O feijão-caupi, que é uma planta herbácea de ciclo anual, se desenvolve bem na estação quente, necessitando de temperaturas a partir dos 18 °C para completar seu desenvolvimento, entretanto, sua taxa de crescimento ótimo ocorre somente aos 28 °C . Em comparação ao feijão-comum, o feijão-caupi apresenta folhas brilhantes na cor verde escura e menos pubescentes, além disso, seu sistema radicular é mais desenvolvido, apresentando ramos e caules mais grossos. O hábito de crescimento pode ser determinado ou indeterminado, com tipologia ereta, semiereta, semiprostrada e prostrada, dependendo principalmente do genótipo. Além do genótipo, o fotoperíodo e as condições de crescimento, na qual a planta se encontra, podem também interferir no seu porte. Genótipos de floração precoce, em geral, são capazes de produzir vagens com grãos secos em aproximadamente 60 dias, ao passo que genótipos de floração tardia requerem cerca de 150 dias para maturação, dependendo do fotoperíodo (CRAUFURD et al., 1997; TIMKO et al., 2007; TIMKO & SINGH, 2008).

As sementes dos tipos cultivados de feijão-caupi podem pesar entre 80 mg e 320 mg, com formatos que variam do arredondado até o reniforme. Cada vagem pode conter entre oito e 18 sementes, e apresentar formato cilíndrico e curvado, ou reto. Quanto ao tegumento da semente, pode haver variação na textura (liso ou rugoso), na coloração (branco, creme, verde, amarelo-claro, vermelho, marrom e preto), e na uniformidade, além disso, os grãos de muitos tipos de feijão-caupi conhecidos, a exemplo do *blackeye pea* e do *pinkeye*, são brancos com uma área circular de formato irregular, preta ou vermelha, a qual circunda o hilo, dando à semente a aparência de um olho (TIMKO & SINGH, 2008).

O feijão-caupi apresenta inflorescências formadas a partir de um eixo central, um racemo modificado, com seis a oito pares de gemas florais, as quais estão dispostas alternadamente em um eixo intumescido, denominado almofada. Suas flores são perfeitas e zigomorfas, distribuindo-se aos pares no racemo, o qual se desenvolve a partir da axila foliar. O cálice é pentâmero, persistente e gamossépalo, podendo ser verde ou roxo, ao passo que a corola é dialipétala e também pentâmera. O estandarte (maior pétala da corola) localiza-se na parte posterior da flor, e abre-se completamente durante a antese. As quatro pétalas restantes permanecem na mesma posição que ocupavam anteriormente na gema, ao passo que as duas pétalas laterais, que cobrem as pétalas inferiores,

denominam-se asas. O estandarte e as asas podem variar de completamente brancas a completamente roxas, diferentemente das outras duas pétalas, que permanecem brancas. O androceu (parte masculina da flor), que se apresenta incluso na corola, é composto por 10 estames, dos quais um permanece livre, ao passo que os nove restantes são condescidos (diadelfos), enquanto que a antera tem base fixa, é livre e apresenta deiscência longitudinal. O gineceu (parte feminina da flor) apresenta ovário multilocular, estilete internamente piloso e estigma oblíquo (ROCHA et al., 2001).

O feijão-caupi apresenta emergência epígea, de forma que os cotilédones emergem do solo durante a germinação. Este tipo de emergência torna a plântula muito suscetível a ferimentos, visto que é incapaz de rebrotar a partir de regiões abaixo dos cotilédones. As primeiras duas folhas verdadeiras da plântula são opostas, sésseis, e inteiras, enquanto que as folhas restantes são alternadas, pecioladas e trifolioladas. Vale salientar que a planta madura exibe nectários extraflorais que funcionam como atrativos para insetos, fato que impulsiona a polinização, além disso, outra característica notável, considerada um atributo que diferencia o feijão-caupi de outras leguminosas, é a presença de pedúnculos longos nas vagens, o que facilita grandemente a colheita manual (TIMKO & SINGH, 2008).

3.6 O Consumo do Feijão-Caupi

O feijão-caupi é consumido em inúmeros países, principalmente por pessoas que apresentam dietas pobres em proteínas, minerais e vitaminas, de forma que para tais consumidores a espécie destaca-se como importante fonte nutricional. Com perfil semelhante ao de outras leguminosas, o feijão-caupi apresenta baixo teor de gordura e conteúdo proteico duas a quatro vezes maior que em cereais e tubérculos, sendo rico especialmente em aminoácidos, como lisina e triptofano. Além de ser uma importante fonte proteica, essa leguminosa também exibe um alto teor de minerais e vitaminas, apresentando ainda um dos maiores níveis de ácido fólico (vitamina do complexo B crucial para prevenir a má formação do canal medular em fetos) em comparação a qualquer outro alimento (TIMKO et al., 2007).

O consumo do feijão-caupi pode ser feito na forma de vagem verde, ou de grãos verdes ou secos, havendo ainda outras formas de preparo, como é o caso das folhas jovens, que na África são preparadas como um refogado, similarmente ao espinafre. Para facilitar e reduzir o tempo de cozimento, quando o consumo é feito na forma de vagem verde, a colheita ocorre quando as vagens estão bem desenvolvidas mas com baixo teor de fibras. Para o consumo dos grãos verdes, as vagens são colhidas no início da maturidade fisiológica a fim de se evitar o ressecamento dos grãos, da

mesma forma que para o consumo dos grãos secos, as vagens são colhidas secas, exatamente no ponto de maturidade. Vale ressaltar, que além de sua utilização na alimentação humana, em diversas partes do mundo a folhagem do feijão-caupi também é utilizada como importante fonte de feno para animais (VIEIRA et al., 2000; TIMKO et al., 2007).

3.7 Aspectos Socioeconômicos do Feijão-Caupi

O feijão-caupi destaca-se como uma das Fabaceae mais adaptadas, versáteis e nutritivas dentre as espécies cultivadas, de forma que seu cultivo, apenas no Brasil, no período de 2005-2009, chegou a ocupar uma área em torno de 1.391.386 ha, distribuídos principalmente entre as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste (FREIRE FILHO et al., 2011). Dentre os países produtores de feijão-caupi, a Nigéria destaca-se como maior produtor e consumidor mundial, exibindo aproximadamente 5 milhões de hectares sob cultivo, o que reflete sua produção anual estimada em 2 milhões de toneladas. Após a Nigéria, Niger e Brasil são considerados os maiores produtores e consumidores de feijão-caupi, com produção anual estimada em 650,000 t e 513,619 t, respectivamente (TIMKO & SINGH, 2008; FREIRE FILHO et al., 2011).

É importante ressaltar que, no Brasil, apesar de serem cultivadas várias espécies de feijão, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por regulamentação técnica, considera como feijão apenas o feijão-caupi e o feijão-comum. Essas duas espécies destacam-se como as mais importantes social e economicamente no País, porém, no caso do feijão-caupi, o cultivo se concentra nas regiões Norte e Nordeste, estando, atualmente, em expansão para a região Centro-Oeste, em especial para o estado de Mato Grosso, conforme mostra a Figura 1 (FREIRE FILHO et al., 2011).

Na região Nordeste, a produção de feijão-caupi concentra-se no Semi-árido, onde, devido à alta temperatura e ao baixo índice pluviométrico, outras culturas (ex: melão, goiaba, manga, dentre outros) não conseguem se desenvolver satisfatoriamente. Vale salientar que tanto na região Norte como na região Nordeste, apesar de haver atuação por parte de agricultores empresariais, a maior parte da produção é feita por agricultores familiares, adeptos das práticas tradicionais, enquanto que na região Centro-Oeste, onde a cultura passou a ser feita em larga escala a partir de 2006, a maior parte da produção é feita por médios e grandes empresários, praticantes de uma lavoura altamente tecnificada (FREIRE FILHO et al., 2011).



Figura 1. Distribuição aproximada das regiões produtoras de feijão-caupi no Brasil (Fonte: FREIRE FILHO et al., 2011).

Dentre os estados produtores de feijão-caupi na região Nordeste, o estado de Pernambuco tem grande importância, tendo atingido no ano de 2004 uma área colhida de 167,601 ha. Apesar do potencial produtivo da espécie para o Nordeste brasileiro ser indiscutível, a produtividade ainda é considerada baixa, refletindo fatores adversos à cultura, inclusive a ocorrência de doenças e pragas, entretanto, como exemplo, o MAPA revela que o estado de Pernambuco dispõe de 112 municípios com pelo menos um período do ano favorável ao cultivo do feijão-caupi, o que demonstra que para se aumentar a produção não se necessita da abertura de mais áreas, sendo apenas necessários novos investimentos em tecnologia, o que, em consequência, irá refletir positivamente na produção (BARROS et al., 2005; MACHADO et al., 2010; FREIRE FILHO et al., 2011).

3.8 Principais Doenças e Pragas do Feijão-Caupi

O mosaico severo do feijão-caupi (Do inglês *Cowpea Severe Mosaic Virus*), causado por um vírus pertencente ao gênero *Comovirus*, é considerado uma das principais doenças do feijão-caupi, sendo relatada em praticamente todos os estados produtores do Norte e Nordeste do Brasil. Em geral, medidas preventivas de controle do mosaico severo envolvem a aplicação de inseticidas, visando à redução da população dos insetos vetores (coleópteros da família Chrysomelidae) e

consequentemente a diminuição da incidência da doença. Entretanto, essa medida tem se mostrado ineficaz no período chuvoso, no qual a planta cresce mais intensamente. Além disso, o alto custo também tem desencorajado a adoção do controle químico dos vetores pelos agricultores. Dessa forma, a resistência genética tem sido apontada como a medida mais apropriada para o controle do CpSMV (ASSUNÇÃO et al., 2005).

O vírus do mosaico do feijão-caupi transmitido por afídeos (Do inglês *Cowpea Aphid-Borne Mosaic Virus*) ocorre em diversas localidades onde se cultiva feijão-caupi. A doença se expressa nos folíolos, por extensas áreas cloróticas que se alternam com áreas no tom verde normal. Frequentemente se observa distorção foliar no ápice do folíolo, bem como redução no porte de plantas severamente atacadas. Na natureza, os principais vetores são *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) e *Aphis craccivora* (Koch, 1854), além da própria semente. O controle da doença consiste principalmente no emprego de variedades resistentes, assim como no controle sistemático dos afídeos vetores na fase de desenvolvimento vegetativo (SOBRINHO et al., 2000).

O vírus causador do mosaico do pepino (Do inglês *Cucumber Mosaic Virus*), também transmitido por afídeos, em geral, ocasiona sintomas leves na maioria das cultivares de feijão-caupi testadas, entretanto, quando esse vírus interage sinergicamente com vírus pertencentes ao gênero Potyvirus, os sintomas se agravam. Essas associações têm sido constatadas em condições naturais e confirmadas mediante inoculações artificiais. A transmissão do vírus é feita naturalmente por pulgões, o que permite a disseminação espacial e temporal da enfermidade. Em geral, o controle da doença é feito através do emprego de cultivares resistentes, bem como pelo controle dos afídeos vetores e pela utilização de sementes certificadas, provenientes de campos sadios (BARRETO, 1999; SOBRINHO et al., 2000).

O vírus do mosaico dourado do feijão-caupi (Do inglês *Cowpea Golden Mosaic Virus*) está presente em todas as regiões produtoras de feijão-caupi, entretanto, tem elevados graus de incidência no estado do Piauí, onde provoca perdas expressivas na produção (20% a 78%), principalmente quando a interação ocorre entre zero e 20 dias após a emergência das plântulas. A doença se expressa na forma de pequenas pontuações amareladas, que crescem em formato e extensão, cobrindo toda a superfície do limbo foliar, o que deixa os folíolos com a coloração amarelo-dourada. Na natureza, a transmissão do vírus é feita pela mosca-branca, *Bemisia tabaci* (Genn.), não havendo transmissão por sementes ou por métodos mecânicos. Normalmente, recomenda-se o controle por meio de cultivares com alguma resistência ao vírus ou tolerância à

mosca branca. Em condições de campo, essas cultivares podem apresentar infecções leves da doença, porém, sem comprometer o rendimento da cultura (SOBRINHO et al., 2000).

Além dos vírus, uma série de doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides também acometem o feijão-caupi, especialmente no Nordeste do Brasil. Essas doenças não apresentam uma distribuição generalizada nas regiões produtoras, entretanto, por serem de importância localizada, têm merecido atenção nos programas de melhoramento, a exemplo do complexo de patógenos do solo que envolve *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Macrophomina* sp., e *Sclerotium* sp. (FREIRE FILHO et al., 1999).

As espécies de *Fusarium*, em geral, estão associadas a podridões de raiz-colo-caule, a exemplo da Podridão das raízes e da Murcha de fusarium. A Podridão das raízes é causada principalmente por *F. solani*, o qual causa danos pequenos se a cultura for vigorosa, entretanto, sob condições de estresse a doença pode causar perdas de até 86%. Os sintomas podem variar de pequenas listras amarronzadas, no início da doença, até listras espessas que culminam por afetar todo tecido abaixo do solo. Como métodos de controle para a doença, sugere-se o emprego de cultivares resistentes ao patógeno, além de se evitar o plantio de alta densidade (ALLEN et al., 1996).

Por outro lado, a Murcha de fusarium, também conhecida como Amarelecimento, é causada por *F. oxysporum*, um patógeno que causa dessecação vascular por penetrar nos tecidos internos da raiz e do hipocótilo, onde se verifica a necrose do tecido, caracterizada por uma distinta descoloração marrom. A maneira mais efetiva para o controle da doença é através do uso de cultivares resistentes, porém, a adoção de práticas culturais que diminuam a densidade do inóculo e aumentem a fertilidade do solo podem reduzir a severidade da doença (ALLEN et al., 1996).

As espécies de *Rhizoctonia*, a exemplo de *R. solani*, geralmente são associadas a podridões de raiz-colo-caule e a doenças foliares. A *R. solani* é um fungo que provoca sérios danos ao feijão-caupi, ocorrendo em geral até a terceira semana depois do plantio. Os sintomas expressos pela planta atacada variam de podridões nas sementes e raízes, cancos no hipocótilo e tombamento das plântulas. O controle da doença é considerado difícil, visto que o patógeno tem elevada severidade por apresentar grande competição saprofítica, e capacidade de sobreviver no solo mesmo na ausência de hospedeiro (FERREIRA et al., 2009).

As espécies de *Macrophomina* estão sempre associadas a podridões do caule, a exemplo da podridão cinzenta do caule. Essa doença é causada pelo fungo *M. phaseolina*, tendo sido observada pela primeira vez no município de Campinas-SP, em 1935, atacando plantas de feijão-comum. A doença se manifesta atacando caule e raiz, o que determina graves prejuízos. No Brasil, o patógeno está presente em muitas áreas produtoras, tornando-se mais severo quando as condições ambientais revelam-se secas e com temperaturas elevadas. Como métodos de controle, recomendam-se o emprego de sementes saudáveis, plantio pouco adensado em áreas irrigadas, manejo adequado da água visando-se evitar o encharcamento do solo, assim como a utilização de um plano de rotação cultural que inclua gramíneas forrageiras (SOBRINHO et al., 2000; SOBRINHO et al., 2006).

As espécies de *Sclerotium*, assim como *Fusarium* sp., encontram-se geralmente associadas a podridões de raiz-colo-caule, a exemplo da Murcha/Podridão de esclerócio. Essa doença tem como agente causal o fungo *S. rolfsii*, cuja disseminação vem crescendo nos últimos anos. Em condições de campo, a disseminação ocorre principalmente pelo transporte de material contaminado (solo, esterco, mudas e sementes), assim como por esclerócios, os quais podem permanecer viáveis no solo por mais de cinco anos. O método de controle mais eficaz do patógeno, consiste no manejo preventivo, como promover aração profunda, evitar o acúmulo de matéria orgânica no solo, empregar espaçamentos abertos, promover planos de rotação da cultura e efetuar o tratamento do solo com fungicidas (SOBRINHO et al., 2000).

Assim como os vírus, bactérias, fungos e nematóides, diversas pragas causam danos diretos à cultura do feijão-caupi na região Nordeste. Dentre essas, merecem maior atenção os percevejos (*Nezara viridula*, *Piezodorus guildini* e *Crinocerus sanctus*), a cigarrinha verde (*Empoasca kraemerii*), a minadora das folhas (*Liriomyza sativae*), o trips (*Trips tabaci*), o manhoso (*Chalcodermus bimaculatus*) e a lagarta elasm (*Elasmopalpus lignosellus*). Entre as pragas que além de causar danos diretos são também vetoras de vírus, merecem atenção a vaquinha (*Ceratomyza arcuata*), a brasileirinha (*Diabrotica speciosa*), vetoras do CpSMV, os pulgões (*Aphis* spp.), vetores do CpAMV e CMV e a mosca branca (*Bemisia tabaci*), que é transmissora do CpGMV. Entre as pragas de pós-colheita, o caruncho (*Callosobruchus maculatus*) e a traça (*Plodia interpunctella*) são as mais importantes, as quais respondem pela quase totalidade das perdas ocorridas nos grãos armazenados (FREIRE FILHO et al., 1999; FREIRE FILHO et al., 2005).

As traças (*P. interpunctella*) são pequenas mariposas de aproximadamente 20 mm de envergadura, cabeça e tórax avermelhados, asas anteriores com dois traços distais também avermelhados e com o terço basal de coloração acinzentada, com alguns pontos escuros nítidos. As

lagartas são de coloração branco-rosada, tornando-se mais escuras quando próximas de empupar, período em que tecem um casulo de teia, restos de alimento e excrementos, entre os grãos, sacarias ou frestas das paredes. As fêmeas da espécie são capazes de ovipositar de 100 a 400 ovos, que se distribuem isoladamente ou agrupam-se sobre os grãos. Vale ressaltar que, por terem o corpo mole, as traças não penetram profundamente nos grãos armazenados a granel, atacando preferencialmente os grãos da superfície, em especial aqueles trincados ou quebrados (SILVA et al., 2005 In: FREIRE FILHO et al., 2005).

Os carunchos da espécie *C. maculatus*, são besouros que vivem cerca de cinco a oito dias, com aproximadamente 3 mm de comprimento, apresentando nos élitros manchas amarronzadas que, em repouso, formam um “x”. As fêmeas da espécie ovipositam em média 80 ovos nas superfícies dos grãos, que ao eclodirem, liberam larvas que penetram nos mesmos, alimentando-se de seu conteúdo interno. No interior da semente, as larvas transformam-se em pupas, e após a emergência, os adultos perfuram orifícios de saída para iniciarem novo ciclo biológico (SILVA et al., 2005 In: FREIRE FILHO et al., 2005).

Visto que ambos apresentam infestação cruzada, recomendam-se os mesmos métodos de controle tanto para a traça quanto para o caruncho, os quais consistem na limpeza e desinfecção dos armazéns no período da entressafra, realização do expurgo de todo material a ser estocado, pulverização posterior das superfícies do material expurgado e monitoramento dos grãos armazenados, sendo realizada amostragem mensal de cada lote e expurgando-se novamente aqueles infestados (SILVA et al., 2005 In: FREIRE FILHO et al., 2005).

3.9 Tolerância de Plantas a Insetos

Os insetos têm grande destaque no equilíbrio ecológico por serem capazes de habitar praticamente todos os ecossistemas, se adaptando facilmente às adversidades ambientais. Além disso, os insetos são muito importantes para a agricultura, como agentes polinizadores e no controle biológico. Por outro lado, algumas espécies de insetos são consideráveis na produção agropecuária, fato que evidencia a necessidade de controle destes organismos (MACHADO, 2009).

Segundo Gullan & Cranston (2007), uma determinada população de insetos recebe o *status* de praga quando apresenta abundância em indivíduos, os quais, em conjunto, são capazes de causar danos consideráveis. Em geral, o dano causado por um inseto, normalmente devido à alimentação, não chega a ocasionar perdas significativas, visto que as plantas são capazes de tolerar certo grau de

injúria, sendo então necessário que ocorra uma elevada densidade populacional da praga para danificar seriamente a cultura. Porém, em alguns casos, poucos indivíduos já são suficientes para provocar perdas econômicas significativas.

Diversos métodos buscam controlar o ataque por pragas, visando à redução dos danos ocasionados. Dentre estes, uma metodologia que merece destaque é o controle por resistência, o qual se refere à utilização de plantas melhoradas geneticamente, de forma a adquirir tolerância a determinadas pragas. Esse método não causa danos ao meio ambiente, além de permitir a manutenção da praga em níveis inferiores ao de dano econômico, evitando assim maiores gastos pelo produtor (GALLO, et al., 2002).

A tolerância de plantas a insetos reflete a existência de características genéticas herdadas, as quais fazem com que uma planta seja menos danificada por um inseto que outra suscetível, nas mesmas condições (GULLAN & CRANSTON, 2007). Segundo Lara (1991), a resistência é um caráter relativo, visto que sua expressão e efetividade podem variar de acordo com a situação, de forma que uma planta pode manifestar resistência em certas condições e manter ou não esse caráter em outras condições. Além disso, a resistência está diretamente relacionada com o inseto, visto que a planta pode ser resistente a certa espécie, mas suscetível a outra.

Ainda conforme Lara (1991), fatores relacionados com as plantas e insetos podem alterar a manifestação do caráter, a exemplo da idade da planta atacada, parte da planta atacada, ocorrência anterior de dano, fase de desenvolvimento do inseto, espécie, raça ou biotipo do inseto, assim como o tamanho da população. Inclusive, alguns fatores ambientais, a exemplo da temperatura, luminosidade, fertilidade do solo e umidade, podem também influenciar os níveis de tolerância nas plantas (PIZZAMIGLIO, 1991).

Dentre os tipos de resistência conhecidos, a resistência do tipo tolerância envolve apenas características nas plantas, dependendo somente da capacidade da própria planta de superar o dano causado pela alimentação do inseto (GULLAN & CRANSTON, 2007). Dessa forma, uma planta pode ser considerada tolerante quando sofre poucos danos em comparação as outras, sob um mesmo nível de infestação da praga, contudo, sem afetar o comportamento ou a biologia do inseto (LARA, 1991).

3.10 Aspectos Biológicos de *Callosobruchus maculatus* (Fabr.)

O caruncho (*C. maculatus*) pertence ao reino Animalia, filo Artropoda, classe Insecta, ordem Coleoptera, família Chrysomelidae, gênero *Callosobruchus* e espécie *C. maculatus*. Esse caruncho é conhecido por diversos nomes comuns, a exemplo de caruncho-do-caupi, bruquídeo-do-caupi e caruncho-do-caupi-sulista (BRIER, 2010). A duração completa do ciclo de vida do caruncho é de 26 dias a 30 °C. Durante o ciclo, os ovos são colocados em um líquido claro e pegajoso expelido pela fêmea, o qual serve de apoio para a penetração da larva no interior do grão. As larvas são do tipo curculioniforme, enquanto que as pupas apresentam coloração branca leitosa, medindo cerca de 3 mm de comprimento. Os adultos são pequenos (Figura 2), com comprimento podendo alcançar os 3 mm, similarmente as pupas, ao passo que as fêmeas, em geral maiores que os machos, apresentam quatro manchas claras bem definidas no pronoto, contrastando com a cor escura e brilhante do corpo (GALLO et al., 2002).

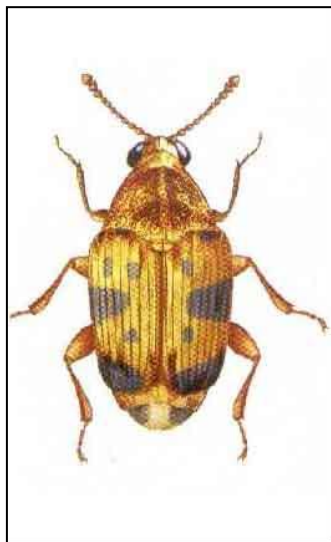


Figura 2. O caruncho *Callosobruchus maculatus* na forma adulta. (Fonte: <http://hena.republika.pl/atlas.html>).

A razão sexual da espécie é de 1:1, pois a forma adulta apresenta-se na proporção de uma fêmea para um macho. Durante o ciclo, as fêmeas põem em média 80 ovos nas superfícies dos grãos. Ao eclodirem, as larvas penetram diretamente os mesmos, alimentando-se de seu conteúdo interno. Dentro dos grãos, transformam-se em pupas e, após a emergência, os adultos perfuram orifícios de saída, e fora dos grãos reiniciam o ciclo biológico (SILVA et al., 2005 In: FREIRE FILHO et al., 2005). Além de infestar o feijão-caupi, o caruncho também ataca outros grãos de importância econômica, a exemplo de *Phaseolus vulgaris* (L.), *Vigna radiata* (L.), *Glycine max*

(L.), *Lens culinaris* (Medikus), *Pisum sativum* (L.), *Vicia faba* (L.), *Cajanus cajan* (L.) e *Cicer arietinum* (L.). Sua distribuição geográfica é ampla, podendo se encontrar a espécie na quase totalidade dos continentes, (BRIER, 2010).

O principal método de transmissão do caruncho é por meio das próprias sementes infestadas, a partir do estoque em armazenagem, ou por sementes que são contaminadas entre os armazéns ou fora deles. Considera-se os danos causados pelo caruncho como significativamente importantes porque, acima de tudo, podem provocar perda de peso total das sementes, bem como alterar sua qualidade nutricional. Além disso, a simples presença de insetos mortos e de excrementos sobre as sementes fazem com que a sua aceitabilidade seja prejudicada, o que acarreta sérios problemas para o comércio de grãos. Vale ressaltar que outro grande problema relacionado à presença de carunchos nos grãos, é devido à sua alta capacidade de reinfestar as sementes, visto que apenas um caruncho é capaz de causar 3,5% de perda de peso nos grãos armazenados (BRIER, 2010).

As infestações causadas pelo caruncho são de fácil identificação, visto que os ovos são colocados na superfície da semente (Figura 3), sendo visíveis a olho nu, além disso, como o desenvolvimento larval e a formação da pupa ocorrem dentro do grão, ao emergir, o inseto adulto deixa orifícios característicos no tegumento da semente. É importante salientar ainda, que o tipo de semente, assim como colheitas durante o inverno, seguidas de armazenamento por longos períodos de tempo, são considerados os fatores que mais influenciam as infestações pelo caruncho (BRIER, 2010).



Figura 3. Sementes de feijão-caupi com ovos de *C. maculatus* e orifícios de emergência (Foto da autora).

3.11 O Caruncho *Callosobruchus maculatus* e o Feijão-Caupi

Apesar de ser considerado o terceiro maior produtor e consumidor mundial de feijão-caupi, o Brasil tem sofrido constantemente com os danos causados à cultura por insetos, visto que, assim como em diversos países, essa leguminosa tem sido prejudicada por diversos insetos durante todo o seu ciclo de desenvolvimento, sendo em condições de armazenamento, atacada principalmente pelo caruncho *C. maculatus*, praga de importante destaque (TIMKO & SINGH, 2008; MARSARO Jr. & VILARINHO, 2011).

Os danos relativos à infestação pelo caruncho não decorrem apenas da penetração e alimentação das larvas no interior dos grãos, mas também da redução do peso, do poder germinativo, do valor nutritivo e do valor comercial dos grãos, assim como do grau de higiene do produto, devido à presença de ovos, excrementos e insetos (CASTRO et al., 2010). Em geral, a infestação intensifica-se durante o armazenamento, porém, se houver retardamento da colheita, as infestações podem se iniciar ainda no campo (CARVALHO et al., 2011; MARSARO Jr. & VILARINHO, 2011).

Devido ao ataque pelo caruncho chegar a provocar perdas totais de até 60% dos grãos armazenados, os agricultores, em especial os pequenos produtores, tentam adotar estratégias para o controle dessa praga através da utilização de produtos químicos, porém, embora esse tipo de controle, quando bem realizado, possa ser eficiente, as condições de armazenamento da maioria dos agricultores permitem reinfestações, da mesma forma que existem relatos sobre o surgimento de mecanismos de resistência a tratamentos químicos em várias espécies de insetos-praga. Por outro lado, a crescente preocupação da sociedade em relação aos efeitos colaterais causados pelos agrotóxicos, como a toxicidade para os aplicadores, poluição ambiental e presença de resíduos em alimentos, tem incentivado pesquisadores a desenvolver estudos sobre táticas de controle alternativo às pragas de armazenamento (MARTINAZZO et al., 2000; AZEVEDO et al., 2007; CASTRO et al., 2010; MELO et al., 2010; CARVALHO et al., 2011).

Por ser de fácil manejo, não oferecer riscos para a saúde humana e animal, apresentar baixo custo, não poluir o ambiente e ser compatível com outras estratégias de controle, o emprego de genótipos tolerantes surge como uma opção promissora a fim de minimizar as perdas causadas pelo caruncho durante o armazenamento de feijão-caupi (LIMA et al., 2004, MARSARO Jr. & VILARINHO et al., 2011). Vale salientar que já existem estudos que têm demonstrado a existência de genótipos de feijão-caupi tolerantes ao caruncho, a exemplo de Costa et al. (2004), que avaliaram

21 genótipos de feijão-caupi quanto à tolerância a *C. maculatus*, segundo as variáveis número de ovos viáveis e inviáveis, número de insetos e porcentagem de insetos emergidos, ciclo biológico de ovo a adulto, massa de grãos consumidos e massa de grãos consumidos por inseto, sendo capaz de identificar genótipos mais suscetíveis ao caruncho (IPA 206, CANAPU e CORUJINHA) assim como acessos menos suscetíveis (TE90 170 29F, TE90 170 76F, CNCx 405 17F e TE87 108 6G).

Anteriormente ao reportado por Costa et al. (2004), Lima et al. (2001) havia avaliado 30 genótipos de feijão-caupi quanto à tolerância ao caruncho, utilizando como variáveis para análise o número de ovos por fêmea, a viabilidade dos ovos, a duração e viabilidade da fase imatura, a taxa natural de crescimento populacional e o índice de tolerância. Dentre os 30 acessos estudados, cinco foram classificados como moderadamente tolerantes, 13 como suscetíveis e 11 como altamente suscetíveis, sendo apenas um genótipo (IT89KD-245) classificado como tolerante.

Resultados como esses revelam que diversos estudos têm procurado identificar genótipos de feijão-caupi portadores da tolerância ao caruncho, entretanto, é importante ressaltar que algumas informações têm se mostrado inconsistentes, o que reflete a necessidade de estudos adicionais, que busquem o isolamento dos fatores associados com a tolerância de alguns acessos de feijão-caupi ao caruncho (LIMA et al. 2001).

3.12 Estudos Genéticos do Feijão-Caupi

Acredita-se que o melhoramento do feijão-caupi no Brasil tenha começado na segunda metade do século XVI, pois nesse período iniciou-se a introdução de cultivares no País, de forma que os agricultores passaram a escolher apenas aqueles acessos que mais lhes agradavam, para plantio e consumo. Entretanto, o melhoramento genético propriamente dito começou apenas em 1925, provavelmente quando Henrique Lôbbe, pesquisador da época, publicou um trabalho no qual avaliou 12 cultivares de *V. unguiculata*. Contudo, somente anos depois, em meados da década de sessenta, que os primeiros trabalhos visando o melhoramento do feijão-caupi tiveram início na região Nordeste, tendo como objetivo básico o aumento da produtividade local. Nesses estudos, eram feitas coletas, bem como a caracterização de cultivares locais, as quais em seguida passavam por um processo de eliminação de plantas atípicas, a fim de serem testadas em ensaios de competição. Posteriormente, iniciou-se também a introdução de novos materiais, de forma que os ensaios passaram a conter cultivares provenientes de diversas localidades (FREIRE FILHO et al., 1999; FREIRE FILHO et al., 2011).

Após a introdução do melhoramento genético no País, mudanças positivas na cultura do feijão-caupi foram notadas, visto que seu cultivo ganhou amplitude significativa. Inicialmente, o cultivo era feito basicamente de forma manual, por pequenos e médios agricultores familiares, concentrando-se principalmente nas regiões Norte e Nordeste, entretanto, com o passar dos anos, a cultura passou a alcançar produtores empresariais, adeptos de lavouras totalmente mecanizadas, de forma que atualmente tem se expandido para os grandes pólos de produção de grãos e para os grandes centros de comércio e de consumo de outras regiões do país, principalmente das regiões Centro-Oeste e Sudeste (FREIRE FILHO et al., 2011).

Contudo, apesar de sua grande importância, o melhoramento genético clássico baseava-se apenas em características morfológicas, as quais eram utilizadas para se obter uma identidade para cada acesso estudado, de forma que por meio do conhecimento de uma série de dados, podia-se estudar a variabilidade genética de cada amostra. Entretanto, esse tipo de caracterização tem a desvantagem de ser altamente influenciada por fatores ambientais, o que pode prejudicar a expressão dos caracteres estudados, deixando de evidenciar a real similaridade ou diferença entre os indivíduos, o que altera significativamente a eficácia da técnica (MELO, 2010).

Dessa forma, o desenvolvimento e a utilização de técnicas bioquímicas e moleculares, em especial o emprego de marcadores moleculares, a exemplo dos RFLPs (Do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphisms*; Polimorfismos de Comprimento por Fragmentos de Restrição), RAPDs (Do inglês *Random Amplified Polymorphic DNAs*; Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso), AFLPs, e SSRs (Do inglês *Simple Sequence Repeats*; Repetições de Sequência Simples), têm facilitado enormemente as análises de genoma de plantas e sua evolução, incluindo as relações existentes entre as leguminosas, o que tem contribuído significativamente para o entendimento atual da organização e evolução do genoma do feijão-caupi (TIMKO & SINGH, 2008).

Vale ressaltar que um marcador molecular, definido como um segmento específico de DNA é capaz de representar diferenças ao nível molecular, podendo ou não se correlacionar com a herança de uma característica fenotípica. A utilização de tais marcadores oferece numerosas vantagens sobre as alternativas convencionais baseadas apenas no fenótipo, visto que marcadores de DNA permanecem estáveis e são detectáveis em todos os tecidos, assim como em qualquer estágio de crescimento, diferenciação, desenvolvimento ou fase celular, não sendo influenciados pelo ambiente, nem por efeitos pleiotrópicos ou epistáticos (AGARWAL et al., 2008). Outra questão importante é que, dependendo do tipo de marcador molecular empregado, taxas diferenciadas de substituição ou de evolução, podem ser observadas, de modo que, utilizando-se análises criteriosas

para a escolha do marcador, questões relativas à identificação de espécies ou formulação de hipóteses filogenéticas em grupos supra-específicos podem ser elucidadas (SOLÉ-CAVA, 2001).

Comparativamente à literatura existente sobre outras leguminosas, a exemplo do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), da ervilha (*Pisum sativum* L.), da soja (*Glycine max* L.) e da alfafa (*Medicago sativa* L.), os estudos com marcadores moleculares no feijão-caupi são recentes e escassos, tanto na caracterização, na avaliação e no manejo de germoplasma, quanto na identificação de cultivares e no desenvolvimento de mapas genéticos para auxiliar nos processos de cruzamento e seleção (EHLERS & HALL, 1997). Além disso, esses poucos estudos são voltados na sua maioria para a solução de aspectos da genética e do melhoramento de cultivares de feijão-caupi adaptados às regiões dos Estados Unidos e da África, diferentes dos demandados para a região Nordeste do Brasil (BENKO-ISEPPON, 2001).

Nesse sentido, o emprego de técnicas moleculares, a exemplo dos marcadores moleculares (marcadores de DNA), aliadas às metodologias clássicas de melhoramento genético se faz útil para o desenvolvimento de cultivares adequadas para cultivo em qualquer região do país, assim como para o desenvolvimento de cultivares com tipos de grãos que atendam às exigências dos mercados importadores, visto que, além de ser um produto de grande valor social e econômico para o Brasil, o feijão-caupi desempenha também grande papel no mercado internacional (FREIRE FILHO et al., 2011; BERED et al., 1997).

3.13 *Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)*

A técnica com marcadores do tipo ISSR envolve a amplificação de segmentos de DNA localizados entre duas regiões de repetições microssatélites idênticas, orientadas em sentidos opostos. O método utiliza microssatélites como primers, em uma PCR de primer único, atingindo assim loci múltiplos do genoma, a fim de se amplificar principalmente repetições entre sequências simples de tamanhos variados (SEMAGN et al., 2006).

Um número ilimitado de primers pode ser sintetizado a partir de várias combinações de di-nucleotídeos, tri-nucleotídeos, tetra-nucleotídeos e penta-nucleotídeos. Apesar dos primers poderem não se ancorar, em geral, na maioria dos casos eles se ancoram nas extremidades 3' ou 5', se estendendo até as sequências da cauda. Além disso, a técnica utiliza primers longos (15-30 nucleotídeos), quando comparados com os primers utilizados em RAPD (com apenas 10 nucleotídeos), o que permite o uso de temperaturas de anelamento mais altas (45 a 65 °C), as quais

variam de acordo com a quantidade de bases GC do primer utilizado (SEMAGN et al., 2006; SHARMA et al., 2008).

Os produtos de amplificação, em geral, têm comprimento que varia de 200-2000 pb, podendo ser detectados tanto por eletroforese em gel de agarose como em gel de poliacrilamida. É importante ressaltar também que, apesar de exibirem a especificidade dos marcadores microssatélites, os ISSRs não necessitam de conhecimento prévio da sequência para síntese do primer, o que reflete a vantagem de serem marcadores randômicos. Além disso, os ISSRs podem ser sintetizados por qualquer pesquisador, sendo uma técnica simples, rápida e que dispensa o uso de radioatividade (SEMAGN et al., 2006).

Vale salientar ainda que marcadores ISSR, normalmente, revelam alto polimorfismo, entretanto, o nível de polimorfismo pode variar de acordo com o método de detecção utilizado, a exemplo da eletroforese em gel de poliacrilamida, que em combinação com a radioatividade, tem se mostrado mais sensível que a eletroforese em gel de agarose. Além disso, apesar de serem marcadores dominantes, alguns ISSRs, ocasionalmente, exibem a co-dominância, existindo ainda a possibilidade de que assim como no caso dos marcadores RAPD, fragmentos encontrados na mesma posição se originem de regiões não homólogas (SEMAGN et al., 2006; SHARMA et al., 2008).

Com o passar dos anos, diversas pesquisas, especialmente estudos envolvendo genomas de vegetais, têm empregado cada vez mais marcadores ISSR em suas análises, e normalmente os resultados obtidos têm sido considerados satisfatórios, a exemplo de Li & Ge (2001), bem como de Wu et al. (2005), os quais aplicaram a técnica de ISSR com sucesso em análises de polimorfismo genético de espécies pertencentes à família Poaceae, da mesma forma que Gupta et al. (2008) aplicaram tais marcadores para diferenciar genótipos de *Jatropha curcas*, tendo obtido resultados capazes de evidenciar variabilidade genética entre os acessos estudados.

3.14 DNA Amplification Fingerprinting (DAF)

Marcadores moleculares do tipo DAF, assim como no caso do RAPD, utilizam primers arbitrários para amplificação, os quais são capazes de reproduzir segmentos de DNA pertencentes a qualquer espécie, sem a necessidade de qualquer informação prévia sobre a sequência. O padrão de bandas gerado pelo DAF é considerado altamente complexo, entretanto, considera-se que a inovação dessa técnica realmente se encontre no fato de utilizar um primer (oligonucleotídeo) único

e arbitrário, com o objetivo de se reproduzir uma dada amostra de DNA sem conhecimento algum da sequência de interesse (SEMAGN et al., 2006).

Acredita-se que a amplificação de ácidos nucleicos por primers arbitrários seja direcionada principalmente pela interação entre o primer, os sítios padrão de anelamento e as enzimas, o que é determinado basicamente pelo complexo cinético e por processos termodinâmicos. Nessa técnica, os produtos da PCR são obtidos a partir de uma temperatura de anelamento adequada, quando o primer único se liga a sítios localizados em margens opostas do genoma, além disso, os sítios de anelamento precisam se localizar a uma distância amplificável, o que em geral delimita que os mesmos tenham comprimento inferior a 3000 pb (SEMAGN et al., 2006).

Assim como no RAPD, os polimorfismos (presença ou ausência de bandas) gerados pelo DAF resultam de mutações na sequência, as quais inibem a ligação do primer, ou interferem na amplificação de um marcador específico em alguns indivíduos, sendo, portanto, detectados apenas como fragmentos de DNA passíveis de reprodução em certo indivíduo, mas não em outro. Contudo, mesmo sendo bastante similares, o protocolo para DAF difere em algumas questões daquele aplicado para RAPD, como é o caso do uso de primers de diferentes tamanhos, desde primers curtos (com no mínimo 5 pb) até maiores (com 15 pb), além de altas concentrações de primers, uso de dois ciclos de temperatura ao invés de três, e pela detecção dos produtos de amplificação, que pode ser em gel de poliacrilamida (SEMAGN et al., 2006) ou agarose (BENKO-ISEPPON et al., 2003; SIMON et al., 2007).

Entretanto, apesar da eficiência do RAPD, Benko-Iseppon et al. (2003) consideram o DAF como uma técnica vantajosa sobre esse método, visto que tal marcador é capaz de gerar um grande número de bandas polimórficas com boa reprodutibilidade, independentemente do tamanho dos primers, mostrando-se mais eficiente para o mapeamento genético do que o RAPD, que apresentou grandes níveis de distorção de segregação. Além disso, a eficácia do DAF tem sido comprovada pela sua ampla aplicação em estudos envolvendo diversos organismos, principalmente plantas, animais e microorganismos. No caso do feijão-caupi, trabalhos recentes têm revelado a eficiência do DAF, a exemplo dos estudos de Simon et al. (2007) e de Spiaggia et al. (2009).

Simon et al. (2007) utilizaram 26 primers DAF para avaliar a diversidade genética entre 85 acessos do gênero *Vigna* (dentre os quais 65 pertenciam à espécie *V. unguiculata*), tendo obtido resultados que distinguiram claramente os genótipos de *V. unguiculata* tradicionalmente cultivados no Brasil de materiais cultivados no continente africano. Spiaggia et al. (2009), por sua vez,

aplicaram nove primers DAF na análise de 30 genótipos de *Vigna* (dos quais 28 acessos eram de feijão-caupi), com a geração de um dendrograma capaz de revelar diversidade genética ao nível intraespecífico. Resultados como esses revelam que marcadores DAF são capazes de gerar polimorfismos significativos até em níveis intraespecíficos, podendo assim ser considerados marcadores extremamente eficientes em comparação com outros métodos de análise, a exemplo do RAPD.

4. Referências Bibliográficas

- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular markers techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, v.27, p.617-631, 2008.
- AKANDE, S. R. Genotype by environment interaction for cowpea seed yield and disease reactions in the forest and derived savanna agro-ecologies of south-west Nigeria. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science**, v.2, p.163-168, 2007.
- ALLEN, D. J.; AMPOFO, J. K. O.; WORTMANN, C. S. **Pragas, doenças e problemas nutricionais do feijoeiro na África: guia de campo**. Cali, Colombia: Centro Internacional para a Agricultura Tropical: Wageningen, Países Baixos: Centro Técnico para Cooperação Agrícola e Rural, 1996. 132p. (Publicação do CIAT; no. 261) ISBN 958-9439-65-9
- ARAÚJO, J. P. P. (Ed.). **Cultura do caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp: descrição e recomendações técnicas de cultivo**. Goiânia: EMBRAPA-CNPAF, 1984. 82p. (EMBRAPA CNPAF. Circular Técnica, 18).
- ARAÚJO, J. P. P. Melhoramento do caupi no Brasil. In: ARAÚJO, J. P. P. de; WATT, E. E. (Org.). **O caupi no Brasil**. Brasília: EMBRAPA/IITA, 1988. p.251- 283.
- ASSUNÇÃO, I. P.; M.-FILHO, L. R.; RESENDE, L. V.; BARROS, M. C. S.; LIMA, G. S. A.; COELHO, R. S. B.; LIMA, J. A. A. Genes diferentes podem conferir resistência ao Cowpea severe mosaic virus em caupi. **Fitopatologia Brasileira** 30:274-278. 2005.
- AZEVEDO, F. R.; LEITÃO, A. C. L.; LIMA, M. A. A.; GUIMARÃES, J. A. 2007. Efficacy of natural products to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) in stored cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). **Revista Ciência Agronômica**, v. 38, n.2, p.182-187.
- BARRACLOUGH, G. (Ed.). **Atlas da história do mundo da Folha de São Paulo/Times**. 4. ed. rev. São Paulo: Folha da Manhã, 1995. p. 154-157. In: FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E. V. Produção, Melhoramento Genético e Potencialidades do Feijão-Caupi no Brasil. IV Reunião de Biofortificação. Teresina-PI. Brasil. 2001. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/897440/1/Produçãomelhoramento.pdf>. Acesso em 20 de Outubro de 2011.

- BARRETO, P. D. **Recursos genéticos e programa de melhoramento de feijão-de-corda no Ceará: avanços e perspectivas.** In: QUEIRÓZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.
- BARROS, A. H. C.; TABOSA, J. N.; ANDRADE JÚNIOR, A. S.; SILVA, A. A. G.; SANTOS, J. C. P.; AMARAL, J. A. B.; LACERDA, F. F.; SILVA, A. C.; BASTOS, L. O. P. **Zoneamento de risco climático para cultura do feijão-caupi no estado de Pernambuco.** Embrapa Documentos. 2005. Disponível em: <http://www.cpmn.embrapa.br/soloaguasclima/doc/Aderson/REs/CBAGRO2005/RE35.doc>. Acesso em 23 de Outubro de 2011.
- BENKO-ISEPPON, A. M. **Estudos moleculares no caupi e em espécies relacionadas: avanços e perspectivas.** EMBRAPA Documentos 56: 327-332. 2001.
- BENKO-ISEPPON, A. M.; WINTER, P.; HUETTEL B.; STAGINNUS, C.; MUEHLBAUER, F. J.; KAHL, G. 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**, v.107, p.379-386, 2003.
- BENKO-ISEPPON, A. M.; SOARES-CAVALCANTI, N. M.; WANDERLEY-NOGUEIRA, A. C.; BERLARMINO, L. C.; SILVA, R. R. M.; ALMEIDA, P. M. L.; BRUNELLI, K. R.; KIDO, L. M. H.; KIDO, E. A. **Genes associados a estresses bióticos e abióticos em feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e outras angiospermas.** In: NOGUEIRA, R. J. M. C.; ARAÚJO, E. L.; WILLADINO, L. G.; CAVALCANTE, U. M. T. (Eds.): Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas. Recife: UFRPE, 2005. p.350-359.
- BERED, F.; BARBOSA NETO, F. J.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, v.27, p.513-520, 1997.
- BRAMMER, S. P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal.** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 7p. (Embrapa Trigo. Documentos online, 3). Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do_03.htm. Acesso em 03 de Novembro de 2011.

- BRIER, H. **Diagnostic methods for cowpea weevil or cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus***. 40 pag. 2010. Austrália. Disponível em: <http://www.padil.gov.au/pbt>. Acesso em 29 de Outubro de 2011.
- CARVALHO, R. O.; LIMA, A. C. S.; ALVES, J. M. A. **Resistência de genótipos de feijão-caupi ao *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera: Bruchidae)**. Revista Agro@mbiente, On-line, v. 5, n. 1, p. 50-56, jan-abril, 2011. Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, RR. Disponível em <http://www.agroambiente.ufrr.br>. Acesso em 01 de Novembro de 2011.
- CASTRO, M. J. P.; SILVA, P. H. S.; SANTOS, J. R.; SILVA, J. A. L. Efeito de pós vegetais sobre a oviposição de *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera; Bruchidae) em Feijão-Caupi. Teresina, PI. Brasil. **Bioassay**, v. 5, 2010. Disponível em: <http://www.bioassay.org.br/ojs/index.php/bioassay/article/viewArticle/44/115>. Acesso em 22 de Outubro de 2011.
- COSTA, N. P. da; BOICA, A. L. J. Effect of cowpea genotypes, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., on the development of *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae). **Neotropical Entomology**, v.33, n.1, p.77-83, Jan. 2004.
- COULIBALY, S.; PASQUET, R. S.; PAPA, R.; GEPTS, P. AFLP analysis of the phenetic organization and genetic diversity of *Vigna unguiculata* L. Walp. reveals extensive gene flow between wild and domesticated types. **Theoretical and Applied Genetics**, v.104, p.358–366, 2002.
- CRAUFURD, P. Q.; SUBEDI, M.; SUMMERFIELD, R. J. Leaf appearance in Cowpea: Effects of temperature and photoperiod. **Crop Science**, v.37, p.167-171, 1997.
- CURTIN, P. D. 1969. The Atlantic slave trade: a census. University of Wisconsin Press, Madison. pp. 74-102. In: SIMON, M. V.; BENKO-ISEPPON, A. M.; RESENDE, L. V.; WINTER, P.; KAHL, G. (2007). **Genetic diversity and phylogenetic relationships in *Vigna* Savi germplasm revealed by DNA amplification fingerprinting (DAF)**. Genome, 50: 538-547.
- EHLERS, J. D.; HALL, A. E. Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.)Walp). **Field Crops Research**, v.53, p.187-204, 1997.

- FERREIRA, E. P. B.; VOSS, M.; SANTOS, H. P.; DE-POLLI, H.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G.; Diversidade de *Pseudomonas* fluorescentes em diferentes sistemas de manejo do solo e rotação de culturas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 4, n. 2, p. 140-148, Abr./Jun.2009.
- FIGUEIRAS, G. C.; SANTOS, M. A. S.; HOMMA, A. K.O.; REBELLO, F. K.; CRAVO, M. S. Aspectos socioeconômicos. In: ZILLI, J. E.; VILARINHO, A. A.; ALVES, J. M. A. **A cultura do feijão-caupi na Amazônia brasileira**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2009. Cap. 1, p. 23-58.
- FREIRE FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi. In: ARAÚJO, J. P. P. de; WATT, E. E. (Org.). **O caupi no Brasil**. Brasília, EMBRAPA/IITA, 1988. p.27-46.
- FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; VIANA, F. M. P.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão caupi: avanços**. In: FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E. V. **Produção, melhoramento genético e potencialidades do feijão-caupi no Brasil**. IV Reunião de Biofortificação, Teresina, PI, Brasil, 2011. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/897440/1/Produçãomelhoramento.pdf>. Acesso em 20 de Outubro de 2011.
- FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, A. A. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; VIANA, F. M. P.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão caupi: avanços tecnológicos**. Embrapa Meio-Norte. 640p. 2005.
- FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, C. A. F. Melhoramento genético de Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. na região Nordeste. In: QUEIROZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.) Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. Petrolina: Embrapa-CPATSA; Brasília, DF: Embrapa-Cenargen, 1999. Disponível em: <http://www.cpatssa.embrapa.br/catalogo/livrorg/index.html>. Acesso em 28 de Outubro de 2011.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

- GANDAVO, P. de M. **Tratado da terra do Brasil: tratado segundo, das coisas que são gerais por toda costa do Brasil**. Cap. 4, dos mantimentos da terra. Rio de Janeiro: Ministério da Cultura. Fundação Biblioteca Nacional. Departamento Nacional do Livro. Criado em: 10 jun. 2001. Disponível em: http://objdigital.bn.br/Acervo_Digital/livros_eletronicos/tratado.pdf. Acesso em 14 de Outubro de 2011.
- GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **Os insetos: um resumo de entomologia**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2007. 440 p.
- GUPTA, S.; SRIVASTAVA, M., MISHRA, G. P.; NAIK, P. K.; TIWARI, S. K.; KUMAR, M.; SINGH, R. Analogy of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different *Jatropha curcas* genotypes. **African Journal of Biotechnology**, v.7, n.23, p.4230-4243, 2008.
- HALL, A. E. Breeding for adaptation to drought and heat in cowpea. **European Journal of Agronomy**, v.21, p.447–45, 2004.
- HALL, A. E; ISMAIL, A. M.; EHLERS, J. D.; MARFO, K. O.; CISSE, N.; THIAW, S.; CLOSE, T. J. Breeding cowpeas for tolerance to temperature extremes and adaptation to drought. In: FATOKUN, C. A. ; TARAWALI, S. A. ; SINGH, B. B.; KORMAWA, P. M.; TAMO, M. (Eds.). **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production**. Ibadan, Nigeria: International Institute of Tropical Agriculture, 2002. p.14–21.
- LANGYINTUO, A. S.; LOWENBERG-DEBOER, J.; FAYE, M.; LAMBERT, D.; IBRO, G.; MOUSSA, B.; KERGNA, A.; KUSHWAHA, S.; MUSA, S.; NTOUKAM, G. Cowpea supply and demand in West and Central Africa. **Field Crops Research**, v.82, n.2-3, p. 215-231, 2003.
- LARA, F. M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. São Paulo: Icone. 1991, 336 p.
- LI, A.; GE, S. Genetic variation and clonal diversity of *Psammochloa villosa* (Poaceae) detected by ISSR markers. **Annals of Botany**, v.87, p.585–590, 2001.
- LIMA, L. M.; ARAÚJO, A. H.; OLIVEIRA, A. S.; PEREIRA, R. A. Comparative digestibility and the inhibition of mammalian digestive enzymes from mature and immature cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seeds. **Food Control**, v.15, n.2, p.107-110, 2004.

- LIMA, M. P. L.; OLIVEIRA, J. V.; BARROS, R.; TORRES, J. B. GONÇALVES, M. E. C. Estabilidade da resistência de genótipos de caupi a *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) em gerações sucessivas. **Scientia Agricola**, v.59, p.275-280, 2002.
- LIMA, M. P. L.; OLIVEIRA, J. V.; BARROS, R.; TORRES, J. B. Identification of cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. genotypes resistant to *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera: Bruchidae). **Neotropical Entomology**, v.30, n.2, p.289-295, 2001.
- MACHADO, L. P.; GUERRA, Y. L.; BEZERRA, C. S.; SOUSA, L. T.; MICHEREFF, S. J. **Manejo da rizoctoniose do caupi com rotações de cultura**. 2010, Recife. JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX, 2010. Recife: UFRPE, 2010. Não paginado.
- MACHADO, R. C. M. **Interação inseto-planta e suas implicações no manejo integrado de pragas**. 2009. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/21624/000737286.pdf?sequence=1>. Acesso em janeiro/2012.
- MARANGONI, S. Copaíba contra o caruncho. **Revista Pesquisa FAPESP**, v.71, p.10-12, 2002.
- MARSARO JUNIOR, A. L. **Insetos-praga e seus inimigos naturais na cultura do feijão-caupi no Estado de Roraima**. In: WORKSHOP SOBRE A CULTURA DO FEIJÃO-CAUPI EM RORAIMA, 2007, Boa Vista. **Anais...** Boa Vista: UFRR, Embrapa, 2007.
- MARSARO JUNIOR, A. L.; VILARINHO, A. A. Resistência de cultivares de feijão-caupi ao ataque de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchidae) em condições de armazenamento. **Revista Acadêmica, Ciências Agrárias Ambientais**, v.9, n.1, p.51-55, 2011.
- MARTINAZZO, A. P.; FARONI, L. R. D. A.; BERBERT, P. A.; REIS, F. P. Utilização da fosfina em combinação com o dióxido de carbono no controle do *Rhyzopertha dominica* (f.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.6, p.1063-1069, 2000.
- MELO, R. A. **Caracterização morfo-agronômica e molecular, processamento mínimo e utilização de raio-X em sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.)**. 2010. 103p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2010.

- MELO, R. A.; FORTI, V. A.; CICERO, S. M.; NOVENBRE, A. D. L. C.; MELO, P. C. T. Use of X-ray to evaluate damage caused by weevils in cowpea seeds. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 4, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362010000400016&lng=en&nrm=iso. Acesso em 27 de Outubro de 2011.
- NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Reação de cultivares de feijão-caupi a mela (*Rhizoctonia solani*) em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 5, Out. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582007000500009>. Acesso em 18 de Outubro de 2011.
- PADULOSI, S.; NG, N. Q. Origin, taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SINGH, B. B. et al. **Advances in cowpea research**. Tsukuba: IITA/ JIRCAS, 1997. p.1-12.
- PASQUET, R. S.; BAUDOIN, J. P. Cowpea. In: CHARRIER, A.; JACQUOT, M.; HAMON, S.; NICOLAS, D. (Eds.). **Tropical plant breeding**. Enfield, USA: Science publishers/CIRAD, 2001. p.177-198.
- PIZZAMIGLIO, A. A., 1991. Ecologia das interações inseto/planta p. 101-129. In: **Ecologia Nutricional de Insetos e suas Implicações no Manejo de Pragas**. (A.R. Panizzi, & J.R.P. Parra, eds). Editora Manole Ltda e co-edição CNPq, 359 p.
- ROCHA, F. M. R.; MOUSINHO, S. F.; FREIRE FILHO, F. R.; SILVA, A. S. M. de S.; BEZERRA, A. A. de C. Aspectos da biologia floral do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: REUNIÃO NACIONAL DO CAUPI, 2001, Teresina. **Anais...** Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2001. p. 27-29.
- SEMAGN K.; BJØRNSTAD Å.; NDJIONDJOP, M. N. An overview of molecular marker methods for plant. **African Journal of Biotechnology**, v.25, p.2540-2569, 2006.
- SHARMA, A.; NAMDEO, A. G.; MAHADIK, K. R.; Molecular markers: new prospects in plant genome analysis. **Pharmacognosy**, v.2, n.4, p.23-34, 2008.
- SILVA, P. H. S.; CARNEIRO, J. S.; QUINDERÉ, M. A. W. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; VIANA, F. M. P.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão caupi: avanços tecnológicos**. Embrapa Meio-Norte. 640p. 2005.

- SIMON, M. V.; BENKO-ISEPPON, A. M.; RESENDE, L. V.; WINTER, P.; KAHL, G. Genetic diversity and phylogenetic relationships in *Vigna* Savi germplasm revealed by DNA amplification fingerprinting (DAF). **Genome**, v.50, p.538-547, 2007.
- SINGH, B. B.; EHLERS, J. D.; SHARMA, B.; FREIRE FILHO, F. R. Recent progress in cowpea breeding. In: FATOKUN, C.A. et al. (Ed.). **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production**. Ibadan: IITA, 2002. p.22-40.
- SOBRINHO, A. C.; CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R. & MENTEN, J. O. M. **Dinâmica de fenilalanina amonia-liase e peroxidase em feijão-caupi tratado com acibenzolar-s-metil**. 2006. Disponível em: <http://www.cpamn.embrapa/anaisconac2006/resumos/fs14.pdf>. Acesso em dezembro/2011. np.
- SOBRINHO, C.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. Doenças do feijão caupi. In: CARDOSO, M. J. **A cultura do feijão-caupi no Meio-Norte do Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2000. 264 p. il. (Embrapa Meio-Norte. Circular Técnica, 28).
- SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S.R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto-SP: Holos, 2001. p. 172-192.
- SOUSA, A. H.; MARACAJÁ, P. B. ; SILVA, R. M. A. ; MOURA, M. N. ; ANDRADE, W. G. Bioactivity of vegetal powders against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) in caupi bean and seed physiological analysis. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.5, n.2, p. 19, 2005.
- SOUZA, G. de. Em que se apontam os legumes que se dão na Bahia. In: FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E. V. **Produção, melhoramento genético e potencialidades do feijão-caupi no Brasil**. IV Reunião de Biofortificação, 2011, Teresina, PI, Brasil. Disponível em:<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/897440/1/Produçãomelhoramento.pdf>. Acesso em 20 de Outubro de 2011.
- SPIAGGIA, F.; CARVALHO, R.; BENKO-ISEPPON, A. M. Preliminary molecular characterization of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Accessions by DAF (DNA Amplification Fingerprinting). **Gene Conserve**, On line, v.8, n.34, p.818-828, 2009. Disponível em: <http://www.geneconserve.pro.br/artigo075.pdf>. Acesso em 26 de Outubro de 2011.

- TIMKO, M. P.; EHLERS, J. D.; ROBERTS, P. A. 2007. Cowpea: pulses, sugar and tuber crops. **Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants**, v. 3, p.49-67, 2007.
- TIMKO, M. P.; SINGH, B. B. Cowpea, a multifunctional legume. In: MOORE, P. H.; MING, R. (Eds). **Genomics of tropical crop plants**. Springer Science + Business Media. New York, NY: LLC, 2008. p. 227-258.
- VIEIRA, R. F.; VIEIRA, C.; CALDAS, M. T. Comportamento do feijão-fradinho na primavera-verão na zona da mata de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.7, p.1359-1365, 2000.
- VIJAYKUMAR, A.; SAINI, A.; JAWALI, N. Phylogenetic analysis of subgenus *Vigna* species using nuclear ribosomal RNA ITS: Evidence of hybridization among *Vigna unguiculata* subspecies. **Journal of Heredity**, v.101, n.2, p.177–188, 2010.
- WU, W.; ZHENG, Y. L.; CHEN, L. Evaluation of genetic relationships in the genus *Houttuynia* Thunb. in China based on RAPD and ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, n. 33, p. 1141-1157, 2005.
- XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RUMJANEK, N; G.; FREIRE FILHO, F. R. Variabilidade genética em acessos de caupi baseada em marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 353-359, 2005.

5. Manuscrito de Artigo Científico

Diversidade genética associada à tolerância do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) ao caruncho *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) por meio de marcadores moleculares

Leite, N. G. A.¹; Amorim, L. L. B.²; Onofre, A. V. C.³; Costa, A. F.⁴; Benko Iseppon, A. M.⁵

¹Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE 50732970, Brasil (e-mail: leitenga@gmail.com)²Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE 50732970, Brasil (e-mail: amorim.lidiane@gmail.com)³Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE 50732970, Brasil (e-mail: viniciusalberto@gmail.com)⁴Instituto Agrônomo de Pernambuco, Recife-PE 50761000, Brasil (e-mail: felix.antonio@ipa.br)⁵Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE 50732970, Brasil (e-mail: ana.iseppon@gmail.com)

Keywords: Tolerance against pests, ISSR - Inter Simple Sequence Repeat, DAF - DNA Amplification Fingerprinting, molecular markers.

Resumo

Dentre as pragas do pós-colheita que mais dano causam aos grãos armazenados de feijão-caupi, o caruncho *Callosobruchus maculatus* tem grande destaque, sendo responsável pela redução da qualidade e do valor comercial dos grãos. O emprego de inseticidas como método de controle dessa praga não tem possibilitado a obtenção de resultados satisfatórios, sendo a utilização de cultivares tolerantes considerada uma alternativa promissora. Neste contexto, o presente trabalho buscou avaliar acessos de feijão-caupi quanto ao nível de resposta a infestação pelo caruncho *C. maculatus* (caruncho do caupi), relacionando os dados obtidos à variabilidade genética através de marcadores moleculares DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) em comparação a acessos de táxons relacionados (*V. unguiculata* ssp. *cylindrica* e *V. radiata*). Um total de 27 acessos de feijão-caupi foram avaliados quanto ao nível de resposta a infestação pelo caruncho, utilizando-se o Delineamento Experimental Inteiramente Casualizado, com quatro repetições e um grupo controle. Após submissão dos resultados obtidos a análise estatística, os acessos PATATIVA e MNC99-537F-4 foram considerados tolerantes a infestação pelo caruncho, o acesso INHUMA foi considerado suscetível a infestação, enquanto que os demais acessos avaliados apresentaram comportamento intermediário. A caracterização molecular, a partir de 25 primers, permitiu a construção de um fenograma pelo método *Neighbor-Joining* (Agrupamento de Vizinhaça), em que os acessos de *V. unguiculata* ssp. *cylindrica* e *V. radiata* assumiram uma posição basal em relação aos acessos de *V. unguiculata*, que se subdividiram em dois grupos, nos quais os acessos contrastantes quanto ao nível de resposta a infestação

distribuíram-se em subgrupos distintos, evidenciando diversidade genética entre os genótipos avaliados.

Genetic diversity associated with tolerance of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) to the weevil *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) using molecular markers

Abstract

Of the post-harvest pests that cause more damage to the stored cowpea grains, *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) has great importance, being responsible for the reduction of quality and commercial value of the grain. The use of insecticides as a method to control the pest does not allow the achievement of satisfactory results, thus the use of tolerant cultivars is considered a promising alternative. In that context, the present study aimed to evaluate cowpea accessions regarding the response to the infestation of *C. maculatus* (cowpea weevil), relating data obtained to genetic variability through molecular markers DAF (DNA Amplification Fingerprinting) and ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) comparing to accessions of related taxa (*V. unguiculata* ssp. *cylindrica* and *V. radiata*). In total, 27 cowpea accessions were evaluated regarding the response to the weevil infestation by using the Completely Randomized Design, with four replications and a reference group. After submitting the obtained results to statistical analysis, the accessions PATATIVA and MNC99-537F-4 were considered tolerant to weevil infestation, the accession INHUMA was considered susceptible to infestation, while the other accessions tested showed intermediate behavior. The molecular characterization, using 25 primers, allowed the construction of a phenogram through Neighbor-Joining method, where the accessions of *V. unguiculata* ssp. *cylindrica* and *V. radiata* assumed a basal position in relation to *V. unguiculata* accessions, which are subdivided into two groups, where contrasting accessions regarding the response to infestation distributed into distinct subgroups, suggesting genetic diversity among the evaluated genotypes.

5.1 Introdução

Devido ao alto teor protéico de seus grãos, o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) apresenta grande importância social e econômica, o que reflete o emprego da cultura como fator fixador de mão-de-obra, gerador de empregos e de matéria-prima (FREIRE FILHO et al. 1999). Além do valor nutritivo, o feijão-caupi destaca-se por ser uma espécie versátil e adaptável, componente essencial de sistemas de produção nas regiões secas dos trópicos, as quais cobrem parte

da África, Ásia, Oriente Médio e Américas do Norte, Central e do Sul, à exemplo do semi-árido do Nordeste brasileiro (SINGH et al., 2002).

Por ter despertado o interesse dos grandes produtores, praticantes da agricultura empresarial, o cultivo do feijão-caupi tem se expandido tanto em área cultivada quanto comercialmente, da região Nordeste para outras regiões do país, inclusive para o exterior. Atualmente, tal expansão tem posicionado o Brasil como o terceiro maior produtor mundial de feijão-caupi, entretanto, durante o período de armazenamento dos grãos, perdas significativas devido ao ataque por pragas tem se constituído em um dos principais problemas da cultura, comprometendo a quantidade e a qualidade da produção. Dentre as principais pragas que acometem a espécie na fase de pós-colheita e armazenamento, destaca-se o caruncho *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera: Chrysomelidae), que por infestar os grãos nessas fases torna-se responsável por uma redução significativa da qualidade e do valor comercial do produto (SOUSA et al., 2005; FREIRE FILHO et al., 2006).

Os danos relativos à infestação pelo caruncho são considerados impactantes, visto que o inseto já foi indicado como sendo capaz de destruir cerca de metade da safra anual brasileira de feijão-caupi, além disso, chegou também a causar perdas de 40% na produção dos principais grãos colhidos no país, como milho, trigo, soja e arroz (MARANGONI, 2002). Infelizmente, o controle do caruncho em associação ao dos demais insetos-pragas, tem sido realizado em larga escala por meio de produtos químicos (inseticidas). Todavia, relatos sobre o surgimento de mecanismos de resistência a esses tipos de tratamentos, têm sido cada vez mais frequentes em várias espécies de insetos (MARTINAZZO et al., 2000; BORGES & VILA NOVA, 2011).

Segundo Lima et al. (2002), visando-se a redução dos danos e perdas observados durante o período de armazenamento, o emprego de cultivares tolerantes tem se constituído em uma alternativa promissora em relação ao uso de inseticidas. Nesse sentido, diversos estudos têm procurado identificar genótipos de feijão-caupi tolerantes ao caruncho. Carvalho et al. (2011) avaliaram a tolerância de nove genótipos de feijão-caupi ao caruncho. Dentre as variáveis escolhidas para análise, destacaram-se o número de ovos viáveis e inviáveis e o número de insetos emergidos. Da mesma forma, Marsaro Jr. & Vilarinho (2011), ao avaliarem 26 cultivares de feijão-caupi quanto à tolerância ao caruncho, escolheram o número de insetos emergidos como uma de suas variáveis. Vale salientar que, com base nos parâmetros utilizados, ambos os trabalhos foram capazes de identificar acessos com níveis consideráveis de tolerância ao caruncho.

Entretanto, em plantas, os descritores morfoagronômicos (marcadores morfológicos), que se baseiam em características vegetativas, podem ser influenciados por fatores ambientais, podendo não representar com fidelidade as similaridades ou diferenças existentes entre os indivíduos (WEISING et al., 2004). Dessa forma, o uso da biologia molecular, incluindo marcadores moleculares, torna-se necessário para uma seleção mais eficiente dos recursos genéticos, facilitando a detecção da real variabilidade genética, tanto para fins de melhoramento convencional como para fins biotecnológicos, visto que estes podem ser mais informativos e estáveis do que os descritores morfoagronômicos (BENKO-ISEPPON et al., 2005).

Dentre os marcadores moleculares potencialmente úteis em estudos para o melhoramento de plantas, ISSR (Do inglês *Inter Simple Sequence Repeat*; Repetições Entre Sequências Simples) e DAF (Do inglês *DNA Amplification Fingerprinting*; Impressão Baseada na Amplificação do DNA) apresentam-se como técnicas promissoras. Os marcadores ISSR são facilmente detectados com o uso de poucos equipamentos, além de serem bastante variáveis e fornecerem um grande número de dados com um custo razoável para o pesquisador (WOLFE et al., 2005), enquanto que os marcadores DAF têm sido considerados como ferramentas importantes para identificação de acessos, avaliação do grau de parentesco entre indivíduos, estudo da variabilidade genética e construção de mapas de ligação (CAETANO-ANOLLÉS et al., 1991; BENKO-ISEPPON et al., 2003; SIMON et al., 2007).

Contudo, mesmo havendo estudos que avaliem diferentes acessos de feijão-caupi quanto à tolerância ao ataque do caruncho, trabalhos que associem esses acessos a aspectos moleculares ainda são escassos. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo realizar uma análise da variabilidade genética entre acessos de feijão-caupi, que apresentam diferentes respostas a infestação pelo caruncho *C. maculatus*, por meio de marcadores moleculares ISSR e DAF, visando-se inferir sobre a diversidade genética dos acessos e seu possível uso no melhoramento convencional e ainda indicar possíveis parentais contrastantes quanto ao nível de resposta a infestação pelo caruncho, para uso em cruzamentos com fins de mapeamento.

5.2 Material e Métodos

Material Vegetal

Sementes de 27 acessos (cultivares e linhagens) de feijão-caupi (Tabela 1), foram fornecidas pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), bem como pela Empresa Brasileira de Pesquisa

Agropecuária (EMBRAPA) Meio Norte e Clima Temperado, incluindo ainda sementes de variedades tradicionais coletadas no estado de Pernambuco. As sementes de *V. unguiculata* ssp. *cylindrica* e *V. radiata* foram fornecidas pelo The Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) em Gatersleben (Alemanha).

As plantas obtidas a partir das sementes foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos com capacidade para cinco quilos de solo, utilizando-se uma mistura de duas partes de solo e uma de adubo orgânico. Antes do cultivo, as sementes foram tratadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,4%, mantendo-se quatro plantas por vaso, para posterior extração do DNA genômico. As sementes dos 27 acessos de feijão-caupi foram utilizadas também nos ensaios de tolerância ao caruncho.

Criação de C. maculatus

Os insetos adultos pertencentes a espécie *Callosobruchus maculatus*, os quais foram utilizados para instalação das criações, foram fornecidos pelo Professor Doutor José Vargas de Oliveira, professor titular da Universidade Federal Rural de Pernambuco e Doutor em Entomologia. Seguindo-se a metodologia descrita em Santos (1976), os carunchos obtidos foram criados à temperatura ambiente por sucessivas gerações em grãos de SEMPRE VERDE, uma cultivar de feijão-caupi que é considerada suscetível a infestação pelo inseto. Os grãos de SEMPRE VERDE infestados foram alocados em recipientes de vidro cobertos com tecido tipo *voil* (Figura 1), para facilitar a visualização dos insetos bem como a troca gasosa com o ambiente, respectivamente. Diariamente as criações foram observadas, assim como os grãos foram peneirados visando-se a manutenção da higiene no recipiente, a fim de se evitar a contaminação da criação por outras pragas que poderiam afetar negativamente o desenvolvimento do caruncho.



Figura 1. Recipientes de vidro contendo grãos da cultivar SEMPRE VERDE, para criação de *C. maculatus*.

Ensaio de tolerância ao caruncho em feijão-caupi

Ensaio em laboratório foram instalados para avaliação do nível de resposta dos acessos de feijão-caupi a infestação pelo caruncho. Para tal, utilizou-se a técnica de Delineamento Experimental Inteiramente Casualizado, com quatro repetições para cada um dos 27 acessos, além de um grupo controle. Durante o experimento duas variáveis foram observadas, número médio de ovos (postura) e número médio de insetos emergidos, sendo tais observações realizadas à temperatura ambiente média de 28,2 °C.

Segundo metodologia modificada a partir de Santos (1976), foram separadas amostras de 30 grãos de cada acesso, as quais foram acondicionadas separadamente em recipientes de vidro com aproximadamente 240 mL de volume, os quais foram cobertos com tecido *voil* de modo a permitir ampla troca gasosa. Em cada recipiente foram colocados 5 casais de caruncho com até 24h de idade, os quais 72h depois foram retirados. Seis dias após a retirada dos insetos realizou-se a contagem dos ovos viáveis.

O experimento passou a ser observado diariamente até o momento em que os insetos começavam a emergir, quando passaram a ser contados e retirados da amostra, sendo a contagem feita até o final da geração, o qual se tinha a expectativa que ocorresse até o vigésimo terceiro dia de experimento. O grupo controle, composto pela cultivar de feijão-caupi SEMPRE VERDE, mas sem adição do caruncho, foi mantido nas mesmas condições do experimento.

Análise estatística dos ensaios de tolerância ao caruncho em feijão-caupi

Segundo o método analítico descrito por Canteri et al. (2001), os dados para as variáveis número de ovos e número de insetos emergidos foram transformados para $\log.(x+1)$ e analisados, com a variância de tratamento testada pelo teste F, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Extração, limpeza e quantificação do DNA

O isolamento do DNA nuclear dos 27 acessos de feijão-caupi, bem como dos acessos de *V. unguiculata* ssp. *cylindrica* e de *V. radiata*, foi realizado utilizando-se folhas frescas ou congeladas em freezer à -80 °C, segundo a metodologia descrita por Weising et al. (2004), ao passo que a limpeza do DNA foi feita de acordo com o protocolo para precipitação de polissacarídeos descrito por Michaels et al. (1994).

A quantificação do DNA foi efetuada pelo método comparativo em gel de agarose a 1,2 %, utilizando-se diferentes concentrações de DNA Fago- λ como referencial. Após a quantificação, parte do DNA foi diluído para aproximadamente 5 ng/ μ L, para uso nas reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Amplificação do DNA

As reações de ISSR ocorreram conforme o protocolo descrito por Bornet & Branchard (2001), utilizando-se um total de 13 primers (Tabela 3), ao passo que as reações de DAF foram realizadas seguindo-se a metodologia de Benko-Iseppon et al. (2003), a partir de um total de 12 primers (Tabela 3). Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,2 %, corado com Brometo de Etídio. Após a eletroforese, os fragmentos amplificados (Termociclador TECHNE T-412) foram visualizados com auxílio de um aparelho transiluminador de luz ultravioleta (Biosystems TFX-35WL), e fotografados (Sony DSC-S2000) para posterior análise.

Análise estatística dos produtos de amplificação (ISSR e DAF)

O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado pela comparação com o marcador molecular Ladder 100 pb (Fermentas). A partir dos resultados de ISSR e DAF, foram realizadas comparações entre as amostras, com base na ausência ou presença de bandas de DNA no gel de agarose, o que gerou uma matriz de dados. A matriz obtida foi utilizada para a construção de um fenograma, a partir do método *Neighbor-Joining* (Agrupamento por Vizinhaça) (SAITOU & NEI, 1987), com bootstrap para 1000 replicações, sendo todas as análises realizadas com auxílio do programa estatístico MEGA, versão 5.0 (TAMURA et al., 2011).

Tabela 1. Acessos de *Vigna* analisados, incluindo informações disponíveis sobre o porte da planta, peso de 100 sementes (g), procedência, genealogia, tolerância, tempo para maturação e cor do grão.

Acessos	Porte da planta	Peso de 100 grãos (g)	Procedência	Genealogia	Tolerância	Tempo para maturação (dias)	Cor do grão
BRS-Marataoã	P.	19	-	Seridó X TVX1836-013J	CpSMV	67	S. V.
BRS-Milênio	P.	24	Tracuateua-PA	-	-	67	B.
BRS-Novaera	E.	20	-	TE97-404-1F X TE97-404-3F	Manchacaf é	-	-
BRS-Pajeú	P.	21	Juazeiro-CE	CNCX405-17F X TE94-268-3D	CpGMV	-	-
BRS-Paraguaçu	P.	17	-	BR10-Piaui X Aparecido Moita		67	B.
BRS-Potengi	E.	21	-	TE96-282-22G X TE93-210-13F	CpAMV	-	-
BRS-Xiquexique	P.	16,5	-	TE97-108-6G X TE97-93-8G	CpAMV	-	-
EVX-63-10E	E.	22	-	CNCX926-5F X Paulista	-	-	-
EVX91-2E-2	E.	18	-	EVX-63A X CNC-1735	CpAMV	-	-
Inhuma	P.	22	Inhuma-PI	-	-	62	M.
IPA 207	E.	25	-	Paulista X TE90-180-88F	Traça das crucíferas	-	-
Maravilha	-	-	-	-	-	-	-
MNC00-553D-8-1-2-3	E.	20	-	TE97-404-1F X TE97-404-3F	-	-	-
MNC99-508G-1	P.	17	-	-	-	-	-
MNC99-510G-8	P.	19	-	Paulista X TE90-180-88F	-	-	-

MNC99-519D-1-1-5	E.	17	-	CE-315 X EVX92-25E	-	-	-
MNC99-537F-4	E.	20	-	TE96-282-22G X IT87D-611-3	-	-	-
Patativa	P.	20	-	CNC1735 X (CNCX926 X Paulista)	CpSMV	62	S. V.
					Zabrotes		
Paulistinha	P.	23	Juazeiro-CE	-	subfasciatu	67	M.
					s		
Pingo-de-ouro-1-2	P.	23	Iguatu-CE	-	-	65	M.
Pingo-de-ouro-2	P.	22	Iguatu-CE	-	-	63	M.
Pretinho	E.	28	Pará	-	-	-	-
Rajado	-	-	-	-	-	-	-
S. V. Luis Eduardo	-	12	Luis Eduardo	-	-	80	-
Magalhães			Magalhães-BA				
Sopinha	-	-	-	-	-	-	-
TE97-304G-4	P.	19	CNCX405-17F	-	-	-	-
			X TE94-268-3D				
Vigna 384	-	18	-	-	-	85	-

P.=Prostrado, E.=Ereto, S. V.=Sempre Verde, M.=Mulato, B.=Branco.

5.3 Resultados e Discussão

Dentre os 27 acessos de feijão-caupi testados quanto à tolerância ao caruncho, apenas cinco (Tabela 2) haviam sido analisados em estudos anteriores, a exemplo de Carvalho et al. (2011) e Marsaro Jr. & Vilarinho (2011). Dessa forma, o presente estudo compreende o primeiro ensaio de tolerância ao caruncho para 22 dos acessos analisados.

Conforme a Tabela 2, as análises estatísticas revelaram significância para os tratamentos, e o teste de Tukey a 5% de probabilidade mostrou diferenças significativas entre as médias de oviposição e de insetos emergidos. As médias para cada característica, incluindo as médias gerais, são apresentadas nas Figuras 2, 3 e 4, respectivamente.

Considerando-se as médias resultantes da análise de número de ovos contados por amostra para cada acesso, observa-se que EVx63-10E, MNC99-510G-8, PATATIVA, MNC99-537F-4 e BRS-XIQUEXIQUE destacaram-se frente aos demais por serem os acessos menos ovipositados, os quais diferiram estatisticamente de INHUMA, o acesso mais procurado para oviposição.

Em relação aos acessos com comportamento intermediário (AB, Tabela 2), destacam-se algumas variedades lançadas pela pesquisa, assim como cultivares consideradas tradicionais (crioulas), a exemplo de BRS-PAJEÚ, BRS-MARATAOÃ, IPA 207, PRETINHO, SEMPRE VERDE LUIS EDUARDO MAGALHÃES e RAJADO (Tabela 2).

Segundo Lima et al. (2001), o número de ovos viáveis em grãos de feijão pode estar relacionado ao nível de reação do genótipo à praga. De acordo com essa suposição, os resultados obtidos para a cultivar INHUMA, apontam para uma maior probabilidade desse acesso ser mais suscetível à infestação pelo caruncho, em comparação aos acessos menos ovipositados. Esta variação entre genótipos quanto à preferência para oviposição, foi também verificada por Lima et al. (2001), os quais, ao avaliarem 30 acessos de feijão-caupi quanto à tolerância ao caruncho, encontraram diferenças significativas entre as médias de oviposição. De acordo com o tipo de teste utilizado pelos autores, seis acessos foram considerados os mais ovipositados, enquanto que apenas dois deles (IT89KD-245 e CNCx955-1F) foram caracterizados como tolerantes, por não preferência para oviposição.

Similarmente, para a segunda a variável (número médio de insetos emergidos) pode-se verificar diferença estatística entre as médias obtidas para cada acesso (Tabela 2). Para essa

variável, os acessos PATATIVA e MNC99-537F-4 destacaram-se por apresentarem as menores médias de insetos emergidos, diferindo estatisticamente de INHUMA, acesso que novamente apresentou a maior média (Tabela 2), evidenciando a existência de uma relação direta entre o número médio de ovos e o número médio de insetos emergidos para esta cultivar, fato também observado por Barreto & Quinderé (2000). Portanto, INHUMA pode ser classificado como suscetível a infestação pelo caruncho, por ser o acesso preferido pelo inseto tanto para oviposição quanto para emergência (Tabela 2, Figuras 2, 3 e 4).

Tabela 2. Médias do número de ovos e do número de insetos emergidos, comparadas pelo teste de Tukey (5%), de 27 acessos de feijão-caupi, submetidos a infestação pelo caruncho.

Acessos	<u>Número de ovos</u>		<u>Número de insetos</u>		Média Geral	<u>Níveis de resposta</u>	
	Média	Tukey 5%	Média	Tukey 5%		Obtidos	Prévios
PATATIVA	39,25	B	23,25	B	31,250	T	T
MNC99-537F-4	30,50	B	16,25	B	23,375	T	ND
BRS-XIQUEXIQUE	26,00	B	24,75	AB	25,375	MT	ND
EVx63-10E	44,25	B	26,00	AB	35,125	MT	ND
MNC99-510G-8	43,25	B	38,00	AB	40,625	MT	ND
BRS-PARAGUAÇU	55,00	AB	28,00	AB	41,500	MS	MS
BRS-MILÊNIO	66,75	AB	37,00	AB	51,875	MS	MS
BRS-POTENGI	79,00	AB	30,25	AB	54,625	MS	ND
BRS-NOVAERA	82,75	AB	42,75	AB	62,750	MS	MS
PRETINHO	83,75	AB	28,25	AB	56,000	MS	ND
MNC00-553D-8-1-2-3	84,75	AB	25,50	AB	55,125	MS	ND
EVx91-2E-2	92,50	AB	37,25	AB	64,875	MS	ND
VIGNA 384	98,75	AB	59,50	AB	79,125	MS	ND
TE97-304G-4	99,00	AB	68,00	AB	83,500	MS	ND
PAULISTINHA	100,50	AB	68,00	AB	84,250	MS	ND
BRS-MARATAOÃ	104,75	AB	55,50	AB	80,125	MS	MS
PINGO-DE-OURO-1-2	107,25	AB	80,00	AB	93,625	MS	ND

SOPINHA	109,75	AB	44,75	AB	77,250	MS	ND
MNC99-519D-1-1-5	110,75	AB	41,75	AB	76,250	MS	ND
RAJADO	117,25	AB	30,00	AB	73,625	MS	ND
MNC99-508G-1	126,50	AB	70,25	AB	98,375	MS	ND
PINGO-DE-OURO-2	134,50	AB	94,75	AB	114,625	MS	ND
IPA 207	137,50	AB	51,25	AB	94,375	MS	ND
S. V. LUIS EDUARDO MAGALHÃES	150,25	AB	68,00	AB	109,125	MS	ND
MARAVILHA	152,50	AB	60,25	AB	106,375	MS	ND
BRS-PAJEÚ	153,75	AB	101,50	AB	127,625	MS	ND
INHUMA	227,25	A	127,50	A	177,375	S	ND

Genótipos representados pela mesma letra ou sequência de letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
T=Tolerante, MT=Moderadamente Tolerante, S=Suscetível, MS=Moderadamente Suscetível, ND=Informação Não Disponível (sem análises prévias).

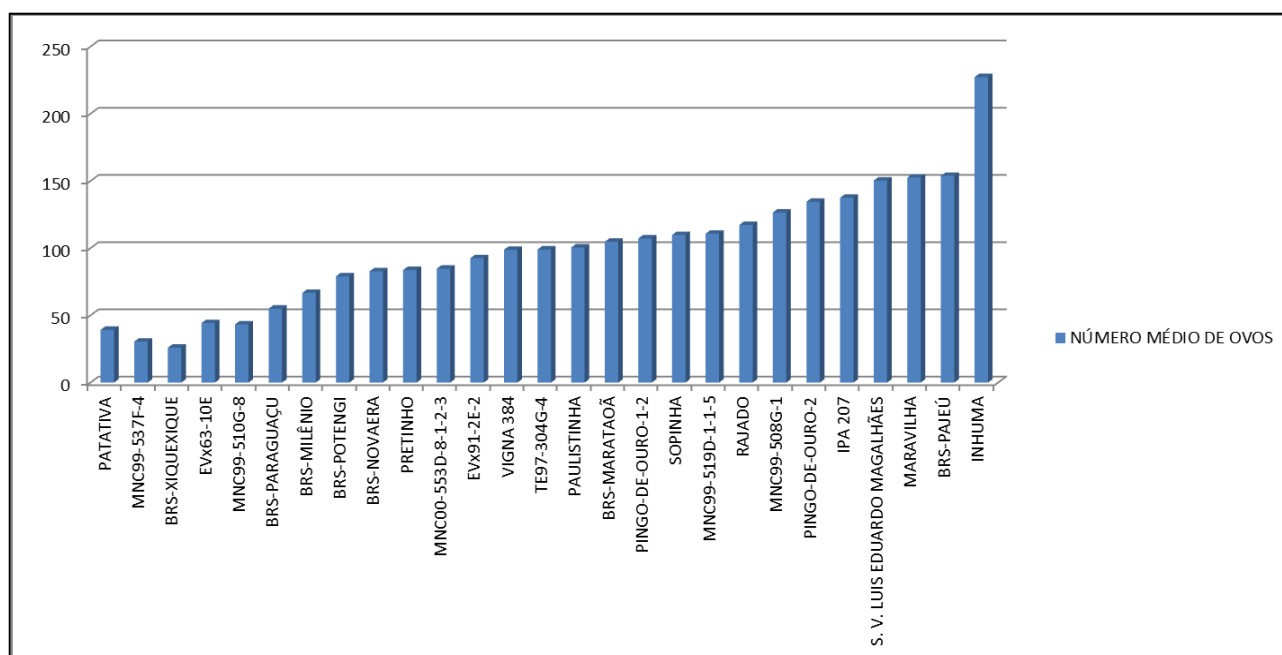


Figura 2. Representação gráfica do número médio de ovos, obtido no presente estudo, para os 27 acessos de feijão-caupi analisados.

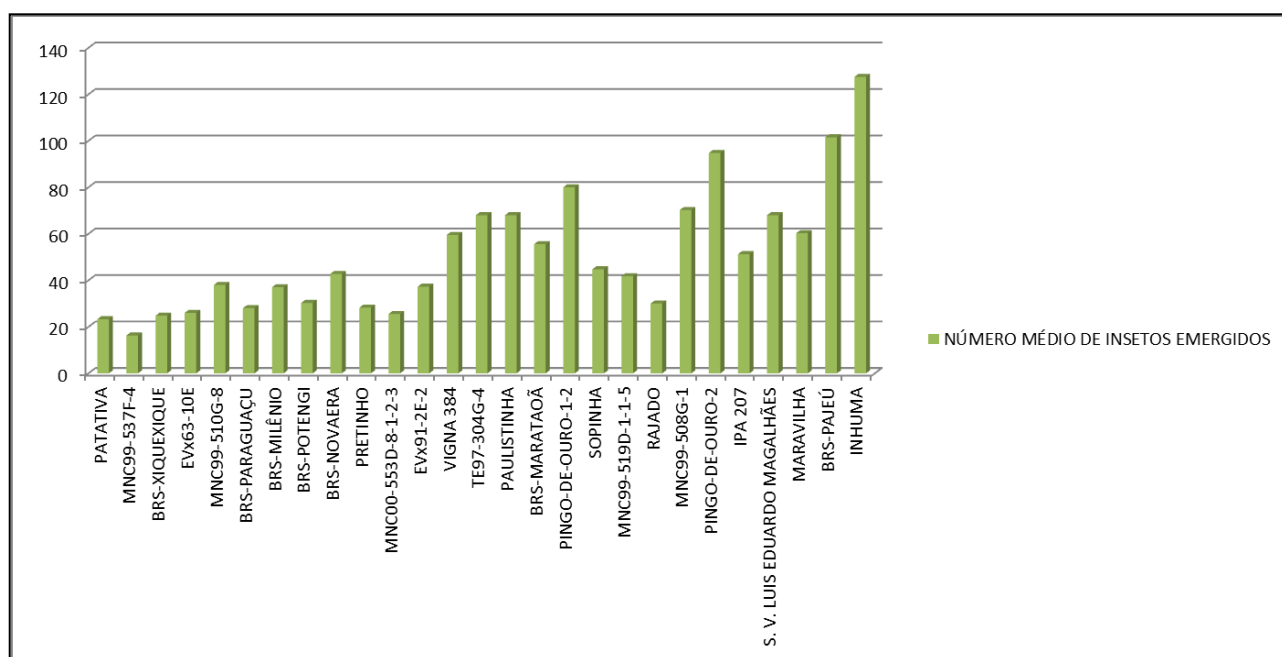


Figura 3. Representação gráfica do número médio de insetos emergidos, obtido no presente estudo, para os 27 acessos de feijão-caupi analisados.

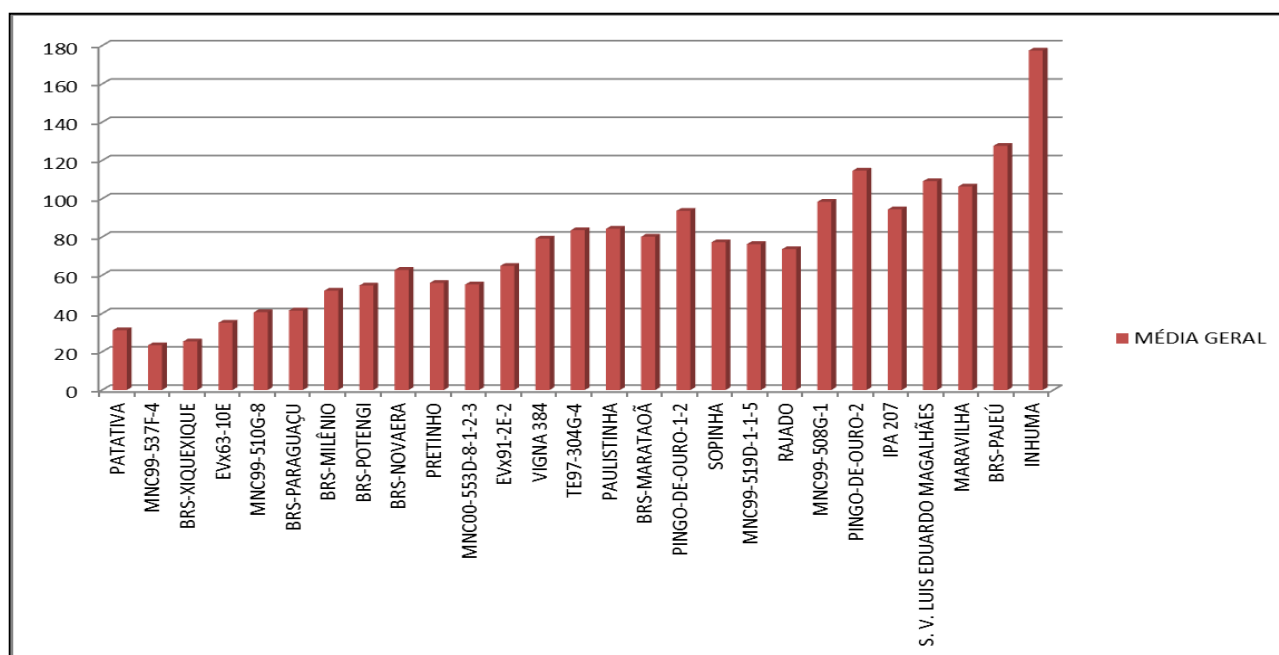


Figura 4. Representação gráfica da média geral para ambas as características analisadas (número médio de ovos e número médio de insetos emergidos), obtida no presente estudo, para os 27 acessos de feijão-caupi avaliados.

Observou-se, contudo, que alguns acessos que anteriormente exibiram menor média de oviposição em comparação aos demais, ao serem analisados quanto ao número médio de insetos emergidos, haviam apresentado maior eclosão dos insetos, exibindo menor tolerância ao caruncho, a exemplo de EVx63-10E, MNC99-510G-8 e BRS-XIQUEXIQUE, os quais foram classificados como moderadamente tolerantes (Tabela 2, Figuras 2, 3 e 4). Segundo Lara (1997), nem sempre os acessos mais ovipositados serão considerados suscetíveis, pois, poderão existir outros fatores que impeçam o desenvolvimento larval do inseto, da mesma forma que não é obrigatório que os acessos menos ovipositados sejam tolerantes, fato observado no presente estudo.

É interessante notar, que para alguns acessos (BRS-MARATAOÃ, BRS-NOVAERA, BRS-MILÊNIO, BRS-PARAGUAÇU e PATATIVA), os resultados obtidos neste estudo foram equivalentes aos apresentados em trabalhos prévios (CARVALHO et al., 2011; MARSARO JR. & VILARINHO, 2011), evidenciando a eficácia do método analítico empregado no presente trabalho.

Dentre os acessos analisados, PATATIVA e MNC99-537F-4 podem ser considerados tolerantes a infestação pelo caruncho, por apresentarem menor média de oviposição e menor média de insetos emergidos em comparação aos demais acessos (grupo B para as duas variáveis, Tabela 2). É interessante ressaltar que tais acessos, além de apresentarem o mesmo nível de resposta ao

ataque pelo caruncho, exibem também o mesmo porte, sendo ambos eretos (Tabela 1). Adicionalmente, acessos que têm a mesma procedência, a exemplo de BRS-PAJEÚ, BRS-NOVAERA e TE97-304G-4, assim como MNC00-553D-8-1-2-3 e PAULISTINHA (Tabela 1), apresentaram o mesmo nível de resposta ao caruncho (Tabela 2), indicando que nesses acessos o genótipo está diretamente correlacionado com a resposta ao ataque pelo caruncho, o que justifica a importância da análise dos acessos com marcadores moleculares (SIMON et al., 2007).

Na avaliação dos DNAs nucleares dos acessos, a partir dos 25 primers utilizados (12 DAF e 13 ISSR), 239 fragmentos de DNA foram amplificados, destes, 163 foram considerados polimórficos (Tabela 3). Essa quantidade de primers revelou ser suficiente para analisar os acessos quanto a diferenças ou similaridades ao nível molecular. Da mesma forma, Dwivedi et al. (2001) foram capazes de avaliar a diversidade genética entre 26 acessos de amendoim, utilizando apenas oito primers. A porcentagem de polimorfismo total para cada primer variou de 12,5% a 100% (Tabela 3), revelando uma média de 6,5 bandas polimórficas por primer (incluindo polimorfismos interespecíficos e intraespecíficos). Essa média mostrou-se superior à obtida por Xavier et al. (2005), os quais estudaram 28 acessos da feijão-caupi utilizando 20 primers RAPD, obtendo contudo, somente 3,7 bandas polimórficas por primer.

A partir da observação das porcentagens de polimorfismo interespecífico e intraespecífico, exibidas para cada primer utilizado, pode-se afirmar que ISSR 880 apresentou maior porcentagem de polimorfismo interespecífico (70,0%), em comparação aos demais, assim como DAF A14, que destacou-se perante os outros por apresentar maior porcentagem de polimorfismo intraespecífico (67,0%) (Tabela 3). Nesse sentido, ISSR 880 pode ser empregado em estudos que visem analisar a diversidade genética entre acessos de diferentes espécies, a exemplo de Silva et al. (2011), os quais avaliaram a diversidade genética entre acessos do gênero *Manihot*, por meio de marcadores ISSR. Da mesma maneira, DAF A14 pode ser utilizado em análises que busquem a identificação de polimorfismos entre acessos de uma mesma espécie, a exemplo de Amorim et al. (2006), os quais utilizaram primers DAF para seleção de parentais entre acessos de feijão-caupi.

A partir das semelhanças genéticas reveladas pelos marcadores moleculares utilizados, os 29 acessos estudados, incluindo genótipos de *V. unguiculata* ssp. *cylindrica* e *V. radiata*, foram agrupados em um fenograma (Figura 3). Como esperado, acessos pertencentes à subespécie *V. unguiculata* ssp. *cylindrica* e a espécie *V. radiata*, formaram ramos individualizados na base do fenograma, refletindo sua maior distância evolutiva e molecular. Dessa forma, o emprego de 25 primers gerando 163 fragmentos polimórficos, foi suficiente para análise dos acessos, visto que,

segundo Collombo et al. (1998), um número de sete a 30 primers, gerando um total de 50 a 200 amplicons polimórficos, conseguem estimar relações genéticas dentro e entre espécies.

Com relação aos acessos de feijão-caupi, observou-se a formação de dois grupos (A e B) (Figura 3). Destes, o grupo B, compreendeu apenas três acessos (BRS-NOVAERA, BRS-MILÊNIO e MNC00-553D-8-1-2-3), os quais apresentaram alta similaridade entre si. Dentre os acessos pertencentes a esse grupo, BRS-NOVAERA e MNC00-553D-8-1-2-3 compartilham a mesma genealogia, resultante do cruzamento entre TE97-404-1F e TE97-404-3F (Tabela 1). Os três acessos que compõem o grupo B, compreendem indivíduos que exibem o mesmo nível de resposta a infestação pelo caruncho, sendo considerados moderadamente suscetíveis (Tabela 2), nesse sentido, a existência de alguma correlação genética entre os genótipos dos acessos e o nível de resposta ao caruncho, torna-se evidente neste grupo. Vale salientar, que resultados semelhantes foram obtidos por Lamego et al. (2006), os quais avaliaram a similaridade genética entre acessos de picão-preto tolerantes e suscetíveis a herbicidas, tendo verificado que os acessos tolerantes permaneceram em um mesmo grupo no dendrograma.

Ao contrário do grupo B, o grupo A incluiu 24 acessos, divididos em quatro subgrupos, sendo interessante notar que o maior deles, o subgrupo 3 (Figura 3), compreendeu em sua maioria acessos moderadamente suscetíveis, similarmente ao grupo B, entretanto, o subgrupo 3 incluiu ainda acessos com níveis distintos de resposta ao caruncho, a exemplo de PATATIVA e EVx63-10E (Figura 3), tolerante e moderadamente tolerante a infestação pelo caruncho, respectivamente (Tabela 2). Adicionalmente, este subgrupo contém ainda acessos que compartilham a mesma procedência, a exemplo de BRS-PAJEÚ e PAULISTINHA (Tabela 1; Figura 3).

Contudo, os subgrupos menores (1, 2 e 4) (Figura 3), compreenderam uma maior diversidade de materiais, considerando sua resposta ao caruncho (suscetíveis, moderadamente suscetíveis, moderadamente tolerantes e tolerantes), evidenciando que mesmo sendo geneticamente semelhantes, esses acessos apresentaram níveis variados de resposta ao ataque do caruncho. Estes resultados são suportados por Lara (1991), que ressalta que a tolerância é relativa, visto que a expressão genética pode variar de acordo com a situação, de forma que uma planta pode manifestar sua tolerância à determinada espécie de inseto em certas condições e manter ou não esse caráter em outras condições.

Tabela 3. Primers utilizados nas reações de DAF e ISSR, com suas respectivas sequências de bases, número de fragmentos totais e polimórficos, porcentagem de polimorfismo total, interespecífico e intraespecífico.

Código	Tipo	Primers	Nº de Frag- mentos	Polimorfismos			
		Sequência de bases 5'– 3'		Nº	% Total	% Inter- sp.	% Intra- sp.
J20	DAF	AAGCGGCCTC	16	13	81,2	68,7	12,5
N05	DAF	ACTGAACGCC	11	10	90,9	63,3	27,6
F07	DAF	CCGATATCCC	14	10	71,4	42,8	28,6
F11	DAF	TTGGTACCCC	9	9	100,0	67,0	33,0
F16	DAF	GGAGTACTGG	8	7	87,5	37,5	50,0
A14	DAF	TCTGTGCTGG	6	6	100,0	33,0	67,0
G13	DAF	CTCTCCGCCA	11	6	54,5	36,3	18,2
Q15	DAF	GGGTAACGTG	10	6	60,0	40,0	20,0
H16	DAF	TCTCAGGTGG	5	4	80,0	40,0	40,0
G20	DAF	TCTCCCTCAG	5	3	60,0	40,0	20,0
H06	DAF	ACGCATCGCA	6	3	50,0	33,3	16,7
H17	DAF	CACTCTCCTC	7	3	42,8	28,5	14,3
879	ISSR	CTTCACTTCACTTCA	10	10	100,0	60,0	40,0
880	ISSR	GGAGAGGAGAGGAGA	10	9	90,0	70,0	20,0
823	ISSR	TCTCTCTCTCTCTCTCC	13	9	69,2	46,1	23,1
857	ISSR	ACACACACACACACACYG	17	8	47,0	35,3	11,7
860	ISSR	TGTGTGTGTGTGTGTGRA	6	6	100,0	50,0	50,0
840	ISSR	GAGAGAGAGAGAGAGACTT	12	6	50,0	41,7	8,3
856	ISSR	ACACACACACACACACYT	10	6	60,0	40,0	20,0
822	ISSR	TCTCTCTCTCTCTCTCA	8	6	75,0	50,0	25,0
864	ISSR	ATGATGATGATGATGATG	9	6	66,6	55,5	11,1
809	ISSR	AGAGAGAGAGAGAGAGG	12	6	50,0	33,3	16,7
825	ISSR	ACACACACACACACACT	9	5	55,5	33,3	22,2
868	ISSR	GAAGAAGAAGAAGAAGAA	7	5	71,4	57,1	14,3
866	ISSR	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	8	1	12,5	12,5	0
Total/Média			Σ 239	Σ 163	69,0	45,0	24,0

Apesar de alguns acessos analisados apresentarem características fenotípicas marcantes, expressas em portes distintos por exemplo, verificou-se a existência de semelhança significativa a nível molecular entre os mesmos, capaz de manter os acessos no mesmo subgrupo do fenograma, a exemplo de PRETINHO (ereto) e BRS-PARAGUAÇU (prostrado), que mesmo apresentando diferentes tipos de porte (Tabela 1), permaneceram no subgrupo 1 (Figura 3). Nesse sentido, o mais provável é que a existência de similaridade entre os acessos resulte do processo de domesticação e melhoramento, o que contribuiu para o estreitamento genético pronunciado pela fixação de características de fácil detecção (VAILLANCOURT et al., 1993).

Entretanto, mesmo havendo um nível considerável de similaridade genética entre os acessos estudados, aqueles contrastantes quanto a resposta ao caruncho, a exemplo de INHUMA (S), MNC99-537F-4 (T) e PATATIVA (T) (Tabela 2), distribuíram-se em subgrupos distintos da árvore (Figura 3), o que evidencia divergência genética entre os mesmos, a qual pode ser considerada significativa ao ponto de diferenciá-los além do fenótipo, foco da pesquisa, caracterizando esses acessos como promissores para uso em programas de melhoramento, assim como para mapeamento genético.

Nesse sentido, é possível afirmar que os ensaios de tolerância ao caruncho realizados, foram eficientes em inferir sobre o nível de resposta dos acessos de feijão-caupi a infestação pelo inseto, visto que diferentes níveis de resposta foram verificados. Da mesma forma, os marcadores moleculares DAF e ISSR mostraram-se significativamente informativos para analisar a diversidade genética dos acessos, tanto à nível interespecífico como intraespecífico. Adicionalmente, devido à eficiência das técnicas empregadas, foi possível correlacionar os níveis de resposta obtidos a cada genótipo satisfatoriamente, sendo possível selecionar acessos de feijão-caupi contrastantes, os quais apresentam também diferenças a nível molecular, o que os caracteriza como potencialmente úteis para a geração de populações segregantes adequadas ao mapeamento, sendo também promissores para uso em trabalhos de melhoramento da cultura.

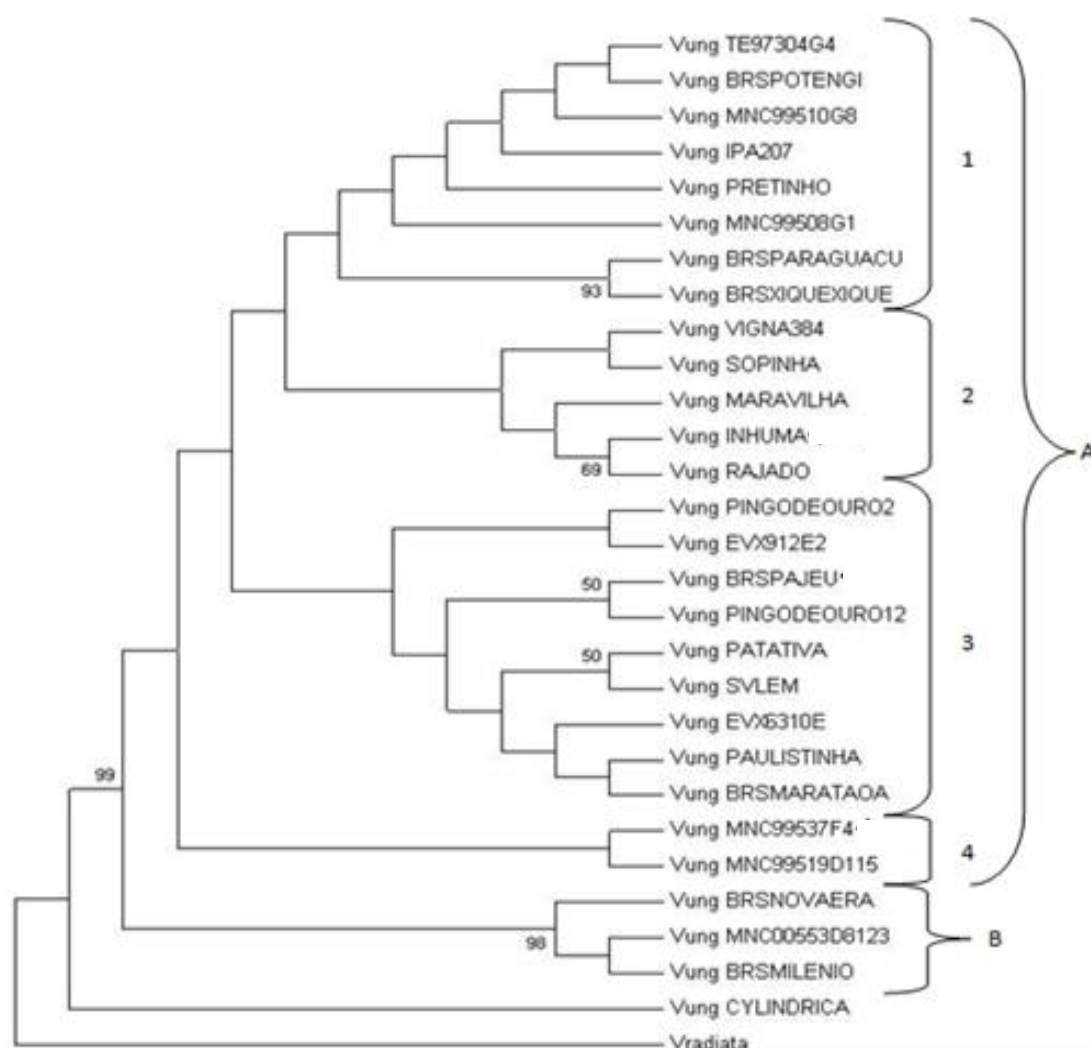


Figura 5. Fenograma construído a partir do método *Neighbor-Joining* (bootstrap 1.000 replicações), indicando a similaridade genética, baseada em DAF e ISSR, entre os 29 acessos estudados.

5.4 Referências Bibliográficas

- ALCANTARA, J. P.; MONTEIRO, I. D.; VASCONCELOS, O. L.; FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q. BRS Paraguaçu, novo cultivar de porte enramador e tegumento branco para o estado da Bahia. **Revista Ceres**. v. 49. p695-703, 2002.
- AMORIM, L. L. B.; ONOFRE, A. V. C.; CARVALHO, R.; BENKO-ISEPPON, A. M. **Identificação de parentais contrastantes para mapeamento genético no feijão-caupi usando marcador molecular DAF (DNA Amplification fingerprinting)**. Congresso Nacional de feijão-caupi, Teresina-PI, 2006. Anais. Disponível em: <http://200.137.176.133/congressos/conac2006/anaisconac2006/resumos/GM19.pdf>. Acesso em 18 de dezembro de 2011.

- BARRETO, P. D.; QUINDERE, M. W. Resistência de genótipos de caupi ao caruncho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 4, p. 455-462, abr. 2000.
- BENKO-ISEPPON, A. M.; WINTER, P.; HUETTEL B.; STAGINNUS, C.; MUEHLBAUER, F. J.; KAHL, G. 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**, v. 107, p. 379-386, 2003.
- BENKO-ISEPPON, A. M.; SOARES-CAVALCANTI, N. M.; WANDERLEY-NOGUEIRA, A. C.; BERLARMINO, L. C.; SILVA, R. R. M.; ALMEIDA, P. M. L.; BRUNELLI, K. R.; KIDO, L. M. H.; KIDO, E. A. Genes associados a estresses bióticos e abióticos em feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e outras angiospermas. In: NOGUEIRA, R. J. M. C.; ARAÚJO, E. L.; WILLADINO, L. G.; CAVALCANTE, U. M. T. (Eds.). **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife: Imprensa da Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. p.350-359.
- BORGES, L. F.; VILA NOVA, M. X. Associação de inseticidas químicos e fungos entomopatogênicos no Manejo Integrado de Pragas – uma revisão. **Ambiência**, v. 7, n. 1, p. 179-190, 2011. Guarapuava (PR). Disponível em: <http://200.201.10.37/editora/revistas/ambiencia/v7n1/179-190.pdf>. Acesso em: 20 de março de 2012.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.209-215, 2001.
- CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAM, B. J.; GRESSHOFF, P. M. DNA amplification fingerprinting using short arbitrary oligonucleotide primers. **Bio-Technology**, n.9, p.553-557, 1991.
- CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, V.1, N.2, p.18-24. 2001.
- CARVALHO, R. O.; LIMA, A. C. S.; ALVES, J. M. A. **Resistência de genótipos de feijão-caupi ao *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera: Bruchidae)**. Revista Agro@mbiente, On-line, v. 5, n. 1, p. 50-56, jan-abril, 2011. Centro de Ciências Agrárias - Universidade

Federal de Roraima, Boa Vista, RR. Disponível em [http:// www.agroambiente.ufrr.br](http://www.agroambiente.ufrr.br). Acesso em 01 de Novembro de 2011.

- COLOMBO, C.; SECOND, G.; VALLE, T. L.; CHARRIER, A. Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz) with RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21, n. 1, p. 105-113, 1998.
- DWIVEDI, S. L.; GURTU, S.; CHANDRA, S.; YUEJIN, W.; NIGAM, S. N. Assessment of genetic diversity among selected groundnut germplasm: 1- RAPD analysis. **Plant Breeding**, v.120, p.345-359, 2001.
- FREIRE FILHO, F. R.; CRAVO, M. S.; VILARINHO, A. A.; CAVALCANTE, E. S.; FERNANDES, J. F.; SAGRILO, E.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. M.; SOUZA, F. F.; LOPES, A. M.; GONÇALVES, J. R. P.; CARVALHO, H. W. L.; RAPOSO, J. A. A.; SAMPAIO, L. S. **BRS Novaera: Cultivar de feijão-caupi de porte semi-ereto**. 2008. Disponível em: http://www.cpatu.embrapa.br/publicacoes_online. Acesso em 19 de Janeiro de 2012.
- FREIRE FILHO, F. R.; RAPOSO, J. A. A.; COSTA, A. F.; ROCHA, M. M.; RIBEIRO, V. Q.; SILVA, K. J. D.; CARVALHO, H. W. L.; CRAVO, M. S.; LOPES, A. M.; VILARINHO, A. A.; CAVALCANTE, E. S.; FERNANDES, J. B.; LIMA, J. M. P.; SAGRILO, E.; SITTOLIN, I. M.; SOUZA, F. F.; JUNIOR, J. R. V.; GONÇALVES, J. R. P. **BRS Pajeú: Cultivar de feijão-caupi com grão mulato claro**. 2009. Disponível em: http://www.cpatu.embrapa.br/publicacoes_online. Acesso em 19 de Janeiro de 2012.(a).
- FREIRE FILHO, F. R.; RAPOSO, J. A. A.; COSTA, A. F.; ROCHA, M. M.; RIBEIRO, V. Q.; SILVA, K. J. D.; CARVALHO, H. W. L.; CRAVO, M. S.; LOPES, A. M.; VILARINHO, A. A.; CAVALCANTE, E. S.; FERNANDES, J. B.; LIMA, J. M. P.; SAGRILO, E.; SITTOLIN, I. M.; SOUZA, F. F.; JUNIOR, J. R. V.; GONÇALVES, J. R. P. **BRS Potengi: Nova cultivar de feijão-caupi de grão branco**. 2009. Disponível em: http://www.cpatu.embrapa.br/publicacoes_online. Acesso em 19 de Janeiro de 2012.(b).
- FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ALCÂNTARA, J. P.; BELARMINO FILHO, J.; ROCHA, M. M. BRS Marataoã: nova cultivar de feijão-caupi com grão tipo sempre-verde. **Revista Ceres**, v.52, p.771-777, 2006.

- FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, C. A. F. Melhoramento genético do Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. na Região do Nordeste. In: QUEIROZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 1999. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br/>. Acesso em: 18 jul. 2011.
- LAMEGO, F. P.; RESENDE, L. V.; SILVA, P. R.; VIDAL, R. A.; NUNES, A. L. Distância genética e geográfica entre acessos de picão-preto suscetíveis e resistentes a herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 6, p. 963-968, 2006.
- LARA, F. M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. São Paulo: Ícone. 1991. 336 p.
- LARA, F. M. Resistance of wild and near isogenic bean lines with arcelin variants to *Zabrotes subfasciatus* (Boheman). I- winter crop. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, p. 551-559, 1997.
- LIMA, M. P. L.; OLIVEIRA, J. V.; BARROS, R.; TORRES, J. B. Identificação de genótipos de caupi *Vigna unguiculata* (L.) Walp. resistentes a *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera: Bruchidae). **Neotropical Entomology**, v.30, n.2, p. 289-295, 2001.
- LIMA, M. P. L.; OLIVEIRA, J. V.; BARROS, R.; TORRES, J. B.; GONÇALVES, M. E. C. Estabilidade da resistência de genótipos de caupi a *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) em gerações sucessivas. **Scientia Agricola**, v.59, p. 275-280, 2002.
- MARANGONI, S. Copaíba contra o caruncho. **Revista Pesquisa FAPESP**, v.71, p.10-12, 2002.
- MARSARO JUNIOR, A. L.; VILARINHO, A. A. Resistência de cultivares de feijão-caupi ao ataque de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchidae) em condições de armazenamento. **Revista Acadêmica, Ciências Agrárias Ambientais**, v. 9, n. 1, p. 51-55, jan./mar. 2011.
- MARTINAZZO, A. P.; FARONI, L. R. D. A.; BERBERT, P. A.; REIS, F. P. Utilização da fosfina em combinação com o dióxido de carbono no controle do *Rhyzopertha dominica* (f.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.6, p.1063-1069, 2000.
- MICHAELS, S. D.; JOHN, M. C.; AMASINO, R. M. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. **Biotechniques**, v.17, p. 274-276, 1994.

- SANTOS, J. H. R. **Aspectos da resistência de cultivares de *Vigna sinensis* (L.) Savi ao ataque do *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Col., Bruchidae), mantidos no Estado do Ceará** - Brasil. 1975. 194p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1976.
- SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.
- SILVA, K. V. P. et al . Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 9, Sept. 2011 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X20110009_00016&lng=en&nrm=iso>. Access on 26 Jan. 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011000900016>.
- SIMON, M. V.; BENKO-ISEPPON, A. M.; RESENDE, L. V.; WINTER, P.; KAHL, G. Genetic diversity and phylogenetic relationships in *Vigna* Savi germplasm revealed by DNA amplification fingerprinting (DAF). **Genome**, v.50, p.538-547, 2007.
- SINGH, B. B.; EHLERS, J. D.; SHARMA, B.; FREIRE FILHO, F. R. Recent progress in cowpea breeding. In: FATOKUN, C.A. et al. (Ed.). **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production**. Ibadan: IITA, 2002. p.22-40.
- SOUSA, A. H. MARACAJÁ, P. B.; SILVA, R. M. A.; MOURA, M. N.; ANDRADE, W. G. Bioactivity of vegetal powders against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) in caupi bean and seed physiological analysis. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.5, n.2, 2005. Disponível em: <http://eduep.uepb.edu.br/rbct/sumarios/pdf/bioactivity.pdf>. Acesso em: 23 jul. 2011.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>. Acesso em: 21 de março de 2012.
- VAILLANCOURT, R. E.; WEEDEN, N. F.; BARNARD, J. Isozyme diversity in the cowpea species complex. **Crop Science**, v.33, p.606- 613, 1993.

- VILARINHO, A. A.; FREIRE FILHO, F. R.; ROCHA, M. M.; RIBEIRO, V. Q. **BRS Xiquexique: Cultivar de feijão-caupi rica em ferro e zinco para cultivo em Roraima**. 2008. Disponível em: http://www.cpatu.embrapa.br/publicacoes_online. Acesso em 19 de Janeiro de 2012.
- WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; KAHL, G. **DNA fingerprinting in plants**. Boca Raton, USA: CRC Press, 2004.322 p.
- WOLFE, A. D.; RANDLE, C. P.; LIU, L.; STEINER, K. E. Phylogeny and biogeography of Orobanchaceae. **Folia Geobotannica**, v. 40, p. 115-134, 2005.
- XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RUMJANEK, N; G.; FREIRE FILHO, F. R. Variabilidade genética em acessos de caupi baseada em marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 353 - 359, 2005.

6. Conclusões

- . Com base nos resultados obtidos, é possível inferir que os ensaios de tolerância ao caruncho *C. maculatus*, aplicado para 27 acessos de feijão-caupi, em conjunto com a análise estatística das médias reveladas, foram capazes de diferenciar os acessos quanto ao nível de resposta a essa praga.
- . Os acessos PATATIVA e MNC99-537F-4 foram considerados os acessos tolerantes em comparação aos demais, enquanto INHUMA foi identificado como o acesso suscetível a *C. maculatus*.
- . As análises por marcadores moleculares DAF e ISSR, seguidas pela geração de um fenograma a partir do método *Neighbor-Joining*, foram capazes de identificar diferenças, também a nível molecular, entre alguns acessos de feijão-caupi contrastantes quanto à tolerância ao caruncho, os quais se distribuíram em subgrupos distintos no fenograma.
- . Os resultados obtidos evidenciam o sucesso das metodologias aplicadas, bem como revelam acessos potencialmente importantes, os quais podem ser empregados em estudos moleculares, incluindo mapeamentos genéticos, ou inseridos em programas de melhoramento genético vegetal, visando à obtenção de genótipos cada vez mais tolerantes ao caruncho.

7. Anexos

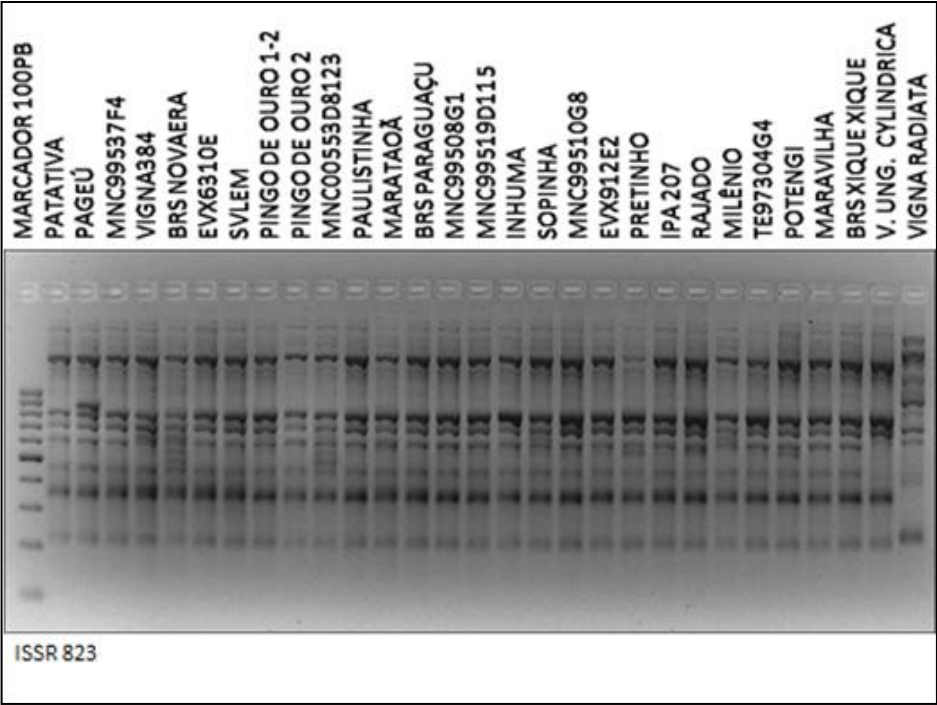


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose, revelando os fragmentos amplificados pelo primer ISSR 823 em 29 acessos do gênero *Vigna*.

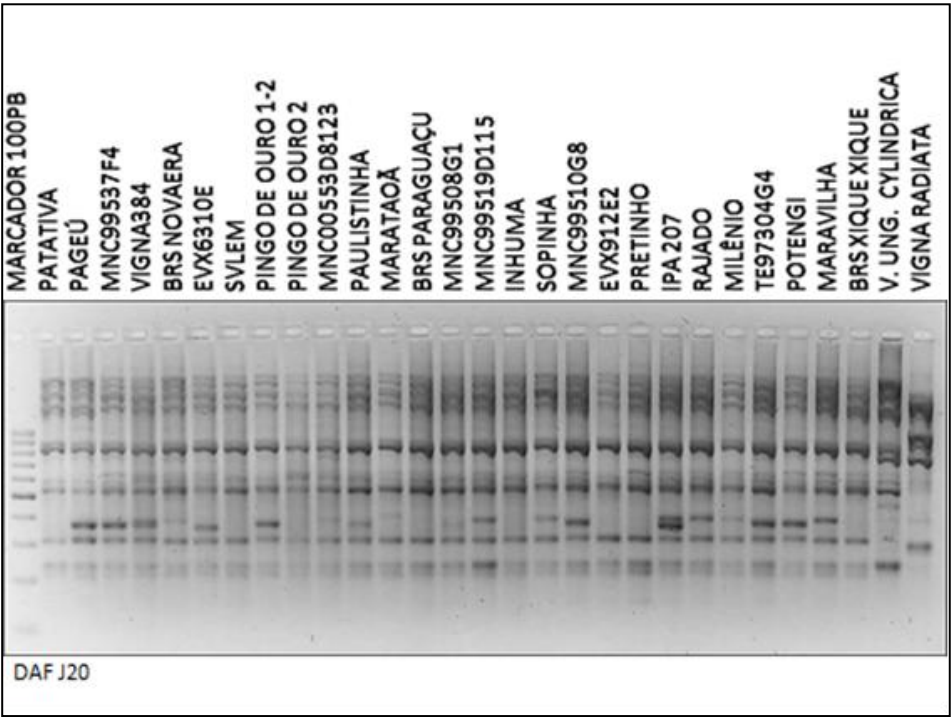


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose, revelando os fragmentos amplificados pelo primer DAF J20 em 29 acessos do gênero *Vigna*.

Instructions for Authors

Genetic Resources and Crop Evolution

Springer Verlag/Ingenta Connect (Berlin/Heidelberg)

Impact Factor: 1, 54

An International Journal

Editor-in-Chief: Karl Hammer

Editor: K. Pistrick

ISSN: 0925-9864 (print version).

ISSN: 1573-5109 (electronic version).

Journal no. 10722

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s);
- A concise and informative title;
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s);
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author.

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

[Word template \(zip, 154 kB\)](#)

- Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

[LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

Please always use internationally accepted signs and symbols for units, SI units.

SCIENTIFIC STYLE

Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.

SCIENTIFIC STYLE

Genus and species names should be in italics.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990);

- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996);
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1993).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- Journal article
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8
- Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:
- Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329
- Article by DOI
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
- Book
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- Book chapter
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- Online document
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

- Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php
- For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

[EndNote style \(zip, 3 kB\)](#)

TABLES

- All tables are to be numbered using Arabic numerals;
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order;
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table;
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption;
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

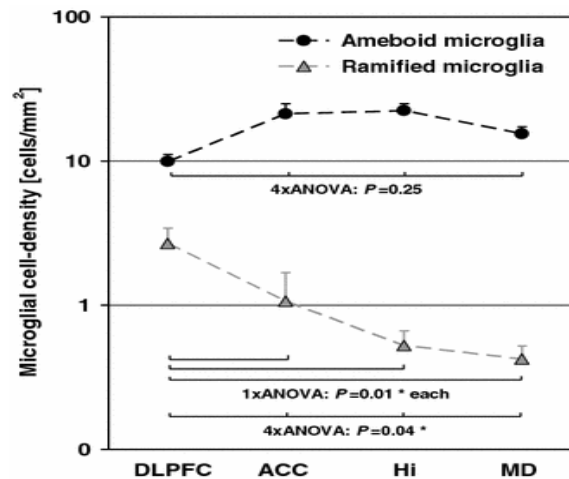
ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

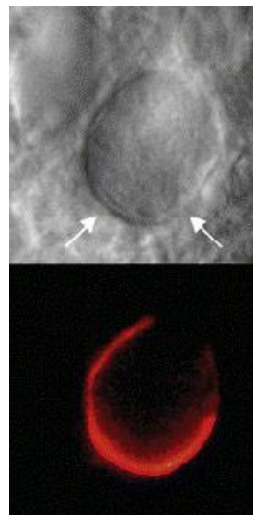
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



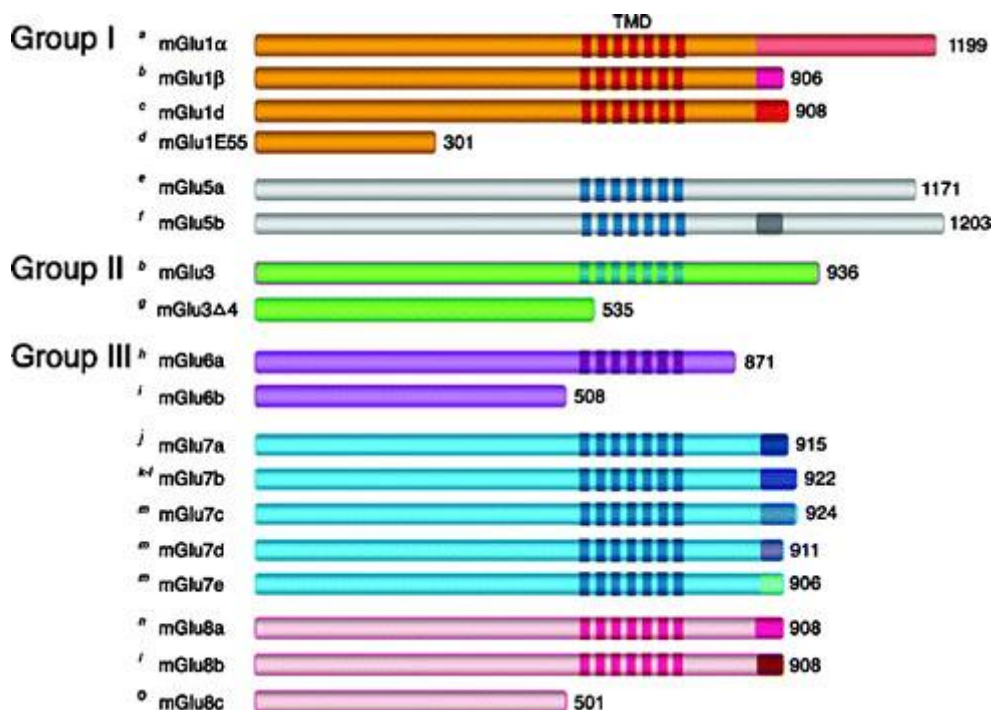
- Definition: Black and white graphic with no shading;
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size;
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide;
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi;
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art:



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc;
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves;
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art:



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc;
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication;
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent;
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions;
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts);
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt);
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label;

- Avoid effects such as shading, outline letters, etc;
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals;
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order;
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.);
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file;
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type;
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption;
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs;
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width;
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm;
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund

any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware);
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements);
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1.

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats;
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author;
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability;
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended;

- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables;
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”;
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file;
- Processing of supplementary files;
- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material;
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk).

DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native

speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in:

Medicine, biomedical and life sciences, chemistry, physics, engineering, business/economics, and humanities

Edanz Editing Global

- Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.
- Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

For Authors from China

- 文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用Springer推荐的编辑服务，使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容，通过对学术内容的判断来决定文章的取舍，而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系Springer推荐的编辑服务公司，协商编辑事宜。

理文编辑

For Authors from Japan

- ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、Edanz社をご紹介します。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンググループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

エダンググループ ジャパン

For Authors from Korea

Edanz Editing Global

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.