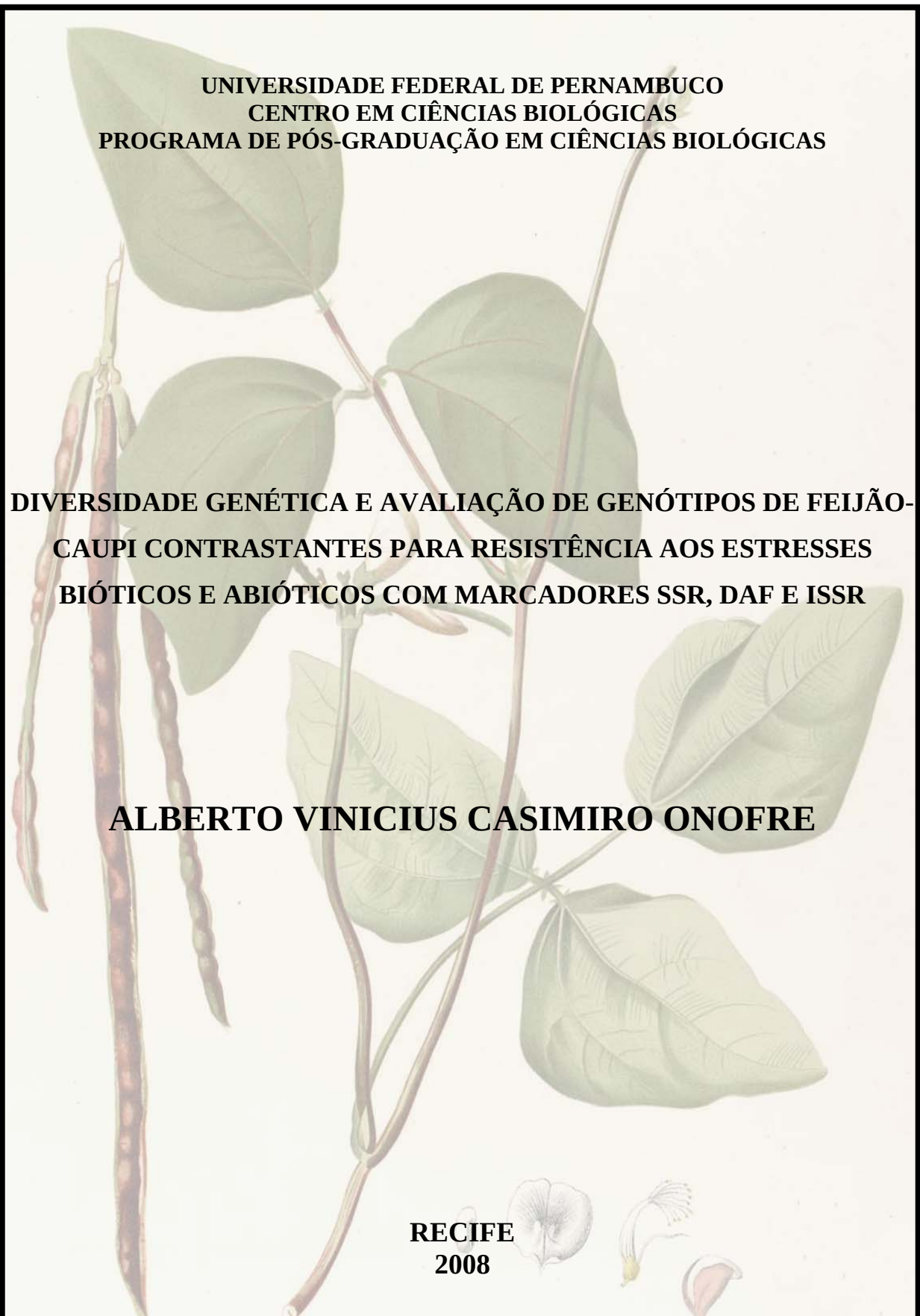


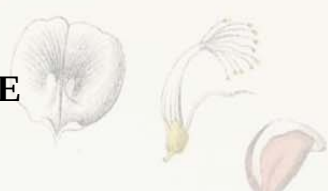


UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DIVERSIDADE GENÉTICA E AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO-
CAUPI CONTRASTANTES PARA RESISTÊNCIA AOS ESTRESSES
BIÓTICOS E ABIÓTICOS COM MARCADORES SSR, DAF E ISSR

ALBERTO VINICIUS CASIMIRO ONOFRE

RECIFE
2008



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

ALBERTO VINICIUS CASIMIRO ONOFRE

**DIVERSIDADE GENÉTICA E AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO-
CAUPI CONTRASTANTES PARA RESISTÊNCIA AOS ESTRESSES
BIÓTICOS E ABIÓTICOS COM MARCADORES SSR, DAF E ISSR**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Molecular e Celular.

Orientadora: Dra. Ana Maria Benko-Iseppon

Co-orientadora: Dra. Valesca Pandolfi

**RECIFE
2008**

BANCA EXAMINADORA

“Diversidade genética e avaliação de genótipos de feijão-caupi contrastantes para resistência aos estresses bióticos e abióticos com marcadores SSR, DAF e ISSR”



Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Benko Iseppon (UFPE)



Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos (EMBRAPA)



Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima (UFAL)

***Dedico ao meu pai e à
Lidiane Amorim.***

AGRADECIMENTOS

À Deus, inteligência suprema e causa primeira de todas as coisas, por ter proporcionado coragem e força em todos os momentos da minha vida!

Ao meu Pai, José Arrais Onofre, pelo exemplo constante que transmite para mim, além da sua amizade sincera e todo o seu apoio. Só pude ser biólogo e uma pessoa de bem porque tive um pai tão digno e admirável!

À Lidiane Amorim, pela alegria, força e o intenso apoio durante todo o curso do mestrado! Pelos vários momentos singulares e eternos que passamos juntos, sem eles eu não seria tão feliz! Pela construção de um forte laço repleto de amor!

Aos meus irmãos: Alexandre Sherlley, Pedro Herbert, Patrícia Karla e Dilson Aquino, os meus amigos mais próximos, pela paciência e confiança.

À Dilma Aquino, companheira do meu pai, que sempre transmitiu pensamentos positivos e de tranquilidade.

À minha orientadora: Ana Maria Benko-Iseppon, exemplo de liderança, pesquisadora e simpatia, pela confiança, respeito e sinceridade. Sou eternamente grato por tudo que ela me proporcionou! O progresso do mundo se faz através de pessoas como ela!

À minha co-orientadora: Valesca Pandolfi, uma pessoa que planta apenas boas sementes! Pela alegria, otimismo, competência, amizade e apoio incondicional, fundamentais para a minha formação.

À minha ex-co-orientadora, Kátia Brunelli, uma pessoa dinâmica e competente, por ter ensinado toda a base necessária para o desenvolvimento do nosso trabalho, pela confiança e respeito.

A todos os professores que foram responsáveis pela minha formação, em especial aos professores: **Ederson Kido**, pelo apoio, por disponibilizar o Laboratório de Genética Molecular e por solucionar diversas dificuldades nos experimentos, além da sua amizade e intensa capacidade científica; **Laureen Kido**, pelos bons momentos e por sempre me ajudar quando necessário; **Tercilo Calsa**, por me ajudar em um momento extremo, substituição para a banca de qualificação, sou eternamente grato por este gesto de amizade; **Marcelo Guerra**, por demonstrar, através do exemplo, a importância do estudo e da seriedade em suas atividades, pelo ensinamento científico, paciência, disciplina e responsabilidade; **Ana Brasileiro**, pela tranquilidade, confiança e paz.

À todos os membros da banca, por ter aceito o singelo convite e por ter contribuído para o melhoramento da nossa dissertação, em especial: **Roseane Cavalcanti**, uma pessoa doce e responsável! Por já ter contribuído na qualificação, sempre com muita educação e respeito; **Gaus Silvestre**, que transmite muita paz e conhecimento, sempre de uma forma branda e clara.

A todos do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, em especial: **Claudete**, por transmitir a importância de ser uma pessoa organizada e bom coração; **Analice**, pelo carinho e atenção; **Santelmo, Ana Rafaela, Bené, Tais e Karla**, por serem pessoas transparentes e de bom astral; **Mario, Diego Sotero, Geyner, Hayana e Pedranne**, pelos bons momentos e por formar um grupo muito alegre; **Luiz Carlos**, pela paciência em ensinar tópicos em Bioinformática; **Isaac, Kyria e Amaro**, por serem pessoas que sempre estão dispostas para ajudar além da torcida e força. **Diego Grande e Derovil**, pessoas que possuem um grande potencial! Pelo respeito, amizade e apoio. **Nali, Rodrigo, Carol, Nina, Petra, Gabriela e Jailson**, que contribuíram de alguma forma com as suas qualidades específicas. Sentirei Saudades...

À **Neto e Luciene**, exemplos de determinação e força, por terem ensinado todos os passos da montagem, eletroforese e coloração do gel de acrilamida.

À **D. Zizi**, uma pessoa que possui um coração enorme, pronto para ajudar a todos! Pelo carinho e apoio diário.

À **Antônio Félix**, por viabilizar a coleta de material vegetal, necessária para completar os genótipos de Feijão-Caupi, na estação experimental de Arcoverde – IPA.

Ao grupo do Laboratório Genética, Bioquímica e Seqüenciamento e DNA – UFRPE, por disponibilizar água destilada e utensílios quando necessário, em especial: **ao professor Reginaldo de Carvalho**, uma pessoa simples e competente; **aos seus pais, Tereza e Antônio**, fontes de amor e paz, por terem me acolhido em Piauí; e **à Lucília**, que esteve presente por um curto tempo no nosso laboratório, por trocar experiências e pelos bons momentos.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas, que viabilizou a realização deste mestrado, o qual é representado pela pessoa de **Suely Galdino**, que sempre me recebeu com um sorriso e atenção. **À Adenilda**, por solucionar e organizar tudo o que foi necessário para a conclusão das atividades.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro e **ao MCT/RENORBIO** pelo apoio financeiro ao projeto.

SUMÁRIO

<i>Lista de Figuras</i>	8
<i>Lista de Tabelas</i>	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Aspectos Gerais do Feijão-Caupi	15
2.1.1. Centro de Origem e Distribuição	15
2.1.2. Classificação Botânica e Características Morfológicas	16
2.1.3. Recursos Genéticos	17
2.1.4. Importância Econômica	17
2.1.5. Melhoramento genético do Feijão-Caupi no Brasil	20
2.1.5.1. Principais Doenças e Pragas do Feijão-Caupi no Brasil	20
2.1.5.2. Estresse Abióticos Provocados por Seca e Salinidade	25
2.1.6. Caracterização Genética	28
2.1.6.1. Marcadores Moleculares: Tipos, Importância e Aplicações	28
2.1.6.2. Marcadores Moleculares em Feijão-Caupi	31
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
4. MANUSCRITO	46

LISTA DE FIGURAS

Manuscrito

Figura 1.	Fotos representativas dos produtos das reações de DAF e ISSR com todos os acessos de <i>Vigna</i> e <i>Phaseolus</i> .	68
Figura 2.	Fotos representativas dos produtos das reações de microsatélite com todos os acessos de <i>Vigna</i> e <i>Phaseolus</i> .	69
Figura 3.	Árvore consenso gerada a partir dos dados das reações de DAF, ISSR e microsatélite usando o método de <i>neighbor-joining</i> com o programa MEGA 4.	70
Figura 4.	Fenograma gerado a partir da análise da matriz de dados das reações de DAF, ISSR e microsatélite usando método UPGMA com o programa NTSYs 2.1.	71

LISTA DE TABELAS

Manuscrito

Tabela 1.	Número de acesso, procedência e características agronômicas dos genótipos do gênero <i>Vigna</i> e <i>Phaseolus</i> utilizados neste estudo.	64
Tabela 2.	Lista de primers usados nas reações de ISSR, incluindo o número de bandas polimórficas ao nível intra e interespecífico.	65
Tabela 3.	Lista de primers usados nas reações de DAF, incluindo o número de bandas polimórficas ao nível intra e interespecífico.	65
Tabela 4.	Primes originais (direito e esquerdo) usados na metodologia de microssatélite.	66
Tabela 5.	Número de alelos detectados no gênero <i>Vigna</i> usando primers microssatélites desenvolvidos para feijão-caupi.	67
Tabela 6.	Número de alelos detectados no gênero <i>Vigna</i> usando primers microssatélites desenhados para feijão-adzuki.	67
Tabela 7.	Número de alelos detectados no gênero <i>Vigna</i> usando primers microssatélites desenhados para <i>Vigna radiata</i> .	67

RESUMO

O estudo da diversidade genética entre acessos de bancos de germoplasma fornece importantes subsídios aos programas de melhoramento vegetal. Com a finalidade de caracterizar a diversidade genética inter e intra-específica do gênero *Vigna*, as técnicas de DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e SSR (*Simple Sequence Repeat*) foram aplicadas no presente estudo. Vinte e nove acessos de *Vigna* foram selecionados para a análise, incluindo um acesso de cada uma das quatro espécies *V. aconitifolia*, *V. angularis*, *V. mungo* e *V. radiata*, bem como 23 acessos cultivados de *V. unguiculata* (feijão-caupi) e duas subespécies nativas (*V. unguiculata* ssp. *cylindrica* e *V. unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) usando-se como grupo externo duas cultivares de *Phaseolus vulgaris* ssp. *vulgaris* (cv. 'Neckarkönigin' e cv. 'Delinel'). No total foram geradas 1065 bandas polimórficas para a montagem da matriz de dados a partir de 46 primers, sendo quatro DAF, 22 ISSR e 20 pares SSR. Os resultados obtidos foram analisados pelos métodos de neighbor-joining (programa MEGA) e de UPGMA (programa NTSYs 2.1). Nos dendrogramas gerados, o feijão-caupi mostrou-se mais proximamente relacionado com as duas subespécies silvestres de *V. unguiculata*. As espécies do subgênero *Ceratotropis* agruparam-se em um clado distinto no qual a espécie *V. aconitifolia* (considerada primitiva no grupo) aparece em uma posição basal da qual emergem dois subclados incluindo as espécies *V. radiata* e *V. mungo* no primeiro e a espécie *V. angularis* no segundo. Os genótipos de feijão-caupi permaneceram unidos com altos valores de bootstrap (99%), formando dois subclados principais e subgrupos, vários compreendendo acessos com características agrônômicas similares. Cultivares com características fenotípicas contrastantes, tais como imunidade (BR14 Mulato e TVU 382) e suscetibilidade (IT 85F-2687) a viroses; resistência (BR17-Gurguéia) e suscetibilidade (CE31) ao nematóide de galhas (*Meloidogyne incognita*); resistência (IT81D-1053) e suscetibilidade (CNC 0434) ao caruncho (*Callosobruchus malucatus*); resistência (Pitiúba) e suscetibilidade (Canapu Amarelo) a seca/salinidade, foram agrupados em clusters distintos, demonstrando desta forma haver suficiente divergência genética para seu uso como parentais em cruzamentos de mapeamento. As implicações dos resultados obtidos, especialmente no que se refere ao melhoramento do feijão-caupi são discutidas no presente trabalho.

Palavras-chave: feijão-caupi, marcadores moleculares, germoplasma, evolução de plantas cultivadas.

ABSTRACT

The characterization of genetic diversity among germplasm bank accessions brings important evidences, very useful in breeding programs. Aiming to access the genetic diversity at the inter and intraspecific level in the genus *Vigna*, three types of molecular markers have been used including DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) and SSR (*Simple Sequence Repeat*). For this purpose 29 accessions of *Vigna* have been selected, including representatives of the four *Vigna* species: *V. aconitifolia*, *V. angularis*, *V. mungo* and *V. radiata*, as well as 23 accessions of cultivated cowpea (*V. unguiculata*) and two native cowpea relatives (*V. unguiculata* ssp. *cylindrica* and *V. unguiculata* ssp. *sesquipedalis*). Two cultivars (cv. 'Neckarkönigin' and cv. 'Delinel') of *Phaseolus vulgaris* ssp. *vulgaris* have been also included as outgroup. A total of 1065 polymorphic bands have been generated using 46 marker systems (4 DAF, 22 ISSR and 20 SSR). The data matrix was analyzed by both neighbor-joining (MEGA.4 program) and UPGMA (NTSYS 2.1 program) methods. In the generated trees the cowpea cultivars grouped near the two native *V. unguiculata* subspecies. The species of the *Ceratotropis* subgenus grouped in a distinct clade with *V. aconitifolia* (considered primitive in the group) in a basal position from which two subclades emerged; the first including *V. radiata* and *V. mungo* and the second with *V. angularis*. Cowpea genotypes remained together with high bootstrap values (100%), with accessions grouped in two large subclades divided in groups that often included materials with similar agronomic features. Additionally, accessions with contrasting phenotypic features as immunity (BR14 Mulato and TVU 382) and susceptibility (IT85F-2687) to virus; resistance (BR17-Gurguéia) and susceptibility (CE31) to gall nematode (*Meloidogyne incognita*); resistance (IT81D-1053) and susceptibility (CNC 0434) to weevil (*Callosobruchus malucatus*); resistance (Pitiúba) and susceptibility (Canapu Amarelo) to drought and salinity, were positioned in distinct clusters, demonstrating the availability of considerable genetic diversity for their use as parental in crosses for mapping purposes. The implications of the here generated results, especially regarding the cowpea breeding program are further discussed.

Key words: cowpea, molecular markers, germplasm, crop evolution.

1. INTRODUÇÃO

Plantas leguminosas estão entre as principais fontes de proteínas, óleos e carboidratos da alimentação humana e animal. Dentro deste importante grupo vegetal há um especial interesse pelos recursos genéticos de espécies do gênero *Vigna*, o qual se fundamenta principalmente no potencial econômico e ecológico da exploração da variabilidade genética de cada uma de suas espécies cultivadas e, ainda, na possibilidade de transferência de características genéticas desejáveis das espécies silvestres às cultivadas, aproveitando eventuais compatibilidades reprodutivas.

Dentre as espécies cultivadas do gênero *Vigna*, o feijão-caupi [*V. unguiculata* (L.) Walp.], feijão-mungo [*V. radiata* (L.) Wilczek], feijão-rajado [*V. mungo* (L.) Hepper], feijão-adzuki [*V. angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi], feijão-arroz [*V. umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi] e [*V. aconitifolia* (Jacq.) Marechal], destacam-se pela sua capacidade de adaptação a condições climáticas estressantes, crescendo em solos pobres e sem necessidade de suplementação de nitrogênio (Santalla *et al.* 1998; Fery, 2002), incluindo países tropicais, que tradicionalmente dispõem de um menor aporte de investimentos em melhoramento e biotecnologia.

O feijão-caupi está entre as leguminosas mais importantes na alimentação humana em áreas áridas, semi-áridas ou ainda úmidas, sendo cultivado em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, o feijão-caupi é produzido predominantemente nas regiões Nordeste e Norte, figurando entre as principais culturas de subsistência, devido a seu alto conteúdo protéico, importante como fonte de calorias, vitaminas e minerais, além de possuir elevados níveis de ácido fólico, maior digestibilidade que o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), níveis menores de fatores anti-nutricionais e de flatulência, contribuindo também na geração de renda por gerar um grande número de empregos (Ehlers e Hall, 1997; Benko-Iseppon, 2001; Maia *et al.*, 2001).

Devido ao seu valor nutritivo, o feijão-caupi é cultivado principalmente para a produção de grãos secos ou verdes visando o consumo humano *in natura*, desidratado ou na forma de conserva. Além disso, também é utilizado como forragem verde, feno, ensilagem, farinha para alimentação animal e, ainda, como adubação verde na recuperação de solos naturalmente pobres em fertilidade ou esgotados pelo uso intensivo (Oliveira e Carvalho, 1998; Andrade Júnior *et al.*, 2000).

Os programas de melhoramento do feijão-caupi desenvolvidos pelas instituições brasileiras se baseiam na introdução ou geração da variabilidade e posterior seleção de

linhagens para caracteres de importância econômica ou nutricional. Apesar dos vários objetivos que um programa de melhoramento do feijão-caupi pode almejar, o aumento da produção ainda é o seu principal objetivo. Entretanto, a produção do feijão-caupi é bastante afetada por fatores fitossanitários, havendo inúmeras doenças e pragas a esta cultura que podem ocasionar perdas substanciais da produção. Diante disso, a pesquisa para resistência a pragas e doenças torna-se prioritária. Apesar desta importância, a resistência a estresses bióticos deve também ser combinada com cultivares tolerantes a estresses abióticos, como seca e salinidade, possibilitando assim, a continuidade de seu cultivo em áreas secas e por vezes salinizadas, frequentes na região Nordeste (Freire-Filho *et al.*, 2005).

Visando à obtenção de cultivares de feijão-caupi com maior estabilidade de produção e resistência ou tolerância aos estresses bióticos e abióticos, a utilização de genitores divergentes que apresentam alelos de interesse em cruzamentos pode ser uma opção vantajosa. Esta divergência genética, entre genitores, pode promover combinações gênicas favoráveis, mediante efeitos de aditividade, pleiotropia e epistasia. A caracterização de bancos de germoplasma permite o conhecimento da variabilidade existente na espécie, orientando o trabalho do melhorista no planejamento de cruzamentos (Chiorato, 2004).

Considerando-se que a tolerância à salinidade e à seca são características predominantemente controladas por um grande número de genes (poligênicas), de difícil manuseio no melhoramento genético clássico, poucos cultivares de feijão-caupi tolerantes a estes estresses e apresentando a produtividade necessária têm sido obtidos. Dessa maneira, a biologia molecular assume papel-chave na identificação pontual de genes ou regiões genômicas envolvidos nas respostas ao estresse salino e déficit hídrico, através do mapeamento genético e desenvolvimento de bibliotecas de EST (*Expressed Sequence Tags*). Tal identificação poderá propiciar a futura compreensão de rotas metabólicas envolvidas nas respostas fisiológicas tanto à salinidade como ao déficit hídrico. Com isso será possível, por exemplo, utilizar genes de interesse como sondas moleculares em programas de melhoramento que auxiliem na identificação de genótipos e expressem mecanismos metabólicos que aumentem sua tolerância às condições de estresse abiótico. Além disso, existe também a possibilidade do uso de técnicas de engenharia genética (transgenia) como forma de transferência de genes entre diferentes genótipos mesmo entre espécies incompatíveis (Beever, 2000).

Nesse sentido o uso de marcadores moleculares, torna-se fundamental para uma seleção mais eficiente dos recursos genéticos, facilitando a detecção da real variabilidade genética para fins de melhoramento convencional ou com fins biotecnológicos, contribuindo assim para o conhecimento do caráter estudado (Benko-Iseppon *et al.*, 2005).

Estudos com marcadores moleculares no feijão-caupi – tanto na caracterização, na avaliação e no manejo de germoplasma, como na identificação de cultivares e no desenvolvimento de mapas genéticos para auxiliar nos processos de cruzamento e seleção – são recentes e escassos, quando comparados à literatura existente sobre outras leguminosas como o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), a ervilha (*Pisum sativum* L.), a soja (*Glycine max* L.) e a alfafa (*Medicago sativa* L.) (Ehlers & Hall, 1997; Benko-Iseppon, 2001). Além disso, esses estudos são voltados para a solução de aspectos da genética e do melhoramento de cultivares do feijão-caupi adaptados às regiões dos Estados Unidos e da África, diferentes dos demandados para a região Nordeste do Brasil.

Dentre as metodologias para geração de marcadores moleculares existentes, as técnicas de DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*), SSR (*Simple Sequence Repeat*) e ISSR (*Inter Sequence Simple Repeat*) têm sido consideradas importantes ferramentas na identificação individual, avaliação do grau de parentesco entre indivíduos, estudo da variabilidade genética e na construção de mapas de ligação (Caetano-Anollés *et al.*, 1991; Weising *et al.*, 2004). Com esta finalidade, estas metodologias têm sido eficientemente aplicadas ao estudo da variabilidade em diversas culturas, incluindo leguminosas como o amendoim (He e Prakash, 1997; Raina *et al.*, 2001; Moretzsohn *et al.*, 2005), grão-de-bico (Winter *et al.*, 2000; Benko-Iseppon *et al.*, 2003; Sudupak, 2004) e feijão-caupi (Ajibade *et al.*, 2001; Li *et al.* 2001; Simon *et al.*, 2007).

Neste trabalho procedeu-se uma caracterização molecular de cultivares de feijão-caupi que constituem a base dos programas de melhoramento para as condições do Nordeste Brasileiro, incluindo materiais contrastantes para resistência a estresses bióticos e abióticos. Para refinar a avaliação, os citados genótipos foram comparados a táxons relacionados, através das técnicas de SSR, ISSR e DAF. A caracterização aqui proposta pretende subsidiar programas de melhoramento de feijão-caupi, revelando a variabilidade genética associada a estas características e as possíveis relações entre os genótipos analisados, indicando assim candidatos importantes para geração de progênies de mapeamento e melhoramento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos Gerais do Feijão-caupi

2.1.1. Centro de Origem e Distribuição

Análises do gênero *Vigna* quanto à variação morfológica, citogenética, molecular e fitogeográfica situam o feijão-caupi entre as espécies mais primitivas ocorrentes na África, sugerindo que sua evolução e dispersão provavelmente tenham ocorrido a partir deste continente. O gênero *Vigna* por sua vez compreende 170 espécies, das quais 120 ocorrem na África (66 endêmicas), 22 na Índia e sudeste da Ásia (16 endêmicas), havendo poucas espécies descritas para as Américas e a Austrália (Faris, 1965; Ghaffor *et al.*, 2001).

Steele e Mehra (1980) e Ng & Maréchal (1985) citam o oeste da África, mais precisamente a Nigéria, como o centro primário de diversidade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Padulosi e Ng (1997) indicam a região de Transvaal, na República da África do Sul como a mais provável região de especiação da espécie. Por outro lado, em um estudo recente, Simon *et al.* (2007) confirmam suposições anteriores de Kaga *et al.* (1996) que não apóiam a teoria de origem africana, apontando para uma origem na região sudoeste da Ásia, reconhecido berço das subtribos Phaseolinae, Galegeae, Loteae, Trifolieae e Vicieae.

Watt (1978) e Freire-Filho (1988) afirmam que sua introdução no Brasil ocorreu pelo estado da Bahia, a partir do qual, o feijão-caupi foi levado pelos colonizadores para outras áreas da região Nordeste e para outras regiões do país. Por outro lado, Simon *et al.* (2007) sugerem que mais de um evento de introdução de diferentes regiões da África devam ter ocorrido, especialmente considerando que houve migração de escravos africanos de diferentes regiões para nosso país. Embora o uso do feijão-caupi seja muito semelhante ao do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), observa-se sua predominância nos trópicos semi-árido, úmido e sub-úmido, condições climáticas às quais se apresenta melhor adaptado (Smartt, 1990).

2.1.2. Classificação Botânica e Características Morfológicas

O feijão-caupi pertence à classe Dicotiledônea, ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolinae, gênero *Vigna*, seção *Catjang*, espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. e ssp. *unguiculata*. O gênero *Vigna* apresenta-se subdividido em sete subgêneros: *Vigna*, *Plectotropis*, *Ceratotropis*, *Lesiocarpa*, *Sigmoidotropis*, *Haydonia* e *Macrorhycha* dentre os quais o subgênero *Vigna* se destaca, por compreender o maior número de espécies, apresentando seis seções: *Catjang*, *Comosae*, *Leibrehtsia*, *Macrodonatae*, *Reticulatae* e *Vigna* (Marechal *et al.*, 1978; Baudoin e Maréchal, 1985; Padulosi e Ng, 1997)

Além do feijão-caupi, diversas outras espécies do gênero *Vigna* têm importância econômica e social. As demais espécies amplamente cultivadas pertencem ao subgênero *Ceratotropis* (Piper) Verdcourt incluindo feijão-mungo [*V. radiata* (L.) Wilczek], feijão-rajado [*V. mungo* (L.) Hepper], feijão-adzuki [*V. angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi], feijão-arroz [*V. umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi] e [*V. aconitifolia* (Jacq.) Marechal], sendo consideradas por Maréchal *et al.* (1978), como proximamente relacionadas.

O feijão-caupi é uma planta herbácea anual, propagada por sementes, de crescimento morfológico diversificado, apresentando variação de porte, desde ereto até prostrado e hábito de crescimento determinado a indeterminado (Oliveira & Carvalho, 1998; Freire-Fillho *et al.*, 1999). As flores, completas, têm os órgãos masculinos e femininos bem protegidos pelas pétalas, em número de cinco, de coloração branca, amarela ou violeta (Teófilo *et al.*, 2001).

Apresenta autofecundação e uma taxa muito baixa de alogamia ou fecundação cruzada. Teófilo *et al.* (1999) encontraram uma taxa de cruzamento natural de 0,80%. Souza *et al.* (2005) encontraram uma taxa que variou de 0 a 1,06%, constituindo-se em um genoma estável, o que evita o “escape” de genes para indivíduos selvagens ou para plantações circunvizinhas, o que também impede a introgressão de caracteres não desejados. As gerações são curtas, o que facilita projetos de mapeamento amplo ou direcionado a regiões genômicas de interesse (Benko-Iseppon, 2001). Completando o que se pode chamar de “perfil ideal” para um modelo experimental lucrativo, o feijão-caupi pode ser geneticamente transformado (Machuka *et al.*, 2000), expressando genes exógenos com sucesso e constituindo-se em uma possível fonte para a produção de substâncias bioativas.

2.1.3. Recursos Genéticos

Importantes recursos genéticos encontram-se disponíveis aos pesquisadores, através dos bancos de germoplasma que têm sido criados em todo o mundo. O principal centro de pesquisas em feijão-caupi, com a maior coleção de germoplasma, está localizado na Nigéria, no Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA), compreendendo cerca de 15.200 cultivares e 1.646 acessos selvagens, seguido pela Estação Regional da Geórgia de Introdução de Plantas, com cerca de 7.400 acessos e da Universidade da Califórnia, em Riverside, com 5.275 cultivares e 50 acessos selvagens (Ehlers e Hall, 1997).

No Brasil, a Embrapa Meio-Norte ou Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte (CPAMN, Teresina, PI) é responsável pela Coleção Ativa do feijão-caupi, tratando-se do local onde as pesquisas com essa cultura visam beneficiar a produção local e nacional deste produto (Wetzel *et al.*, 2005). A Coleção de Base (coleção de ampla abrangência, visando assegurar e atender aos interesses futuros dos programas de melhoramento do feijão-caupi no país) está atualmente constituída de 4.845 acessos do gênero *Vigna*, dos quais, 48% dos acessos são originados de coletas e 52% de introduções (Wetzel e Faiad, 2001; Wetzel *et al.*, 2005).

Além da Embrapa Meio-Norte, várias instituições estaduais (Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte – EMPARN; Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba – EMEPA; Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA; Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola – EBDA) e universidades mantêm bancos de germoplasma do feijão-caupi como parte de suas atividades de pesquisa.

2.1.4. Importância Econômica

Os grãos maduros do feijão-caupi possuem cerca de 20-30% de proteína, 50-64% de carboidratos, 0,7-3,5% de óleo e importantes frações de ferro, potássio, fósforo e aminoácidos essenciais como a isoleucina, leucina, fenilalanina, tirosina e metionina, entre outros, com destaque para a última por estar presente em quantidades bem superiores ao feijão comum (Bressani e Elias, 1980; Prinyawiwatukul *et al.*, 1996; Maia *et al.*, 2000), podendo ser utilizada na substituição ou complementação dos alimentos derivados dos animais. Além desses benefícios, se constitui em excelente cultura para

as regiões semi-áridas dos trópicos visto que: (a) apresenta considerável tolerância à seca e ao calor, (b) proporciona uma excelente cobertura vegetal e, desta forma, inibe o crescimento de ervas daninhas, e (c) ajuda a evitar a erosão e contribui para a melhoria da fertilidade de solos em áreas marginais, ao fornecer matéria e resíduos orgânicos que se incorporam ao substrato após a colheita de seus grãos, melhorando a estrutura edáfica, aumentando a disponibilidade de fósforo e contribuindo para a fixação de nitrogênio, através da associação com bactérias fixadoras de N₂ atmosférico (Valenzuela e Smith, 2002).

O consumo humano do feijão-caupi pode ser na forma de vagem verde, cuja colheita é feita quando as vagens estão bem desenvolvidas, mas ainda com baixo teor de fibras; na forma de grãos verdes, colhidas no início da maturação e na forma de grão seco, onde as vagens são colhidas secas, no ponto de maturação de campo (Vieira *et al.*, 2000). Além da sua utilização na alimentação humana, o feijão-caupi pode ser utilizado na alimentação animal, como forragem verde, feno, ensilagem e farinha (Oliveira e Carvalho, 1998).

A área ocupada com feijão-caupi no mundo está em torno de 14 milhões de ha, sendo 9.3 milhões (69% da área mundial) na parte Oeste e Central da África. A outra parte da área cultivada está localizada na América do Sul, América Central e Ásia, com pequenas áreas espalhadas pelo sudoeste da Europa, sudoeste dos Estados Unidos e Oceania. Entre todos os países, os principais produtores mundiais são Nigéria, Niger e Brasil (Langyintuo *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2003).

O feijão-caupi é cultivado nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, especialmente no Sertão Nordestino. A área cultivada com feijão-caupi no Brasil é de aproximadamente 1 milhão de hectares dos quais cerca de 900 mil (90%) estão situados na região Nordeste do Brasil (Lima *et al.*, 2007).

A área colhida, a produção e a produtividade dessa cultura oscilam muito de ano para ano em virtude, principalmente, das variações climáticas. Entre 1993 e 2001, a média anual da área colhida foi de 1.355.184 ha, a produção foi de 429.375 toneladas e a produtividade, relativamente baixa, na faixa de 300 a 400 kg/ha. Com base nesses dados e considerando que um hectare gera um emprego por ano, que o consumo per capita é de 18,6 kg e que o valor histórico da saca de feijão é de US\$ 33, 84, estima-se que, naquele período, o feijão-caupi tenha gerado, em média, por ano, 1,36 milhões de empregos, produzindo suprimento alimentar para 23,06 milhões de pessoas, tendo sua produção valorizada em US\$ 242,6 milhões (Freire-Filho *et al.*, 2005). Esses dados são

extremamente importantes, uma vez que refletem a participação da cultura no contexto de geração de empregos, de renda e da produção de alimentos no país e a credencia para receber maior atenção por parte das políticas de abastecimento e por parte dos órgãos de apoio à pesquisa.

O estado do Ceará é o maior produtor nacional, seguido pelo Piauí. Na safra de 2002/2003 a área plantada no Ceará foi de 618.600 hectares e uma produção de 211.800 toneladas, enquanto que no Piauí, foram cultivados 218.100 hectares com uma produção de 68.500 toneladas. No estado da Paraíba o feijão-caupi possui uma considerável produção, com índices variando desde 300 a 700 kg/ha. Em diferentes regiões do estado, com destaque para as produções do Agreste e do Sertão, observam-se plantios de baixa, média e larga escala, juntamente em consórcio com culturas mais tradicionais, assim como o milho e o algodão (FNP, 2004; Amaral et al., 2005).

Embora a importância desta cultura seja reconhecida para as populações de regiões semi-áridas do Brasil, o seu melhoramento tem sido limitado a métodos convencionais de cultivo e seleção, visando adaptá-las às condições locais (Freire-Filho *et al.*, 1999). Na década de 90, foram colhidas anualmente, em média, 3,5 milhões de toneladas de feijão, sendo 0,8 milhões de toneladas de feijão-caupi e 2,7 milhões de feijão comum. Portanto, mesmo considerando os esforços locais dos programas de melhoramento, apenas cerca de 23% da produção nacional refere-se ao feijão-caupi (Fontes, 2006).

Dentre os fatores que limitam o desenvolvimento do feijão-caupi pode-se citar a semeadura em novas áreas o que proporciona mesoclimas menos propícios para cultura, deficiência hídrica causada pela escassez e irregularidade das chuvas, salinização dos solos, plantios predominantemente de subsistência, utilização de cultivares com potencial genético reduzido e ocorrência de doenças e pragas (Castro, 2000). Deste modo, é necessário que se inicie um estudo mais avançado da genética desta cultura, de modo que os programas de melhoramento convencionais busquem apoio da biologia molecular, para que se tornem mais ágeis e eficientes, disponibilizando aos produtores, comerciantes, industriais e consumidores, cultivares cada vez melhores (Freire-Filho *et al.*, 2005).

2.1.5. Melhoramento Genético do Feijão-Caupi no Brasil

Os principais objetivos dos programas de melhoramento do feijão-caupi no mundo envolvem: resistência múltipla a doenças e pragas, melhoria das características de grão, porte, tolerância ao calor, ao frio, à salinidade e à seca (Ehlers e Hall, 1997; Timko e Singh, 2008). No Brasil, o melhoramento dessa cultura tem como objetivos principais: **(a)** aumentar a produtividade e melhorar a qualidade visual e nutricional dos grãos; **(b)** aumentar a adaptabilidade, a estabilidade e tolerâncias aos estresses hídricos e salinos; **(c)** incorporar resistência múltipla a doenças e incorporar resistência a insetos; **(d)** obter porte mais compacto e ereto, possibilitando a colheita mecânica e o processamento industrial (Freire-Filho *et al.*, 1999).

Em conjunto, esses atributos podem compor o genótipo de uma nova cultivar, ou serem encontrados em vários genótipos, dependendo do interesse do programa ou das possibilidades de obtenção. Basicamente, o esquema de obtenção e teste de linhagens consta das seguintes etapas: a) seleção de parentais; b) formação da população básica; c) avanço de gerações, com descarte das plantas com sintomas severos de doenças e ataque severo de pragas; d) formação de linhagens; e) teste de produtividade; f) produção de sementes genéticas; g) lançamento de novas cultivares. As fontes de germoplasma para seleção dos parentais e formação da população segregante são as cultivares locais, já adaptadas, bem como acessos obtidos do Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA), incluindo cultivares melhoradas e linhagens em avaliação. Esses materiais vêm sendo obtidos no Banco de Germoplasma da Embrapa Meio-Norte, nas coleções regionais e no próprio programa de melhoramento (Freire-Filho *et al.*, 2005).

2.1.5.1. Principais Doenças e Pragas do Feijão-Caupi no Brasil

Dentro do grupo de agentes patogênicos ao feijão-caupi, as viroses são indiscutivelmente os agentes infecciosos de maior importância no Brasil. Especialmente o vírus do mosaico severo do feijão-caupi (CPSMV, *Cowpea Severe Mosaic Virus*) da família Comoviridae, os mosaicos de potyvirus (CABMV, *Cowpea Aphid-Borne Mosaic Virus* e BICMV, *Blackeye Cowpea Mosaic Virus*) da família Potyviridae e o vírus do mosaico dourado do feijão-caupi (CPGMV, *Cowpea Golden Mosaic Virus*) da família Geminiviridae, entre outros fatores, têm reduzido drasticamente a produção de feijão-

caupi no Brasil e em outros países da América Latina (Gonçalves e Lima, 1982; Pio-Ribeiro e Assis Filho, 1997; Barreto, 1999; Freire-Filho *et al.*, 1999; Rocha *et al.*, 2003) com perdas de até 81% (Araújo *et al.*, 1984; Umaharan *et al.*, 1997).

O CPSMV apresenta uma grande variabilidade biológica, sendo eficientemente disseminado na natureza por meio de coleópteros a maioria deles dos gêneros *Cerotoma* e *Diabrotica* (Costa e Batista, 1979; Freire-Filho *et al.*, 2005).

Os primeiros sintomas do mosaico severo aparecem, normalmente, 3 a 4 dias após a inoculação. Quando a infecção ocorre em plantas jovens, os sintomas são drásticos e visíveis em todas as partes aéreas da planta, causando inclusive necrose da extremidade superior do caule, morte dos brotos terminais e queda prematura das folhas. Nas folhas, os sintomas manifestam-se na forma de manchas cloróticas e necróticas, mosaico severo, distorção foliar, redução da lâmina foliar, bolhosidade, clareamento da nervura, necrose sistêmica e morte de algumas cultivares. Em muitas cultivares, podem-se observar manchas irregulares nas vagens e nas sementes, sendo que estas, normalmente, apresentam-se chochas, com baixa taxa de germinação (Lima *et al.*, 2005). Em função disso, os danos na produção são bastante significativos, dependendo da cultivar envolvida e da época de inoculação.

Medidas de prevenção, geralmente envolvem a aplicação semanal de inseticidas para controlar a população de vetores e conseqüentemente a disseminação do vírus (Costa *et al.*, 1978), um método prejudicial ao meio ambiente que infelizmente não é efetivo na estação chuvosa, quando as plantações estão em fase de crescimento (Umaharan *et al.*, 1997; Paz *et al.*, 1999). O alto custo também tem desencorajado a adoção do controle químico dos vetores pelos agricultores. Por conta da ampla distribuição do vírus nas regiões de plantio e dos diferentes tipos de hospedeiros naturais existentes no Brasil, a identificação de fontes de resistência está entre as maiores preocupações dos pesquisadores que trabalham com o feijão-caupi (Freire-Filho *et al.*, 1999).

Os mosaicos de potyvirus (CABMV e BICMV) chegaram ao Brasil no início da década de 70, sendo disseminados por sementes (Rios, 1990) e por insetos, especialmente pelo pulgão *Aphis craccivora* Koch. Os sintomas mais comuns são mosaico intenso no limbo foliar, formado por áreas verdes normais entremeadas por áreas cloróticas, faixas verde-escuras nas nervuras, distorção das folhas e redução mais ou menos acentuada do crescimento das plantas. Dependendo da interação entre cultivar e estirpe, bem como da época de início da infecção, perdas acima de 50% têm

sido relatadas em condições de campo e casa de vegetação (Pio-Ribeiro e Assis Filho, 1997).

Além das infecções causadas por vírus isoladamente, infecções mistas, como por exemplo, aquelas provocadas por dupla infecção (vírus-vírus; vírus-bactéria; etc.) têm sido relatadas, agravando ainda mais as perdas. Este é o caso da dupla infecção de CABMV e CMV (*Cucumber Mosaic Virus*) ocasionando nanismo, diminuição do tamanho de todos os órgãos vegetativos, mosaico intenso, distorção de folhas e necrose sistêmica. Embora este último vírus não ocasione reduções significativas no crescimento e na produção, o mesmo tem gerado problemas potenciais devido a uma maior gama de cultivares suscetíveis, sendo capaz de interagir sinergicamente com os vírus do gênero *Potyvirus* (Lima *et al.*, 2005).

Além das viroses, outras doenças são consideradas importantes, e podem também gerar perdas significativas dependendo da cultivar utilizada. Infelizmente, há poucas fontes de resistência para várias das doenças existentes, estando essas freqüentemente em diferentes cultivares, pouco produtivos ou que não atendem às necessidades do mercado (Pio-Ribeiro e Assis Filho, 1997; Barreto, 1999).

Do ponto de vista das doenças causadas por fungos ou oomycetos, existe, atualmente, um grande número de espécies fitopatogênicas identificadas. Observa-se que sua importância está fundamentalmente relacionada à região, à forma de cultivo e à época de plantio. Neste grupo destacam-se: *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus & Moore causador da mancha-café; *Mycosphaerella cruenta* Lathan., (*Cercospora cruenta* (Sacc.) Deigton) e *Cercospora canescens* (Ellis e Martin) causador da mancha de cercospora ou cercosporiose; *Pythium aphanidermatum* (Eds.) Fiptz causador a podridão do colo; *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk. e *Rhizoctonia solani* (Kühn) causador da mela (*Elsinoe phaseoli* Jenk.) causador da sarna; *Entyloma vignae* Batista, Bezerra, Ontes & Vasconcelos causador do carvão; *Uromyces vignae* Berl. causador da ferrugem e o *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *tracheiphilum* E. F. Smith., Synd. & Hans causador da murcha-do-fusário-do-feijão-caupi (Rios, 1988; Athayde Sobrinho *et al.*, 2000; Athayde Sobrinho *et al.*, 2005).

Dentro do grupo de doenças bacterianas do feijão-de-corda dois grupos destacam-se como mais disseminados: a mancha bacteriana [*Xanthomonas campestris* pv. *vignicola* (Burkholder) Dye (*X. axonopodis* pv. *vignicola*)] e a pústula-bacteriana (*Xanthomonas* sp.). A pouca importância dada às bacterioses do feijão-caupi pode ser explicada pela dificuldade que o produtor encontra em identificar a doença quando ela se manifesta na semente e em plântulas (Rios, 1988). Poucos trabalhos têm sido

publicados e as razões para tal devem, provavelmente, estar relacionadas à importância econômica tipicamente regional destas bacterioses.

O feijão-caupi pode, ainda, ser hospedeiro de muitos nematóides. No Brasil, mais de 30 espécies patogênicas a esta cultura estão catalogadas, apresentando um elevado grau de patogenicidade. Apesar desse grande número, poucas causam danos significativos à produção, exceção feita aos nematóides-das-galhas do gênero *Meloidogyne*, principalmente *M. incognita* e *M. javanica*, que possuem extensa disseminação em toda área de cultivo do feijão-caupi, e aos nematóides-das-lesões-radiculares do gênero *Pratylenchus* e ao nematóide-reniforme da espécie *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira (Ponte, 1988; Freire-Filho *et al.*, 2005).

As galhas ou tumores exibidos pelas raízes constituem os sintomas característicos e principais da doença ocasionada por *Meloidogyne*. Essa alteração anatômica resulta da formação de sítios de alimentação do nematóide que ao penetrar com seu estilete nas células do cilindro central e parênquima cortical das raízes hospedeiras, secreta substâncias que induzem à mitose celular sem a correspondente citocinese, gerando células gigantes multinucleadas. O resultado deste complexo evento é o depauperamento da planta que absorve menos água e nutrientes, o que resulta em sintomas na parte aérea característicos de deficiência mineral acentuada, murcha nas horas mais quentes do dia, menor crescimento e queda da produtividade da planta (Silva, 2000; Andrade, 2003).

A galha-das-raízes é muito difícil de ser controlada em face da rápida disseminação, formação de estrutura de resistência (ovos) e um grande número de plantas hospedeiras. Algumas cultivares de caupi são dotadas de genes que lhes conferem resistência à maioria das espécies de *Meloidogyne* (Exemplos: Pitiúba, 40 dias e CE 315). Outras medidas de controle comumente usadas são: rotação de cultura, plantio de espécies antagônicas e nematicidas (como *Crotalaria* sp., *Tagetes* sp., *Chisantemun* sp.) e revolvimento do solo seguido de exposição direta dos raios solares (solarização) (Cardoso, 1990).

Em relação às respostas bioquímicas de defesa contra *M. incognita*, foi visto que a atividade quitinásica aumentou nas raízes, hipocótilos, epicótilos, folhas primárias e secundárias no cultivar resistente, CE-31, em relação ao cv. susceptível CE-109 (Andrade, 2003).

Além de todas as pragas presentes nas áreas de cultivo, esta cultura enfrenta sérios problemas quanto à sua conservação em armazéns. A principal ordem de insetos envolvida na contaminação dos grãos armazenados é a Coleoptera, com

destaque para as espécies pertencentes à família Bruchidae. As principais são: *Zabrotes subfasciatus* (Boh.), *Acanthoscelides obtectus* (Say), *Callosobruchus maculatus* (Fabr.), sendo esta última conhecida como caruncho ou gorgulho, reconhecida como a principal praga do feijão-de-corda armazenado (Sales *et al.*, 2005).

O caruncho possui cerca de 3 mm de comprimento e as fêmeas dessa espécie põem cerca de 80 ovos na superfície dos grãos. O ataque ao feijão-caupi começa ainda no campo. A fêmea introduz os ovos dentro da vagem, aproveitando-se de fendas. Ao eclodirem, as larvas penetram nas sementes e passam a se alimentar de seu conteúdo. Após cerca de 30 dias, as larvas se transformam em pupas e estas em adultos, que perfuram um orifício de saída e emergem das sementes danificadas reiniciando o ciclo biológico (Bastos, 1973; Quintela *et al.*, 1991).

No depósito de armazenamento, se não controlados, estragam as sementes, perfurando-as e conferindo-lhes sabor desagradável e mau aspecto comercial. A simples presença de ovos ou de insetos adultos, e até mesmo a constatação do odor característico que estes exalam, acarreta forte efeito restritivo sobre o consumo, com a conseqüente desvalorização comercial do produto (Bastos, 1973). Também estragam as sementes destinadas ao plantio, pois, se consomem as reservas alimentícias dos cotilédones, resultam em plântulas fracas e com baixa viabilidade; por outro lado, se roem as outras partes do embrião, impedem a germinação (Vieira, 1993).

O risco de infestação pelo inseto inibe as iniciativas de estocagem, tanto de grãos, no mercado atacadista, quanto de sementes, o que acentua a instabilidade de preços e restringe a possibilidade de incrementos de produtividade da cultura via difusão de cultivares melhoradas. Como os meios eficazes de controle, em geral, através de silos metálicos herméticos, envolvem custos elevados e dificultam o manuseio de grandes estoques, a utilização de resistência genética ao ataque do caruncho tem sido alvo de investigação científica, especialmente no que diz respeito à identificação de fontes de resistência. Tal resistência se apresenta como um benefício direto ao produtor, pela redução de perdas pós-colheitas, sem custos adicionais (Barreto e Quindaré, 2000).

O controle ideal desses fatores bióticos que contribuem de maneira significativa para a baixa produtividade do feijão-caupi no Nordeste como um todo, seria mediante ao emprego de variedades resistentes e com qualidade de grãos que atenda às demandas dos mercados interno e externo. Isto se dá mediante o desenvolvimento de programas de melhoramento genético, baseados em técnicas convencionais e/ou biotecnológicas, incluindo marcadores moleculares, através do mapeamento genético e

da seleção assistida por marcadores, que possibilitam a obtenção de genótipos superiores de maneira mais ágil e eficiente (Souza *et al.*, 2005).

Além de aumentos de produtividade e melhoria na qualidade dos grãos, uma variedade melhorada implicará em menor custo de produção, em função do reduzido emprego de defensivos agrícolas e redução de gastos com o manejo da cultura, aumentando, conseqüentemente, a renda líquida do produtor. Qualquer que seja o método escolhido, uma etapa imprescindível para a sua implementação é a identificação de fontes de resistência aos organismos que se deseja controlar (Lara, 1996; Kristjanson *et al.*, 2002).

2.1.5.2. Estresse Abiótico Provocado por Seca e Salinidade

Diversos fatores ambientais podem afetar o desempenho do feijão-caupi, tais como temperaturas muito baixas ou altas, bem como a seca. Fatores edáficos, como drenagem deficiente, salinidade, acidez e falta ou excesso de elementos nutritivos, também podem prejudicar o caupi.

A deficiência hídrica é uma das maiores causas de redução na produtividade agrícola (Blum, 1996; Yordanov *et al.*, 2003). O déficit hídrico afeta todos os aspectos relacionados ao desenvolvimento da planta, incluindo modificações anatômicas, morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, sendo que os prejuízos estão diretamente relacionados à sua duração, severidade e do estágio de desenvolvimento da cultura (Santos e Carlesso, 1998; Bezerra *et al.*, 2003). Leite *et al.* (1999), relataram que déficits hídricos ocorridos na fase vegetativa do feijão-caupi tiveram efeitos menores nos componentes de crescimento produzindo, porém, efeitos mais acentuados na fase reprodutiva, ou seja, na pré-floração e no enchimento de grãos.

A falta ou excesso de água, além de prejudicar diretamente o desenvolvimento da planta, afeta o processo de fixação biológica de nitrogênio. A planta apresenta estômatos altamente responsivos à redução de disponibilidade de água, fechando-se rapidamente, reduzindo a sua condutância estomática e, conseqüentemente, a sua transpiração foliar, permitindo assim, que o potencial hídrico e o teor relativo de água de suas folhas permaneçam elevados e aproximadamente constantes durante a imposição da seca. Logo, um de seus principais mecanismos em face do estresse tenta impedir a desidratação, embora isso resulte na diminuição de sua capacidade produtiva, principalmente quando o estresse é prolongado (Pinho *et al.*, 2005).

Vários mecanismos de adaptação para se desenvolver em um ambiente com quantidade limitada de água têm sido descritos no feijão-caupi. Dentre eles citam-se o desenvolvimento do sistema radicular e alta condutividade hídrica na raiz (para maximizar a captação de água); a redução da área foliar pelo decréscimo na condutância estomática, bem como mudanças na orientação dos folíolos (para minimizar as perdas de água) (Shackel e Hall, 1979; Summerfield *et al.*, 1985; Petrie e Hall, 1992; Costa *et al.*, 1997). Por outro lado, Gomes-Filho & Tahin (2002) observaram que em cultivares de feijão-caupi tolerantes à seca, como cv. Pitiúba, a deficiência hídrica no solo não acarretaria em reduções acentuadas no potencial hídrico foliar.

Além desta cultivar, a EPACE 10 foi recomendada por Pimentel *et al.* (2002) para uso em programas de melhoramento genético visando obtenção de resistência à seca, por apresentar alta tolerância protoplasmática.

Costa *et al.* (1997) conduziram estudos em casa de vegetação, com o objetivo de avaliar o efeito do déficit hídrico na produção, componentes de produção e distribuição de raízes no feijão-caupi. Os autores observaram reduções na área foliar, na matéria seca da parte aérea e das raízes, enquanto a relação raiz/parte aérea aumentou em três cultivares avaliadas. O aprofundamento do sistema radicular em resposta ao estresse hídrico também foi observado, mostrando-se menos superficial e com maiores concentrações a maiores profundidades, podendo ser entendido como importante mecanismo de adaptação para algumas espécies. Vale acrescentar, contudo, que as estimativas feitas por técnicos da Embrapa Arroz e Feijão, em 1981, em regiões produtoras de feijão-caupi dos estados do Piauí, do Ceará e de Pernambuco indicaram uma redução aproximada de 70% da safra decorrente de uma estiagem prolongada (Guimarães, 1988). Assim, verifica-se que, apesar de ser uma espécie relativamente adaptada à seca, esse fator climático ainda constitui um dos grandes obstáculos ao aumento da produtividade da cultura naqueles estados.

Além da disponibilidade hídrica, a salinização apresenta-se como um problema recorrente na agricultura. Aproximadamente 45 dos 230 milhões de hectares da área irrigada do globo terrestre apresentam-se afetados pela salinização, acarretando prejuízos na produção agrícola, principalmente nas regiões áridas e semi-áridas, onde 25% das áreas já se encontram salinizadas (FAO/AGL, 2007).

A salinidade em áreas irrigadas é consequência do uso de água de qualidade inadequada, associado à intensa evaporação e ao manejo inadequado do sistema solo-água-plantas. Qualquer que seja sua fonte, a água utilizada na irrigação sempre contém sais, embora a quantidade e a qualidade de sais presentes possam variar (Medeiros e

Gheyi, 1997; Dantas *et al.*, 2002). Além dos sais introduzidos pela água de irrigação, os solos podem conter sais cuja origem está associada à sua geoquímica. O excesso de sais solúveis provoca uma redução do potencial hídrico do solo, induzindo uma menor capacidade de absorção de água pelas plantas. Esta redução do potencial hídrico, associada aos efeitos tóxicos dos íons (Cl^- , por exemplo) interferem inicialmente no processo de absorção de água pelas sementes, influenciando na germinação, no vigor das plântulas e, conseqüentemente, no desenvolvimento normal das plantas (Rebouças *et al.*, 1989).

Os sintomas do estresse salino são muito parecidos com os encontrados no estresse hídrico, incluindo crescimento não uniforme e folhas de coloração amarelada, relativamente grossas e cerosas. Entretanto, quando a salinidade está em maiores concentrações no solo, a coloração torna-se amarronzada com regiões de necrose (Raí e Raí, 1999). A tolerância à salinidade difere entre espécies, entre cultivares e, para uma mesma cultivar, entre estádios do ciclo fenológico. Dependendo do grau de salinização do solo e do tipo de planta, esse tipo de estresse pode impedir a sobrevivência da cultura (Heenan *et al.*, 1988).

De modo geral, as plantas cultivadas são consideradas sensíveis ao excesso de sais, porém, é possível encontrar diferenças no grau de tolerância, as quais podem estar associadas às capacidades de extração de água e de sais do solo quando cultivadas em meios salinos. Desse modo, a identificação de espécies que apresentem maior extração de sais do solo pode ser um fator importante, contribuindo para o manejo do sistema solo-planta em ambientes salinos e, conseqüentemente, para a convivência com o problema da salinidade (Lacerda *et al.*, 2003).

Uma conseqüência da combinação da alta salinidade e imposição do estresse hídrico é a mobilização de vários genes para o controle e reparo dos danos causados pelo estresse (desintoxicação) e o controle do crescimento, podendo a expressão ser uma redução transitória da taxa de crescimento foliar, representando, assim, uma resposta adaptativa (Zhu, 2002). Outra adaptação à salinidade é a “suculência”, caracterizada pelo aumento da espessura foliar, visando evitar o déficit hídrico pelo melhor uso da água, reduzindo a concentração de sais no protoplasma (Greenway e Munns, 1980; Larcher, 2000). Um exemplo de adaptação aos efeitos do estresse salino e hídrico em feijão foi observado nos cultivares Pitiúba e Vita-3, os quais revelaram um aumento nos índices de esclerofilia e de suculência foliar (Costa *et al.*, 2003).

Como a resposta ao estresse salino é de natureza poligênica, o melhoramento não pode ser tratado como um problema de fácil solução. Com isso, não será apenas

extrapolando resultados positivos a partir de estudos em casa de vegetação e/ou campo, transferência ou super-expressão de um ou poucos genes que serão desenvolvidas plantas produtivas tolerantes à salinidade. Pelo contrário, um problema com tal complexidade só poderá ser enfrentado com o uso de diferentes metodologias associadas a diferentes áreas como a fisiologia, genômica, proteômica, genética e biologia molecular, entre outras, uma vez que o estresse abiótico envolve um conhecimento multidisciplinar (Hong-bo *et al.*, 2006).

2.1.6. Caracterização Genética

2.1.6.1. Marcadores Moleculares: Tipos, Importância e Aplicações

A utilização efetiva dos recursos genéticos disponíveis ao melhoramento genético requer um pleno conhecimento da diversidade genética pré-existente. Em um banco de germoplasma, informações precisas sobre alguns parâmetros são imprescindíveis, tais como: **a)** parentesco: grau de relacionamento entre os genótipos de um acesso ou entre acessos de uma população; **b)** estrutura: a quantidade de variação genética presente e sua distribuição entre indivíduos, acessos e coleções; **c)** localização: a presença de um gene desejado ou complexo gênico em um acesso específico (Kresovich *et al.*, 1995).

Existem muitas maneiras de verificar o grau de variabilidade genética existente em uma determinada espécie. O indicador mais simples desta variabilidade é a própria diversidade morfológica. Porém, características morfológicas podem ser influenciadas pelo ambiente, apresentando variação contínua e grande plasticidade, podendo não apresentar a real similaridade ou diferença entre os indivíduos. Logo, para a determinação mais precisa e segura da variabilidade genética, é necessário utilizar características não influenciáveis pelo ambiente. Neste sentido, as técnicas de biologia molecular permitem a observação de polimorfismos diretamente no genoma de um organismo (Zucchi, 2002; Weising *et al.*, 2004).

A estimativa da diversidade genética por marcadores moleculares, quando acompanhada de informações fenotípicas, vem sendo importante para a seleção de genótipos para o mapeamento genético. Isso porque permite a seleção de genótipos contrastantes e com níveis desejáveis de polimorfismo, que darão origem a populações de mapeamento segregantes para o caráter de interesse e seus respectivos

marcadores moleculares (Vieira *et al.*, 2005). Os marcadores moleculares são úteis, também, se levarmos em conta que durante o melhoramento, via de regra, são monitorados diversos tipos de genes, não somente aqueles envolvidos com a resistência aos estresses biótico e abiótico. Nesse contexto, é interessante dispor de uma ferramenta de seleção que possa ser utilizada de modo direto, pela simples análise da presença ou ausência de uma seqüência de DNA no genoma das plantas que estão sendo melhoradas (Alzate-Marin *et al.*, 2005).

Entre os principais marcadores moleculares utilizados na análise genética de plantas, destacam-se o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição), RAPD (*Random Amplified Polymorphism of DNA* – Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificados), SSR (*Simple Sequence Repeat* - Seqüências Simples Repetidas) e ISSR (*Inter Sequence Simple Repeat* – Regiões Internas de Seqüências Simples Repetidas) (Kumar, 1999). Todos esses tipos de marcadores possuem potencial para estudos genéticos básicos e/ou aplicados, respeitando-se as limitações de cada um. Existem ainda os marcadores isoenzimáticos (baseados em diferenças na mobilidade de enzimas proteínas) os quais vêm sendo utilizados desde a década de 60 (Ferreira & Grattapaglia, 1998). As isoenzimas forneceram importantes informações a respeito da estrutura do genoma, da variabilidade genética entre e dentro de espécies, da origem e dispersão de espécies cultivadas (Sakiyama, 1993). Entretanto, embora essa técnica seja superior a dos marcadores morfológicos, há limitações quanto ao número de polimorfismos gerados por marcadores isoenzimáticos motivo pelo qual estes têm sido gradualmente substituídos pelos marcadores baseados no DNA (Murphy *et al.*, 1996).

O marcador molecular DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*, ou Impressão Genômica da Amplificação do DNA) assemelha-se à técnica de RAPD, diferindo por apresentar maior concentração de *primer* usado na amplificação mediada pela DNA polimerase, bem como menor concentração de DNA molde por reação, tornando os resultados mais reprodutíveis. Eventualmente a técnica de DAF vale-se de iniciadores com tamanhos que podem variar de 8-, 10-, 12, 15- a 18-meros, além do uso de primers em grampo (*mini-hairpins*). Por ser baseada em uma reação altamente específica de PCR, por não usar radioatividade, por requerer pequena quantidade de DNA e por não necessitar de qualquer transferência física de material genético (sondas), a metodologia de DAF simplifica as análises genéticas (Caetano-Anollés *et al.*, 1991). Essa técnica tem sido aplicada com êxito na caracterização genética de

diversas culturas, incluindo leguminosas como a soja, o grão-de-bico e o amendoim (Caetano-Anollés *et al.*, 1991; Ferreira e Grattapaglia, 1998; Winter *et al.*, 2000; Benko-Iseppon *et al.*, 2003) revelando-se relativamente vantajosa quando comparada com o RAPD, notadamente por sua elevada reprodutibilidade e por gerar um grande número de polimorfismos (Benko-Iseppon *et al.*, 2003; Simon *et al.*, 2007).

Os microssatélites ou SSR consistem de seqüências de DNA repetidas em tandem. Estes marcadores são abundantes e uniformemente distribuídos pelo genoma de plantas, além de serem co-dominantes, multialélicos e com alta heterozigosidade (Zucchi, 2002). A técnica baseia-se na amplificação individual via PCR dos microssatélites, utilizando-se *primers* específicos complementares às seqüências únicas que flanqueiam as seqüências repetidas de microssatélites. Assim, a base do polimorfismo desses marcadores está relacionada à diversidade e abundância de seqüências repetidas (Wu e Tanksley, 1993; Ferreira e Grattapaglia, 1998). Devido ao elevado nível de polimorfismo que apresenta, os marcadores microssatélites vem sendo úteis na integração de mapas genéticos e físicos, proporcionando aos melhoristas e geneticistas uma ferramenta eficiente para associar variação genética e fenotípica (Milach, 1998; Gupta e Varshney, 2000).

Os marcadores ISSR são marcadores semi-arbitrários, gerados de reações de PCR com um *primer* único, desenhado a partir de regiões de microssatélite. Tais marcadores têm a vantagem de gerar grandes quantidades de bandas, sendo abundantes ao longo do genoma de eucariontes, evoluindo rapidamente (Fang e Roose, 1997; Esselman *et al.*, 1999). Assim, ISSRs mostraram-se úteis na avaliação de populações em estudos genéticos, na detecção da diversidade entre indivíduos proximamente relacionados e no mapeamento genético, sendo mais confiáveis que outras técnicas como RAPD (Wang *et al.*, 1998; MCGregor *et al.*, 2000; Raina *et al.*, 2001).

2.1.6.2. Marcadores Moleculares em Feijão-Caupi

Em feijão-caupi marcadores moleculares e isoenzimáticos têm sido utilizados na caracterização, na avaliação e no manejo de germoplasma, bem como na identificação de cultivares e no desenvolvimento de mapas genéticos para auxiliar nos processos de cruzamento e seleção, com ênfase para estudos visando o melhoramento de espécies cultivadas na Califórnia (Ehlers e Hall, 1997; Singh *et al.*, 2002).

De um modo geral, os estudos de diversidade genética em feijão-caupi apontam para uma estreita base genética em cultivares domesticadas (Panella e Gepts, 1992; Vaillancourt *et al.*, 1993). A perda de diversidade genética vem sendo atribuída, em parte, aos programas de melhoramento convencionais muitas vezes concentrados em cruzamentos usando determinadas cultivares mais produtivas ou resistentes (Wilkes, 1983). O monitoramento da variabilidade genética através de marcadores moleculares, dentro do *pool* de genes do material elite, poderá otimizar o acúmulo de alelos favoráveis e reduzir a quantidade de material a ser selecionado.

Alguns estudos com marcadores moleculares foram desenvolvidos objetivando, principalmente, analisar a relação filogenética entre as diversas espécies de *Vigna* (Fatokun *et al.*, 1993; Kaga *et al.*, 1996b; Menancio *et al.*, 1993; Maugham *et al.*, 1996; Mignouna *et al.*, 1998; Ajibade *et al.*, 2000); desenvolver mapas genéticos (Menancio *et al.*, 1993; Kaga *et al.*, 1996a; Maugham *et al.*, 1996; Menéndez *et al.*, 1997), ou ainda mapear genes que controlam características específicas, como resistência a doenças (Verdier *et al.*, 1998) e pragas (Myers *et al.*, 1996).

Marcadores isoenzimáticos foram testados por Pasquet (1996) para identificar a diversidade genética entre cultivares e formas silvestres de feijão-caupi, a fim de esclarecer a história de sua domesticação, sugerindo o nordeste da África como o centro de domesticação e *V. unguiculata* var. *spontanea* como o mais provável genitor do feijão-caupi. Sonnante *et al.* (1996) estudando o relacionamento filogenético entre *V. unguiculata* e outras espécies da seção *Vigna*, por meio de isoenzimas, concluiu que *V. unguiculata* estava mais proximamente relacionada a *V. vexillata* (L.) Richard do que das demais espécies de *Vigna* analisadas. Ajibade *et al.* (2000) utilizaram marcadores ISSR em 62 acessos de 18 espécies de *Vigna*, para estimar o grau de relacionamento filogenético dentro do gênero. Nesta análise, *V. reticulata* Hooker Fil. foi identificada como a espécie mais próxima de *V. unguiculata*.

Por sua vez, Menancio-Hautea *et al.* (1993) compararam *V. unguiculata* com *V. radiata* (L.) Wilczek, por meio de mapas genéticos construídos a partir de marcadores

RFLP, verificando que cerca de 90% das sondas utilizadas hibridizaram com fragmentos de ambas as espécies, sugerindo um alto grau de similaridade entre as seqüências de DNA. Ainda em relação à filogenia, Fatokun *et al.* (1993) utilizaram marcadores RFLP para avaliar 44 acessos de 18 espécies de quatro subgêneros de *Vigna*, encontrando alto nível de variação genética, especialmente nas espécies provenientes da África em comparação com aquelas originárias da Ásia. No entanto, ao contrário dos resultados obtidos por Ajibade *et al.* (2000) utilizando marcadores ISSR, os estudos com os marcadores RFLP não permitiram distinguir com clareza divisões acima do nível de espécie. Estudos similares ao de Fatokun *et al.* (1993), utilizando marcadores RAPD e envolvendo apenas *V. unguiculata* foram desenvolvido por Mignouna *et al.* (1998). Nesse trabalho, foram analisados 95 acessos de três grupos de cultivares de feijão-caupi provenientes de diferentes origens geográficas da África, da América e da Ásia, revelando alta diversidade entre os acessos estudados.

Simon *et al.* (2007) amostraram 262 *primers* com a técnica de DAF, dentre os quais 26 foram selecionados e recomendados por sua capacidade de gerar polimorfismos, em 85 acessos de germoplasma do *Vigna* (seis *V. angularis*, quatro de *V. mungo* e *V. radiata*, dois *V. umbellata*, um *V. aconitifolia* e 68 acessos de *V. unguiculata*). Os resultados distinguiram claramente os genótipos de feijão-caupi adaptados as condições brasileiras em comparação com aqueles originários da África. As espécies mais relacionadas foram agrupadas (*V. angularis* e *V. umbellata*; *V. mungo* e *V. radiata*). Os acessos de feijão-caupi ficaram mais próximos das subespécies de *V. unguiculata* (*unguiculata*, *sesquipedalis* e *cylindrica*). Os marcadores DAF foram bastante informativos no nível intraespecífico, detectando uma significativa diversidade entre cultivares de feijão-caupi.

No que concerne ao mapeamento de genes agronomicamente importantes, ou genes que controlam características de resistência a doença e pragas, o trabalho de Myers *et al.* (1996) ocupa papel de destaque. Nesse estudo foram cruzadas duas cultivares de feijão-caupi contrastantes para características de resistência ao pulgão *A. craccivora*, sendo utilizada a técnica de RFLP para detectar a presença de ligação entre o gene *Rac1*, de resistência a esse pulgão, e marcadores RFLP. Como resultado, foram encontrados um marcador RFLP (bg4D9b) intimamente ligado ao gene de resistência *Rac1* e vários marcadores flanqueando esse gene no mesmo grupo de ligação. A forte ligação entre o gene *Rac1* e o marcador bg4D9b levou Myers *et al.* (1996) a concluir que a clonagem do referido gene pode ser feita com sucesso e que a

seleção assistida por marcadores (S.A.M.) pode ser empregada para o desenvolvimento de cultivares resistentes ao pulgão.

Em relação a bacterioses, Verdier *et al.* (1998) utilizaram marcadores RFLP para caracterizar molecularmente diversas linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola* (Burkholder) Dye., isoladas de folhas de feijão-caupi em diferentes áreas geográficas. Os resultados das análises a partir dos RFLP sugeriram que a variação genética dessa bactéria foi independente do local de origem e da patogenicidade das linhagens.

Entre os primeiros estudos com marcadores com o gênero *Vigna* para desenvolvimento de mapas de ligação, estão os de Kaga *et al.* (1996a) e de Menéndez *et al.* (1997). No primeiro, o mapa genético foi desenvolvido a partir do cruzamento interespecífico (entre *V. angularis* e *V. nakashimae*), consistindo de 132 marcadores, dos quais 108 pela metodologia de RAPD, 19 de RFLP e cinco marcadores morfológicos, distribuídos em 14 grupos de ligação, com apenas 10 marcadores não ligados. O primeiro cruzamento intra-específico de feijão-caupi (*V. unguiculata*) usado na geração de um mapa genético foi desenvolvido por Menéndez *et al.* (1997). Os autores usaram as metodologias de RAPD, RFLP e AFLP para a saturação do mapa, observando que vários marcadores gerados eram monomórficos. No segundo, foram utilizadas como população de mapeamento 94 linhagens endogâmicas F8 resultantes do cruzamento entre duas linhagens melhoradas: 'IT84S-2049' (IITA-Nigéria) e '524B' (University of California, Riverside). Foram obtidos 181 marcadores dos quais, 133 RAPD, 19 RFLP, 25 AFLP, três marcadores morfológicos e um isoenzimático, os quais formaram 12 grupos de ligação e cobriram uma região de 972 cM, com uma distância média entre os marcadores de 6,4 cM.

Ouédraogo *et al.* (2002) geraram um novo mapa em feijão-caupi, usando uma população composta de 94 linhagens recombinantes empregadas por Menéndez *et al.* (1997) em F9, que gerou 11 grupos de ligação, cobrindo 2.670 cM do genoma dessa espécie, com uma distância média entre esses marcadores de 6,43 cM. O mapa gerado incluiu 242 marcadores, a maioria AFLP, associados a outros 181 marcadores (RAPD, RFLP e AFLP), bem como marcadores bioquímicos, já mapeados em estudos anteriores. Além do mapa em si, marcadores associados a várias características de resistência e/ou tolerância biológica, genes de resistência e análogos de genes de resistência, incluindo resistência a *Striga gesnerioides* raça 1 e 2, ao Cowpea Mosaic Virus (CPMV), ao Cowpea Severe Mosaic Virus (CPSMV), ao Blackeye Cowpea Mosaic Virus (BICMV), ao Southern Bean Mosaic Virus (SBMV), ao *Fusarium wilt*

(*Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphylum* (E.E. Smith) W.C. Snyder e H.N. Hansen) e ao nematóide-das-galhas (*Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood). Vale salientar, no entanto, que não existem até a presente data, mapas genéticos associados a marcadores moleculares desenvolvidos a partir de cruzamentos com cultivares brasileiros de feijão-caupi (Benko-Iseppon, 2001).

Não obstante as dificuldades apresentadas por genes marcadores morfoagronômicos, entende-se que a utilização de marcadores moleculares no estudo da divergência genética do feijão-caupi e também na identificação de parentais contrastantes pode colaborar nos avanços no melhoramento genético dessa cultura no nordeste brasileiro (Benko-Iseppon, 2001).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJIBADE, S.R.; WEEDEN, N.F.; CHITE, S.M. Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. **Euphytica**, Wageningen, v.111, n.1, p.47-55, 2000.

ALZATE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.D.L.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças com ênfase em feijão e soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 333-342, 2005.

AMARAL, J.A.B.; SILVA, M.T.; BELTRÃO, N.E.M.; MEDEIROS, A.M.T.; GUIMARÃES, C.L. **Zoneamento Agroclimático No Estado Da Paraíba Safra 2005/2006: Algodão Herbáceo, Feijão Caupi, Mamona, Sorgo**. Embrapa Algodão. 2005. 8p. (Embrapa Algodão, Campina Grande- PB, Comunicado técnico, 264).

ANDRADE, N. C. **Resistência do feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] à *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood: Aspectos anatômicos, Bioquímicos e Moleculares**. 2003, 151 f. tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

ANDRADE JÚNIOR, A.S.; RODRIGUES, B.H.N.; BASTOS, E.A. Irrigação. In: CARDOSO, M. J. (Org.) **A Cultura do Feijão Caupi no Meio-Norte do Brasil**, Teresina, Embrapa Meio-Norte, 2000. pp. 127-154 (Embrapa Meio-Norte. Circular Técnica, 28).

ARAÚJO, J.P.P.; RIOS, G.P.; WATT, E.E.; NEVES, B.P.; FAGERIA, N.K.; OLIVEIRA, I.P. de; GUIMARÃES, C.M.; SILVEIRA FILHO, A. **Cultura do caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp.** descrição e recomendações técnicas de cultivo. Goiânia : Embrapa-CNPAF, 1984. 82p. (Embrapa-CNPAF. Circular Técnica, 18).

ATHAYDE SOBRINHO, C.; VIANA, F.M.P.; SANTOS, A.A. Doenças do feijão caupi. In: CARDOSO, M. J. (Org.) **A Cultura do Feijão Caupi no Meio-Norte do Brasil**, Teresina, Embrapa Meio-Norte, 2000. pp. 157-183 (Embrapa Meio-Norte. Circular Técnica, 28).

ATHAYDE SOBRINHO, C.; VIANA, F.M.P.; SANTOS, A.A. Doenças Fúngicas e Bacterianas. In: FREIRE-FILHO, F. R.; LIMA, J. A. de A. (Ed.) **Feijão-caupi: Avanços Tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológicas, 2005. p.463-484.

BAUDOIN, J.P. and MARÉCHAL, R. Genetic diversity in *Vigna*. In: SINGH, S.R.; RACHIE, K.O. (Ed.) **Cowpea Research, Production and Utilisation**. Chichester, U.K.:John Wiley & Sons, 1985, p. 11-21.

BARRETO, P.D. Recursos genéticos e programa de melhoramento de feijão-de-corda no Ceará: Avanços e perspectivas. In: QUEIRÓS, M.A.; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Eds.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro**. EMBRAPA, CPATSA, Petrolina. 1999. Disponível em: www.cpatosa.embrapa.br/catalogo/livrorg/caupiceara.pdf . Acesso em: 05 out. 2007.

BARRETO, P.G.; QUINDERÉ, M.A. Resistência de genótipos de caupi ao caruncho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.4, p.779-785, 2000.

BASTOS, J.A.M. Avaliação dos prejuízos causados pelo gorgulho, *Callosobruchus maculatus*, em amostras de feijão-de-corda, *Vigna sinensis*, colhidos em Fortaleza, Ceará. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.8, n.7, p.131-132, 1973.

BENKO-ISEPPON, A.M. Estudos moleculares no caupi e em espécies relacionadas: Avanços e perspectivas. **Embrapa Documentos**, n.56, p.327-332, 2001.

BENKO-ISEPPON, A.M.; WINTER, P.; HÜTTEL, B.; MUEHLBAUER, F.J.; STAGGINUS, C.; KAHL, G. Pathogen-related sequences around *Fusarium* race 4 resistance locus in chickpea detected by DNA amplification fingerprinting (DAF). **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, p.350-359. 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 Univ.- UFRPE, 2005.

BEEVER, D. Os transgênicos e o futuro da agricultura. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n.15, p.4-7, 2000.

BEZERRA, F.M.L.; ARARIPE, M.A.E.; TEÓFILO, M.E.; CORDEIRO, L.G.; dos SANTOS, J.J. Feijão caupi e déficit hídrico em suas fases fenológicas. **Revista Ciência Agronômica**, v.34, n.1, p. 5-10, 2003.

BLUM, A. Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.20 , n.2, p.135-148, 1996.

BRESSANI, R.; ELIAS L.G. Nutritional value of legume crops for humans and animals. In: SUMMERFIELD, R.J.; BUNTING, A.H. **Advances in Legume Science**, England: Royal Botanic Gardens, n.1, p.135-155, 1980.

CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAM, B.J.; GRESSHOFF, P.M. DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.9, p.292-305, 1991.

CARDOSO, J.E. **Doenças do feijoeiro causadas por patógenos de solo**. Goiânia: Embrapa-CNPAP. 1990, 30 p. (Embrapa-CNPAP. Documentos, 30).

CASTRO, N.R. **Caracterização fisiológica de *Cercospora cruenta* Sacc. e controle genético de cercosporiose em caupi**. (Tese de Mestrado). 48 f. Recife. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2000.

CHIORATO, AF. **Divergência genética em acessos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) do banco de germoplasma do instituto agrônomo-IAC**. Campinas, 2004. 130p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Agrônomo IAC.

COSTA, C.L.; LIN, M.T., KITAJIMA, E.W., SANTOS, A.A.; MESQUITA, R.C.M.; FREIRE, F.R.F. *Ceratomyxa arcuata* (Oliv.) um crisomelídeo vetor do mosaico da *Vigna* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira** v.3, p.81-82, 1978.

COSTA, C.L.; BATISTA, M. de F. Viroses transmitidas por Coleópteros no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 4, n.2, p. 177-179, 1979.

COSTA, M.M.M.N.; TÁVORA, F.J.A.F.; PINHO, J.L.N.; MELO, F.I. O. Produção, componentes de produção, crescimento e distribuição das raízes de caupi submetido à deficiência hídrica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, n.1, p.43-50, 1997.

COSTA, P.H.A.; SILVA, J.V.; BEZERRA, M.A.; FILHO, J.E.; PRISCO, J.T.; FILHO, E.G. Crescimento e níveis de solutos orgânicos e inorgânicos em cultivares *Vigna unguiculata* submetidos à salinidade. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.26, n.3, p.289-297, 2003.

DANTAS, J.P.; MARINHO, F.J.L.; FERREIRA, M.M.M.; AMORIM, M. do S.; ANDRADE, S. I. de O.; SALES, A. L. de Avaliação de genótipos de caupi sob salinidade. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.6, n.3, p.425-430, 2002.

EHLERS, J.D.; HALL A.E. Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). **Field Crops Research**, Amsterdam, v.53, p.187-204, 1997.

ESSELMAN, E.J.; JIANQIANG, L; CRAWFORD, D.J.; WINDUSS, J.L.; WOLFE, A.D. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *Insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**, Edinburgh, v.8, p.443-451, 1999.

FANG, D.Q.; ROOSE, M.L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.95, p.408-417, 1997.

FAO/AGL Global Network on Integrated Soil Management for Sustainable Use of Salt-affected Soils. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spush/intro.htm>. Acesso em: 29 de novembro de 2007.

FARIS, D.G. The origin and evolution of the cultivated forms of *Vigna sinensis*. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, n.7, p.433-452, 1965.

FATOKUN, C.A.; DANESH, D.; YOUNG, N.D.; STEWART, E.L. Molecular taxonomic relationships in the genus *Vigna* based on RFLP analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.85, n.1, p.97-104, 1993.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2004**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2004. 546p.

FREIRE-FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q.; BARRETO, P.D.; SANTOS, C.A.F. Melhoramento genético do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) na região Nordeste. In: QUEIRÓS, M.A. de; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro**. Versão 1.0. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br>. Acesso em: 05 out. 2005.

FREIRE-FILHO, F.R. Cowpea taxonomy and introduction to Brazil. In: WATT, E. E.; ARAÚJO, J.P.P. **Cowpea research in Brazil**. IITA, EMBRAPA, Brasília, 1988. p.3-10.

FREIRE-FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q.; BARRETO, P.D.; SANTOS, A.A. Melhoramento Genético. In: FREIRE-FILHO, F.R.; LIMA, J.A. de A. (Ed.) **Feijão-caupi: Avanços Tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológicas, 2005. p.29-92.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

FERY, F.L. 2002. New opportunities in *Vigna*. p. 424–428. In: JANICK, J.; WHIPKEY, A. (eds.), **Trends in new crops and new uses**. ASHS Press, Alexandria, VA.

FONTES, J.R.A. **Desafios ao manejo de plantas daninhas na cultura do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris*) nas regiões Norte e Nordeste do Brasil**. 2006. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/pl1/index.htm>. Acesso em: 9/1/2008.

GHAFOOR, A.; SHARIF, A.; AHMAD, Z.; ZAHID, M. A.; RABBANI, M. A. Genetic diversity in blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper). **Field Crops Research**, n.69, p.183-190, 2001.

GUIMARÃES, C.M. Melhoramento e práticas culturais em caupi visando incrementar a resistência à seca. In: ARAÚJO, J.P.P.; WATT, E.E. (Org.). **O caupi no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa-CNPAF; Ibadan: IITA, 1988. p.285-302.

GOMES-FILHO, R.R.; TAHIN, J.F. Respostas fisiológicas de cultivares de caupi (*Vigna unguiculata*) eretos e decumbentes a diferentes níveis de irrigação. **Engenharia na Agricultura**, v.10, n.1-4, 2002.

GONÇALVES, M.F.B.; LIMA, J.A.A. Efeitos do "cowpea severe mosaic virus" sobre a produtividade do feijão-de-corda. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.7, n. 2, p.547, 1982.

GUPTA, P.K.; VARSHNEY, R. K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, v.113, p.163-185, 2000.

GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, v.31, p.149-190, 1980.

HE, G.; PRAKASH, C.S. Identification of polymorphic DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Euphytica**, v.97, p.143-149, 1997.

HEENAN, D. P. et al. Salinity tolerance in rice varieties at different growth stages. Australian. **Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v.28, p.343-349, 1988.

HONG-BO, S.; LI-YE, C.; CHANG-XING, Z.; QING-JIE, G.; XIAN-NA, L.; JEAN-MARCEL, R. Plant Gene Regulatory Network System Under Abiotic Stress. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 50, n. 1-2, p.1-9; 2006.

KAGA, A.; OHNISHI, M.; ISHII, T.; KAMAJIMA, O. A genetic linkage map of adzuki bean constructed with molecular and morphological markers using an interspecific population (*Vigna angularis* x *V. nakashimae*). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.93, n.56, p.658-663., 1996a.

KAGA, A.; TOMOOKA, N.; EGAWA, Y.; HOSAKA, K. and KAMIJIMA, O. Species relationships in the subgenus *Ceratotropis* (genus *Vigna*) as revealed by RAPD analysis. **Euphytica**, v. 88, p.17-24, 1996b.

KAGA, A.; OHNISHI, M.; ISHII, T.; KAMAJIMA, O. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for adzuki bean and its related genera. **Science Reports of Faculty of Agriculture Kobe University**. Japan, v.20, n.2, p.171-176, 1993.

KRESOVICH, S.; SZEWC-MCFADDEN, A.K.; BLIEK, S. M.; MCFERSON, J.R. Abundance and characterization of simple-sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.91, p.206 - 211, 1995.

KUMAR, L.S. DNA markers in plant improvement: an overview. **Biotechnology Advances**, v.17, p.143-182, 1999.

KRISTJANSON, P., TARAWALI, S., OKIKE, I., SINGH, B.B., THORNTON, P.K., MANYONG, V.M., KRUSKA, R.L., HOOGENBOOM, G. Genetically improved dual-purpose cowpea: assessment of adoption and impact in the dry savannah of West Africa. Impact Assessment Series No. 9. ILRI, Nairobi, Kenya, 2002. 67 pp.

LACERDA, C.F.; CAMBRAIA, J.; CANO, M.A.O.; RUIZ, H.A.; PRISCO, J.T. Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, p. 107-120, 2003.

LANGYINTUO, A.S.; LOWENBERG-DEBOER, J.; FAYE, M.; LAMBERT, D.; IBRO, G.; MOUSSA, B.; KERGA, 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**. 2ª ed. São Paulo: Ícone. 1991. 336p.

LARCHER, F.M. A planta sob estresse. In: MARTINS, D.R.; MARTINS, P.T. (Ed.) **Ecofisiologia Vegetal**. Rima, São Carlos, p. 321-354, 2000.

LEITE, M.L.; RODRIGUES, J.D.; MISCHAN, M.M.; VIRGENS FILHO, J.S. Efeitos do déficit hídrico sobre a cultura do caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], cv. EMAPA-821. II - Análise de Crescimento. **Revista de Agricultura**. Piracicaba, v.74, n.3, p.351-370, 1999.

LI, C.D., FATOKUM, C.A., UBI, B., SINGH, B.B., SCOLES, G. Determining genetic similarities among cowpea breeding lines and cultivars by microsatellite markers. **Crop Science**. v. 41, p.189-197, 2001.

LIMA, J.A.A.; SITTOLIN, I.M.; LIMA, R.C.A. Diagnose e estratégias de controle de doenças ocasionadas por vírus. In: FREIRE-FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; SILVA, P.H.S.; RIBEIRO, V.Q. (Eds.) **Feijão caupi: Avanços tecnológicos**. Embrapa Informação Tecnológica. 2005. pp.404-459.

LIMA, C.J.G.S.; OLIVEIRA, F.A.; MEDEIROS, J.F.; OLIVEIRA, M.K.T.; JÚNIOR, A.B.A. Resposta do feijão caupi a salinidade da água de irrigação. **Revista Verde**, v. 2, n. 2, p. 79-86, 2007.

MACHUKA, J.; ADESOYE, A.; OBEMBE, O.O. Regeneration and genetic transformation in cowpea. In: FATOKUN, C.A.; TARAWALI, S.A.; SINGH, B.B.; KORMAWA, P.M.; TAMO, M (Eds.) **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production**. Proceedings of the World Cowpea Conference III held at the International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadan, Nigeria. p.185-195, 2000.

MAIA, F.M.M.; OLIVEIRA, J.T.A.; MATOS, M.R.T.; MOREIRA, R.A.; VASCONCELOS, I.M. Proximate Composition, Amino Acid Content and Haemagglutinating and Trypsin Inhibiting Activities of Some Brazilian *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cultivars. **Journal of Science and Food Agriculture**, n.80, p.453-458, 2000.

MAIA, F. M. M., OLIVEIRA J.T.A., FREIRE-FILHO, F.R., GOMES, R.G.A., VASCONCELOS, I.M. Caracterização Bioquímica e Nutricional de Genótipos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. geneticamente melhorados e não melhorados In: **V Reunião Nacional de Pesquisas de Caupi**, 2001, Teresina. Teresina: Embrapa meio-Norte, 2001. p.13-18.

MARÉCHAL R.; MACHERPA J.M.; STAINER F. Étude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces de genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base des données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. **Boissiera**, n.28, p.1-273, 1978.

MAUGHAM, P.J.; SAGHAI-MAROOF, M.A.; BUSS, G.R.; Molecular-marker analysis of seed-weight: genomic locations, gene action, and evidence for orthologous evolution among three legume species. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.93, n.4, p.574-579, 1996.

MAY, P.H.; TEIXEIRA, S.M.; SANTANA, A.C. Cowpea production and economic importance in Brazil. In: WATT, E.E. and ARAÚJO, J.P.P **Cowpea research in Brazil** . IITA, EMBRAPA, Brasília. 1988. p.31-62.

MCGREGOR, C.E.; LAMBERT, C.A. ; GREYLING, M.M. ; LOUW, J.H. & WARNICH, L. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. **Euphytica**, v.113, p.135–144, 2000.

MEDEIROS, J.F.; GHEYI, H.R. Manejo do sistema solo-água-planta em solos afetados por sais. In: Gheyi, H.R.; Queiroz, J.E.; Medeiros, J.F. (eds.). **Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada**. Campina Grande: UFPB/SBEA, 1997. p.239-284.

MENANCIO, H.D.; FATOKUN, C.A.; KUMAR, L.; DANESH, D.; YOUNG, N.D. Comparative genome analysis of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) and cowpea (*Vigna unguiculata*(L.) Walp.) using RFLP mapping data. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.86, n.7, p.797-810, 1993.

MENÉNDEZ, C.M. HALL, A.E.; GEPTS, P. A genetic linkage maps of cowpea (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between two inbred, domesticated lines. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.95, n.8, p.1210-1217, 1997.

MIGNOUNA, H.D.; NG, N.Q.; IKEA, J.; THOTTAPILLY, G. Genetic diversity in cowpea revealed by random amplified polymorphic DNA. **Journal of Genetics & Breeding**, v.52, n.2, p.151-159, 1998.

MILACH, S.C.K. Mapeamento molecular de características de importância agronômica. In: MILACH, S.C.K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998. p.67-73.

MORAES, J.G.L.; VIEIRA, F.V.; COSTA, J.V.T.A. Suscetibilidade de genótipos de feijão-caupi ao ataque do manhoso. In: Congresso Nacional de feijão-caupi – CONAC e VI Reunião Nacional de Feijão-caupi, 2006, Teresina. **Tecnologias para o agronegócio: anais eletrônico [CD-ROM]**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2005, n.p. (Embrapa Meio-Norte.Documentos, 121)

MORETZSOHN MC, LEOI L, PROITE K, GUIMARÃES PM, LEAL-BERTIOLI SCM, GIMENES MA, MARTINS WS, VALLS JFM, GRATTAPAGLIA D, BERTIOLI DJ. A microsatellite-based, gene-rich linkage map for the AA genome of *Arachis* (Fabaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.111, p.1060-1071, 2005.

MURPHY, R.W.; SITES JUNIOR, J.W.; BUTH, D.G.; HAUFLER, C.H. Proteins I: isoenzyme eletrophoresis. In: HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. (Ed.) **Molecular Systematics**. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. p.51-69.

MYERS, G.O.; FATOKUN, C.A.; YOUNG, N.D. RFLP mapping of an aphid resistance gene in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Euphytica**, v.91, n.2, p.182-187, 1996.

NG, N. Q.; MARÉCHAL, R. Cowpea taxonomy, origin germplasm. In: SINGH, S. R.; RACHIE, K. O. (Ed.) **Cowpea research, production and utilization**. Chichester, U.K.: John Wiley & Son, 1985. p.11-21.

OLIVEIRA, I.P.; CARVALHO, A.M. A cultura do caupi nas condições de clima e solo dos trópicos úmidos de semi-árido do Brasil. In: ARAUJO, J.P.P.; WATT, E.E. (Org.) **O caupi no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa-CNPAF; Ibadá: IITA, 1998, p.63-96.

OUÉDRAOGO, J.T.; GOWDA, B.S.; JEAN, M.; CLOSE, T.J.; EHLERS, J.D.; HALL, A.E.; GILLASPLE, A.G.; ROBERTS, P.A.; ISMAIL, G.; BRUENING, G.; GEPTS, P.; TIMKO, M.P.; BELZILE, F.J. A improved genetic map for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) combining AFLP, RFLP, RAPD, biochemical makers end biological resistance traits. **Genome**, v.45, p.175-188, 2002.

PADUOSI S.; NG, N. Q. Origin, taxonomy and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SINGH, B. B.; MOHAN RAJ, D. R.; DASHIEL, K. E.; JACKAI, L. E. N. (Ed.) **Advances in cowpea research**, Tsukuba: IITA: JIRCAS, 1997. p.1-12.

PANELLA, L.; GEPTS, P. Genetic relationship within *Vigna unguiculata* (L.) Walp. based on isozymes analyses. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.39, p.71-88, 1992.

PASQUET, R.S. Cultivated cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp): Genetic organization and domestication. In: PICKERSGILL, B.; LOCK, J. (Eds) **Advances in legume. Systematics: legumes of economic importance**. Royal Botanic Gardens, Kew, v.8, p.101-108. 1996.

PAZ, C.D., LIMA, J.A.A.; PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, F.M.; ANDRADE, G.P.; GONÇALVES, M.F.B. Purificação de um isolado do vírus do mosaico severo do caupi, obtido em Pernambuco, produção de antissoros e determinação de fontes de resistência em caupi. **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 285-188, 1999.

PETRIE, C.L.; HALL, A.E. Water Relations in Cowpea and Pearl Millet Under Soil Water Deficits. II. Water Use and Root Distribution. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, Australia, v.19, n.6, p.591-600, 1992.

PIMENTEL, C.; SARR, B.; DIOUF, O.; ABOUD, A.C.Z.; ROY-MACAULEY, H. Tolerância protoplasmática foliar à seca, em dois genótipos de Caupi cultivados em campo. **Revista Universidade Rural**, Série Ciências da Vida, v.22, n.1, p.07-14, 2002.

PINHO, J.L.N. de; TÁVORA, F.J.A.F.; GONÇALVES, J.A. Aspectos Fisiológicos. In: FREIRE-FILHO, F.R.; LIMA, J.A. de A. (Ed.) **Feijão-caupi: Avanços Tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológicas, 2005. p. 193-210.

PIO-RIBEIRO, G. and ASSIS F.M.. Doenças do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: KIMARI, H., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres. 1997. pp. 233-244.

PONTE, J.J. Os nematóides do caupi e sua importância. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 11, p. 36-41, 1987.

PRINYAWIWATKUL, W.; MCWATTERS, K.H.; BEUCHAT, L.R.; PHILLIPS R.D. Cowpea flour: A potential ingredient in food products. **Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition**, n.36, p.413-436, 1996.

QUIN, F. M. Introduction. In: SINGH, B.B.; MOHAN RAJ, D.R.; DASHIEL, K.E.; JACKAI, L.E.N. (Ed.) **Advances in cowpea research**, Tsukuba: IITA: JIRCAS, 1997, p.9-15.

QUINTELA, E.D.; NEVES, B.D. das; QUINDERÉ, M.A.W.; ROBERTS, D.W. **Principales plagas del caupi en el Brasil**. Goiânia: Embrapa-CNPAF, 1991, 37 p. (Embrapa-CNPAF. Documentos, 35).

RAINA S.N.; RANI V.; KOJIMA T.; OGIHARA Y.; SINGH K.P.; DEVARUMATH R.M. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. **Genome**, v.44, n.5, p.763-772, 2001.

RAI, V.; RAI, A.K. Growth behaviour of *Azolla pinnata* at various salinity levels and induction of high tolerance. **Plant and Soul**, v. 206, p. 79-84, 1999.

REBOUÇAS, M.A.A.; FAÇANHA, J.G.V.; FERREIRA, L.G.R.; PRISCO, J.T. Crescimento e conteúdos N, P, K e Na em 3 cultivares de algodão sob condições de estresse salino. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.1, n.1, p.79-85, 1989.

RIOS, G.P. Doenças fúngicas e bacterianas do caupi. In: ARAÚJO, J.P.P.; WATT, E.E. (Eds.). **O Caupi no Brasil**. Brasília: IITA/EMBRAPA, 1988. p.547-589.

RIOS, G.P. **Principais doenças do caupi no Brasil**. Goiânia: Embrapa-CNPAF, 1990. 40p. (Documentos, 29).

ROCHA, M.M.; LIMA, J.A.A.; FREIRE-FILHO, F.R.M.; ROSAL, C.J.S. and LOPES, A.C.A. Resistência de genótipos de caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) de tegumento branco a isolados de vírus das famílias Bromoviridae, Comoviridae e Potyviridae. **Revista Ciência Rural** v. 8, p. 85-92, 2003.

SAKIYAMA, N.S. Marcadores moleculares e as hortaliças. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.1, n.2, p.204-206, 1993.

SALES, M.P.; ANDRADE, L.B.S.; ARY, M.B.; MIRANDA, M.R.A.; TEIXEIRA, F.M.; OLIVEIRA, A.S.; FERNANDES, K.V.S.; XAVIER-FILHO, J. Performance of bean bruchids *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) reared on resistant (IT81D-1045) and susceptible (Epace 10) *Vigna unguiculata* seeds:

Relationship with trypsin inhibitor and vicilin excretion. **Comparative Biochemistry and physiology- Part A: Molecular Integrative Physiology**, v.142, n.4, p.422-426, 2005.

SANTALLA, M.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Genetic diversity in mung bean germoplasm revealed by RAPD markers. **Plant Breeding**, v.17, p.473-478, 1998.

SANTOS, R.G.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.2, n.3, p.287-294, 1998.

SANTOS, C.A.F.; ARAÚJO, F.P.; MENEZES, E.A.; Comportamento produtivo de caupi em regimes irrigados e de sequeiro em Petrolina e Juazeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.11, p.2229-2234, 2000.

SHACKEL, K.A.; HALL, A.E. Reversible leaflet movements in relation to drought adaptation of cowpeas, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v.6, p.265-276, 1979.

SILVA, G.S. Ocorrência e controle de fitonematóides no feijão-caupi no Meio-Norte do Brasil. In: CARDOSO, M.J. (Org.). **A cultura do feijão-caupi no Meio-Norte do Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2000. p. 229-336 (Embrapa Meio-Norte. Circular Técnica, 28).

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.; TARAWALI, S.A.; SINGH, B.B.; KORMAWA, P.M.; TAMO, M. (Eds) **Challenges and Opportunities for Enhancing Sustainable Cowpea Production**. International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria, 2002, pp 22-40.

SINGH, B.B.; AJEIGBE, H.A.; TARAWALI, S.A.; FERNANDEZ-RIVERA, S. and ABUBAKAR, M. Improving the production and utilization of cowpea as food and fodder. **Field Crops Research**, v.84, n. 1-2, p.169-177, 2003.

SMARTT, J. Evolution of genetic resources. In: SMARTT, J. (Ed.), **Grain Legumes**. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 140-175, 1990

STEELE, W.M.; MEHRA K.L. Structure, evolution and adaptation to farming System and environment in *Vigna*. In: SUMMERFIELD, D. R.; BUNTING, A. H. (Ed.). **Advances in Legume Science**, England: Royal Botanic Gardens, 1980. p.459-468.

SONNANTE, G.; PIERGIOVANNI, A.R.; NG, Q.N.; PERRINO, P. Relationships of *Vigna unguiculata* (L.) Walp., *V. vexillata* (L.) Rich. and species of section *Vigna* basead on isozyme variation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.43, p.157-165, 1996.

SOUZA, I. da S.; FREIRE-FILHO, F.R.; LOPES, A.C. de A.; ROCHA, M. de M.; RIBEIRO, V.Q.; GOMES, R. L. F.; RÊGO, M. de S. C. Determinação da taxa de fecundação cruzada em feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. In: Congresso Nacional de feijão-caupi – CONAC e VI Reunião Nacional de Feijão-caupi, 2006,

Teresina. **Tecnologias para o agronegócio**: anais eletrônicos [CD-ROM]. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2005, n.p. (Embrapa Meio-Norte. Documentos, 121).

SOUZA, V.A.B. & SANTOS, C.A.F. Biotecnologia. In: FREIRE-FILHO, F.R.; LIMA, J.A. de A. (Ed.) **Feijão-caupi: Avanços Tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológicas, 2005. p.95-156..

SUDUPAK, M.A. Inter and intra-species Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) variations in the genus *Cicer*. **Euphytica**, v.135, p.229-238, 2004.

SUMMERFIELD, R.J.; PATE, J.S.; ROBERTS, E.H.; WIEN, H.C. The physiology cowpea. In: SINGH, S.R.; RACHIE, K.O. (Eds.). *Cowpea research, production and utilization*. **Chichester**: John Wiley, 1985. p.66-101.

TÉOFILO, E.M.; MAMEDE, F.B.; SOMBRA, N.S. Hibridação natural em feijão-caupi. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.4, p.1011-1012, 1999.

TEÓFILO, E. M.; PAIVA, J. B.; MEDEIROS FILHO, S. Polinização artificial em feijão caupi. (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25 n. 1, p. 220-223, 2001.

TIMKO, M.P.; SINGH, B.B. Cowpea, a Multifunctional Legume. In: MOORE, P.H.; MING, R. (Eds.) **Genomics of Tropical Plants** (Plant Genetics and Genomics: Crops and Models). Springer, v. 1, pp. 227-258, 2008.

UMAHARAN, P.; ARIYANAYAGAN, R.P.; HAQUE, S.Q. Resistance to *cowpea severe mosaic virus*, determined by three dosage dependent genes in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Euphytica**, v. 95, p. 49-55, 1996.

VAILLANCOURT, R.E.; WEEDEN, N.F.; BARNARD, J. Isozyme diversity in the cowpea species complex. **Crop Science**, v.33, p.606-613, 1993.

VALENZUELA, H.; SMITH, J. Cowpea. In: **Sustainable Agriculture Green Manure Crops**. Cooperative Extension Service, College of Tropical Agriculture & Human resources, University of Hawai'i Mānoa. SA-GM-6, p.1-3, 2002.

VERDIER, V.; ASSIGBETSE, K.; GOPAL-KHATI, C.; WYDRA, K.; RUDOLPH, K.; GEIGER, J.P.; Molecular characterization of the incitant of cowpea bacterial blight and pustule, *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola*. **European journal of Plant Pathology**, v.104, n.6, p.595-602, 1998.

VIEIRA, R. F.; VIEIRA, C.; RAMOS, J. A. O. **Produção de sementes de feijão**. Informe Técnico. Viçosa: EPAMIG, 1993. 31p

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.

VIEIRA, E.A.; ZIMMER, P.D.; OLIVEIRA, A.C. de; CARVALHO, F.I.F. de; MALONE, G.; BENIN, G. Emprego de modelos gráficos na seleção de genitores de milho para hibridização e mapeamento genético. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.5, p.986-994, 2005.

WANG, G.; MAHALINGAM, R.; KNAP H.T. (C-A) and (G-A) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in soybean, *Glycine max* (L) Merr. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, n.8, p.1086-1096, 1998.

WATT, E. E. **First annual report on the EMBRAPA/IITA - Cowpea Program in Brasil**. Goiânia, EMBRAPA-CNPAP, 1978. 55p.

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; KAHL, G. DNA fingerprinting in plants. **Boca Raton**, USA. 2004. 322 p.

WETZEL, M.M.V.S.; FAIAD, M.G. Germoplasma de caupi: coleta, conservação e intercâmbio. In: **V REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISAS DE CAUPI**, 2001, Teresina. Teresina: Embrapa meio-Norte, 2001. p.312-315.

WETZEL, M.M.V.S.; FREIRE, M.S.; FAIAD, M.G.; FREIRE, A. de B. Recursos genéticos: Coleção Ativa e de Base. In: FREIRE-FILHO, F. R.; LIMA, J. A. de A. (Ed.) **Feijão-caupi: Avanços Tecnológicos**. 1 ed., Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológicas, 2005. p.159-190.

WILKES, G. **Current status of crop plant germplasm**. CRC Critical reviews in Plant Science, v. 1, p. 133–181, 1983.

WINTER, P.; BENKO-ISEPPON, A.M.; HÜTTEL, B.; RATNAPARKHE, M.; TULLU, A.; SONNANTE, G.; PFAFF, T.; TEKEOGLU, M.; SANTRA, D.; SANT, V.J.; RAJESH, P.N.; KAHL, G.; MUEHLBAUER, F.J. A linkage map of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome based on recombinant inbred lines from a *C. arietinum* x *C. reticulatum* cross: localization of resistance genes for *Fusarium* wilt races 4 and 5. **Theoretical and Applied Genetics**, v.101, p.1155-1163, 2000.

WU, K.S.; TANKSLEY, S.D. Genetic and physical mapping of telomeres and microsatellites of rice. **Plant Molecular Biology**, v. 22, p. 861-872, 1993.

YORDANOV, I.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T. Plant responses to drought and stress tolerance. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, p.187-206, 2003.

ZHU, J.K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 247-273, 2002.

ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. Piracicaba, 2002. 130p. Tese (Doutorado) – Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

Manuscript

MICROSATELLITES, ISSR AND DAF MARKERS TO STUDY GENETIC RELATIONSHIPS AMONG *VIGNA* SPECIES, WITH EMPHASIS ON CONTRASTING COWPEA (*V. UNGUICULATA* L. WALP.) GENOTYPES

**To be submitted to the journal
GENETIC RESOURCES AND CROP EVOLUTION
Springer Netherlands**

A. V. Onofre · L. L. B. Amorim · V. Pandolfi · A. M. Benko-Iseppon

**MICROSATELLITES, ISSR AND DAF MARKERS TO STUDY GENETIC RELATIONSHIPS
AMONG *VIGNA* SPECIES, WITH EMPHASIS ON CONTRASTING COWPEA (*V.
UNGUICULATA*) GENOTYPES**

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, CCB, Genética
Av. Prof. Moraes Rego, s/no. 50732-970, Recife – PE, Brazil

Corresponding Author:

Ana Maria Benko Iseppon

E-mail: ana.benko.iseppon@pesquisador.cnpq.br

Telephone: 55-81-2126-8520

Fax: 55-81-2126-8522 or 8569

Abstract

Despite the importance of cowpea and related *Vigna* cultispecies, few data is available about the relationships between different taxa, as well as regarding important sources of resistance against biotic and abiotic stresses. The presented study aimed to access the genetic diversity among 23 cowpea (*V. unguiculata*) accessions as compared with six selected *Vigna* taxa and common bean as outgroup. For this purpose three approaches have been used, including 20 SSR (Simple Sequence Repeat), 22 ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) and four DAF (DNA Amplification Fingerprinting) reactions, generating 945 polymorphic bands. Besides clear separation from its relatives (*V. aconitifolia*, *V. angularis*, *V. mungo* and *V. radiata*), cowpea accessions could be clearly distinguished from native *V. unguiculata* subspecies (ssp. *cylindrical* and *sesquipedalis*) with high bootstrap value (100%). Also within cowpea genotypes considerable levels of polymorphism could be detected revealing contrasting parental candidates for biotic and abiotic resistance features with significant diversity.

Key words: cowpea, molecular markers, germplasm, crop evolution.

INTRODUCTION

The legume genus *Vigna* was proposed by Savin in 1824 and comprises around 170 species classified into seven subgenera distributed in Africa, America, Asia, Australia and the Pacific (Onwueme and Sinha 1991; Tomoka et al. 2002). Two of these subgenera have been classified by centers of origin: African *Vigna* species (*Vigna* group) and Asian *Vigna* species (*Ceratotropis* group). It contains several important cultivated species, including cowpea [*V. unguiculata* (L.) Walp.], mung bean [*V. radiata* (L.) Wilczek], black grain [*V. mungo* (L.) Hepper], moth bean [*V. aconitifolia* (Jacq.) Maréchal], adzuki bean [*V. angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi], and rice bean [*V. umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi]. Among these, cowpea is of greatest economic importance, yet this species also appears to be one of the most isolated within the genus with a poorly defined secondary gene pool (Pasquet 1996; Fery 2002).

The economic important *Vigna* species exhibit a number of attributes that make them particularly valuable for inclusion in different cropping systems. They can be grown successfully in extreme environments (e.g., high temperatures, low rain fall, poor and narrow soils) with few economic inputs. Many of these species produce multiple edible products, providing subsistence farmers with a fresh food supply throughout the growing season as well as dry seeds that are easy to store and transport. Plant residual biomass can be used as fodder for farming animals. *Vigna* food products exhibit many excellent nutritional attributes and provide the necessary complement in diets comprised mainly of roots, tubers, or cereals (Fery 2002).

Worldwide, an estimated area under cowpea is about 14 million hectares, from which central and west Africa alone account for over 69% of the area (with about 9.6 million ha, followed by about 2.4 million ha in central and southern America, 1.3 million ha in Asia, and about 0.8 million ha in eastern and southern Africa). Nigeria is the largest cowpea producer accounting for about 4 million ha with 1.7 million tones, followed by Brazil which produces 1.9 million ha annually with 0.7 million tones (Singh et al. 1997; Langyintuo et al. 2003).

In North and Northeast Brazilian regions, cowpea is a legume representing about 80% of the total grain production for human feeding, used as green vegetable or dry beans, nurturing approximately 25 million people (Bressani 1993).

Despite its importance, cowpea cannot approach its full potential, unless several serious problems are solved. Among these are diseases caused by viruses and root-

knot nematodes, bruchid attack of stored grain, sensitivity to drought and salinity soils, where decrease on growth rate and productivity has been observed especially regarding the most productive cultivars. Because no single cultivar is suitable for all conditions, there is a need to develop cultivars with different attributes and resistance to major biotic and abiotic constraints, to suit the specific needs of different regions and cropping systems. Considerable research efforts have been expended on these problems using conventional breeding methods with little success. Therefore, new technologies must be developed and employed.

Cowpea breeding program needs also to develop robust sets of genetic markers for accurately assessing genetic diversity in the course of selection programs, germplasm evaluations and planning of crosses. In the context of crop improvement, information about genetic variation in germplasm arrays and genetic relationships between genotypes provides the basis for decision support regarding selection of parental combinations that will maximize selection gain and maintenance of genetic diversity (Jana 1999).

DNA markers have proved to be valuable in crop breeding, especially in studies regarding genetic diversity and gene mapping. Microsatellite associated markers, as SSR (Simple Sequence Repeat), ISSR (Inter-Sequence Simple Repeat) and also DAF (DNA Amplification Fingerprinting), are potential marker systems in *Vigna* for fingerprinting cultivars and for estimating genetic distances among cowpea relatives, potential parents and germplasm accessions, as well as for assessing phylogenetic relationships.

Microsatellites (SSR) are simple tandemly repeated di- to tetra-nucleotide sequence motifs flanked by unique sequences. Markers associated with SSR regions have been used in plants due to its higher reproducibility, evolutionary neutrality and codominant behavior. Although the primers for amplification are species-specific, these sometimes are transferable to related organisms with similar specificity (Winter and Kahl 1995; Winter et al. 2000).

Archana and Jawali (2007) carried out an additional germplasm evaluation using microsatellites polymorphisms in order to characterize wild and cultivated taxa of *V. unguiculata* originated from different eco-geographical locations. The results of the data analysis revealed a large amount of intersubspecies variability within *V. unguiculata* species.

The DAF method is comparable to RAPD (Welsh and McClelland 1990), employing less DNA (0.1 to 1 ng/μl) and much high primer concentration (up to 100 mM) (Caetano-Anollés et al. 1991) leading to more specific and reproducible reactions.

In a recent study Simon et al. (2007) optimized DAF to estimate the genetic diversity in a representative core collection of *Vigna* species. Despite of supposed narrow genetic base of domesticated cowpea, the results distinguished Brazilian from African *V. unguiculata* genotypes and revealed considerable levels of variability within the main Brazilian germplasm resources.

Inter simple sequence repeat marker is a simple, cost-efficient marker and does not require prior sequence knowledge, similar to DAF technology. Unlike DAF, ISSR markers are detected using relatively longer semi-arbitrary primers to amplify DNA sequences between two inverted SSR at high stringency PCR conditions; thus, they are reproducible and highly polymorphic DNA markers (Zietkiewicz et al. 1994; Bornet and Branchard 2001). The utility of ISSR DNA polymorphisms to distinguish taxa within the genus *Vigna* was investigated by Ajibade et al. (2000).

These tree types of markers can be used in mapping and gene tagging. The concept of molecular marker-assisted selection (MAS) is attractive to cowpea breeders working to improve biotic and abiotic resistance for accessions adapted to the Northeastern Brazilian region. For successful application of MAS, a high correlation and/or tight linkage must exist between biotic or abiotic resistance and the molecular markers that must be stable, reproducible, and easy to assay (Yu et al. 2004). Unfortunately, only a limited number of molecular markers have been developed and used for marker-assisted selection in cowpea.

The purpose of this study was to develop polymorphic molecular markers using SSR, ISSR and DAF methods to determine the level of genetic diversity among cowpea (*V. unguiculata*) accessions. For this mean, 23 selected genotypes were compared to six selected *Vigna* taxa using common bean as out-group. Besides, this approach intended to identify contrasting parental lines to generate segregating populations for features including tolerance or resistance to biotic and abiotic stresses

MATERIAL AND METHODS

Plant material and DNA extraction

In this study 29 genotypes of seven different *Vigna* subspecies were analyzed. These comprised 25 accessions the African subgenus *Vigna*: (23 *V. unguiculata* and two subspecies *cylindrica* and *sesquipedalis*) and also a single accession of each of the four species the Asian subgenus *Ceratotropis* (*V. aconitifolia*, *V. angularis*, *V. mungo* and *V. radiata*). Additionally, two cultivars (cv. Neckarkönigin and Delinel) of *Phaseolus vulgaris* L. ssp. *vulgaris* were employed as outgroup for the phylogenetic analysis (Table 1).

The plants were cultivated in pods with 5 kg soil capacity containing a mixture of two parts of soil and one part of manure. Prior to their sowing the seeds have been disinfected with 0.4% sodium hypochlorite. After germination four plants per pod have been maintained, which remained in the glasshouses until their processing.

DNA was isolated from young leaflets using a CTAB (cetyl-trimethylammoniumbromide) protocol (Weising *et al.*, 1995), with modifications described by Benko-Iseppon *et al.* (2003). Contaminating polysaccharides were selectively precipitated (Michaels *et al.* 1994). DNA concentrations were determined electrophoretically in agarose gel 1.2% using known amounts of phage λ -DNA as a reference.

DAF and ISSR analysis

The DAF reactions occurred according to Benko-Iseppon *et al.* (2003), using 5 ng of genomic DNA, 1.5 μ l 10x PCR buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 2.5 mM dNTP-mix (Fermentas), 50 pmol primer (Operon Technologies) and 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas). The final volume was adjusted to 15 μ l with bidestilled sterile H_2O . The DNA was first denatured for 2 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s denaturation at 95°C; 1 min annealing at 35°C and 2 min elongation at 72°C, with a final elongation at the same temperature for 2 min.

The ISSR reactions contained 15 ng of genomic DNA, 2.0 μ l 10x buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 200 μ M of each dNTP (Fermentas), 50 pmol primer and 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Biotherm), with final volume adjusted to 20 μ l with bidestilled sterile H_2O . The reaction included an initial denaturation step of 4 min at 94°C, followed by 30

cycles, each consisting of a denaturation step of 30 s at 94°C, annealing of 1 min at 50.4 to 60.5°C depending on the primer and an extension of 2 min at 72°C. PCR was terminated with a final extension period of 7 min at 72°C. Both DAF and ISSR reaction products were separated on 1.8% and 2.0% horizontal agarose gels respectively, in TBE buffer with a voltage of 5 V/cm and visualized under ultraviolet light after staining in 0,5 µg/ml ethidium bromide. A DNA ladder 100pb (New England Biolabs or Fermentas) was used as a molecular weight standard. Digital photo documentation was taken for each gel.

For DAF reactions four random decamer primers were used. For the ISSR reactions, twenty-two primers previously selected from previous evaluations on cowpea and other legume species [chickpea (Ratnaparkhe et al. 1998; Rao et al. 2007); cowpea and related species (Ajidabe et al. 2000), blackgram (Souframanien and Gopalakrishna 2004) and common bean (Svetleva et al. 2006)] were chosen and ordered from MWG-Biotech (Table 2).

SSR analysis

Twenty primer pairs were used to assess the transferability and the level of polymorphism among cowpea cultivars and its related species (Table 3). Of these, nine SSR primer pairs were developed by Li et al. (2001) with microsatellite-enriched libraries of cowpea, six were developed by Wang et al. (2004) using (AG)_n-SSR-enriched library in *V. angularis* and five were designed by Gwag et al. (2006) with microsatellite-enriched libraries of *V. radiata*.

Reactions were carried out at a final volume of 20 µl, including 2.5 µM MgCl₂, 200 µM dNTP-mix (Fermentas), 30 ng of genomic DNA and 0.5 U *Taq* of DNA polymerase (Fermentas).

Reactions using primers developed by Li et al. (2001) and Gwag et al. (2006) included 10 pmol of each forward and reverse primer, with an initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 38 cycles of denaturing at 94°C for 1 min; annealing segment at 54 to 60°C (depending on the primer) for 30 s and extension at 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 5 min.

For the reactions using primers design by Wang et al. (2004) 5 pmol each of forward and reverse primers was used. The temperature cycling profile involved an

initial denaturation step of 2 min at 94°C. This was followed by 30 cycles of 94°C for 15 s, an annealing phase of between 68°C for 15 s, and an extension at 68°C for 5 min.

All PCR reactions were carried out in an Eppendorf Mastercycler Gradient thermal cycler.

The amplified products were separated on 6% non-denaturing polyacrylamide gels run in TBE (Tris-base, boric acid, EDTA) buffer and stained with silver nitrate for 20 min. A DNA ladder 100pb (New England Biolabs or Fermentas) was used as a molecular weight standard.

Genetic diversity analysis

After polymorphism analysis two data matrixes (SSR or DAF/ISSR) were constructed based in polarized data (presence/absence of bands in each genotype) viewed in the agarose and polyacrylamide gels.. Phylogenetic analysis of the microsatellite, ISSR and DAF data was performed using the program MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis), Version 4 for Windows, kindly provided by the authors (Tamura et al. 2007), using neighbor-joining method (bootstrap analysis, 1000 replicates). Additionally, cluster analysis based on Dice similarity coefficient matrix was carried out using the unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA) and sequential, agglomerative, hierarchical and nested (SAHN) analysis to group all the studied genotypes using NTSYS-pc 2.1 software (Rohlf 2000).

RESULTS

Figures 1a, 1b and 2 show representative pictures regarding the electrophoretic pattern of fragments generated by DAF, ISSR and microsatellite analysis respectively.

A total of 1065 bands were obtained using DAF, ISSR and microsatellite methodologies. Of the 1065 bands, 120 were from the genus *Phaseolus* and 945 were from the genus *Vigna*. All 46 primers used in this study generated polymorphic bands among the *Vigna* species.

The screening with 22 ISSR primers generated 729 scorable band classes, among which 641 comprised polymorphic markers for *Vigna*. The number of polymorphic bands at the intraespecific level in *V. unguiculata* produced by a single primer varied from one (ISSR 810) to seventeen (ISSR 888), with an average frequency of 5.6 polymorphic bands per primer. Five (ISSR 826, 866, 840, 811, 885) out of 22 ISSR primers produced monomorphic profiles in cowpea (Table 2). In a general way, primers containing AC or AG repeats provided enough polymorphism, except in case of ISSR 826 [(ACA)₅ CC].

Four DAF primers that generated reproducible, informative and easily scrabble DAF profiles were preselected. These primers produced multiple band profiles (Figure 1) with 161 bands, revealing 148 polymorphisms for *Vigna*. The number of polymorphic bands generated by a single primer varied from 28 to 47 among *Vigna* species, and from 6 to 21 (with an average of 16) at the intraspecific level among cowpea accessions. In particular, primers OP-G06 and OP-K14 produced the largest number of bands (52 and 44, respectively), while primer OP-G06 detected the highest level of interspecific and intraespecific polymorphism (Table 3).

Using the SSR methodology with 20 primer pairs, a total of 175 polymorphisms were detected, 89 at intraspecific and 156 at interspecific level (Table 4). Polymorphisms detected per primer pair varied from 3 to 13 alleles with an average of 4.0 alleles at the intraspecific level.

Considering all nine microsatellite primer-pairs developed by Li *et al.* (2001) for cowpea, five SSR primer-pairs (VM 10, VM 36, VM 31 and VM 37) could be successfully amplified in the present evaluation (Table 5), even after reprobation. For six microsatellite primers-pairs designed by Wang *et al.* (2004), only three amplified (CEDG043, CEDG026 and CEDG015) in all accessions (Table 6). However, considering the five primers developed by Gwag *et al.* (2006), only two (GBssr-MB14 and GBssr-MB41) presented no amplification in all accessions (Table 7).

The similarity matrices resulting from the combined DNA markers data were performed to generate correct relationships based on large and different genome regions. The trees generated after data matrix analysis are presented in Figure 3 (using MEGA program, Neighbor-joining analysis, with bootstrap function, 1000 replicates) and in Figure 4 (NTSYS program UPGMA analysis).

In both evaluations, the cultivated cowpea grouped closely with the wild subspecies of *V. unguiculata*, and the entire species was clearly separated but most closely allied to *V. angularis*. The subgenus *Ceratotropis* appears on the phenogram

separately as basally, with one species (*V. aconitifolia*) in a basal position from which two other clusters emerged including all accessions of the subgenus *Vigna* (*V. unguiculata*) and species *V. radiata*, *V. mungo* and *V. angularis*.

Considering the cowpea (*V. unguiculata*) four accessions (IT85F2687, IT86D7161, TVU 382 and TVU 379) originally sent from IITA to Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte (CPAMN, Brazil) (Table 1) appear in a basal position. The IITA genotype IT81D 1053 and the Brazilian accessions CE 315, BR9 Longa, CE31 and TE9628222G are at the basis of all Brazilian cultivars.

DISCUSSION

Both branching and distribution of genotypes on the dendrograms generated after neighbor joining and UPGMA (Dice) analysis were consistent with their taxonomic position (e.g. Maréchal et al. 1978) and known pedigree, in some cases also with remarkable agronomic traits, confirming *Phaseolus* as adequate outgroup for the analysis of different *Vigna* species and accessions, similar to that observed by Simon et al. (2007).

Considering the experimental aspects and the results obtained, ISSR, DAF fingerprintings and testing of SSR transferability are fairly easy to apply and relatively sensitive for the detection of inter and intraspecies variations. A total of 1065 polymorphic bands obtained for *Vigna* and *Phaseolus* accessions have been considered for the construction of the data matrix, generated from only 46 amplification reactions (four DAF, 22 ISSR and 20 SSR).

The data of the present study indicate that DAF generated the highest level of polymorphism (92%) followed by SSR (89%) and ISSR (88%).

Although in previous papers (Fang et al. 1997; Souframanien and Gopalakrishna 2004) ISSR markers were considered to be more reproducible and reliable than RAPD markers, in the present study using DAF method, we observed a good and comparable reliability for both methods.

DAF analysis yielded 148 polymorphic fragments, with an average of 16 polymorphic fragments per primer. Similar results were obtained by Simon et al. (2007), using DAF to estimate the genetic diversity in a representative core collection of cowpea accessions and related *Vigna* species. The authors used a set of 26 primers selected

for the characterization of 85 *Vigna* accessions (six *V. angularis*, four each *V. mungo* and *V. radiata*, two *V. umbellata*, one *V. aconitifolia* and 68 *V. unguiculata*). This represented an average of 13.6 polymorphisms per primer. Our approach was definitely more efficient for the detection of polymorphisms than that of Santalla et al. (1998), where the authors used 60 primers RAPD to characterize 22 *Vigna* genotypes of three taxa (*V. mungo*, *V. luteola* and *V. radiata* ssp. *sublobata*). From these, 32 primers were monomorphic, and the remaining 28 generated a total of 246 fragments, with an average of 8.2 polymorphic bands per primer. The high efficiency of the DAF methodology as compared with RAPD amplification in the generation of polymorphisms was also observed before in the analysis of chickpea, another crop of the *Phaseolinae* tribe (Winter et al. 2000, Benko-Iseppon et al. 2003).

The high polymorphism number revealed by the ISSR technique was not unexpected, since the technique amplifies microsatellite areas that are potentially variable, as observed previously in common bean (Métais et al. 2000; Galván et al. 2003), in the genus *Cicer* and in cultivated chickpea (Iruela et al. 2002; Rao et al. 2007) and also in *Vigna*. A primer containing the CT repeats failed to bring scorable bands, while primers with GA and CA repeats revealed in most cases higher number of polymorphisms (Ajibade et al. 2000).

The Results obtained here using ISSR polymorphisms agree well with previous studies at the species level. Ajibade et al. (2000) used nineteen ISSR primers to study the genetic relationships among 18 *Vigna* species. The ISSR polymorphisms produced by 15 of these primers were very effective for distinguishing taxa at the species level or below. The study showed that closely related species within each subgenus clustered together (e.g., *V. umbellata* and *V. angularis* (subgenus *Ceratotropis*), *V. adenantha* and *V. caracalla* (subgenus *Sigmoidotropis*), and *V. luteola* and *V. ambacensis* (subgenus *Vigna*). Cultivated cowpea accessions grouped closely to the wild subspecies of *V. unguiculata*, and the entire species was separated from its most closely allied species *V. triphylla* and *V. reticulata*. Therefore, the authors note that their conclusions regarding subgeneric classifications should be taken with caution, due to the low number of analyzed genotypes.

Similarly, Sudupak (2004) reported the usefulness of ISSR in surveying genetic variation and determination of genetic relationships in the genus *Cicer*. Screening of *Cicer* accessions with SSR primers revealed highly reproducible amplicon profiles with relatively high multiplex ratios. The availability of microsatellite markers enabled the recognition of intra and interspecific genetic diversity in *Vigna* species and relationships

among cowpea accessions. In total, alleles were detected using 20 microsatellite primer pairs. The allele number per primer varied from two to 13 with an average of 8.75, similar to that observed by Archana and Jawali (2007).

Considering the SSR primers originated from cowpea, azuki bean and mung bean, amplicons could be obtained for 44%, 50% and 60% respectively, for all *Vigna* accessions evaluated. The higher transferability of cowpea SSR primers to the genotypes studied here was not surprising, especially in subspecies of *V. unguiculata*, indicating that these sequences are conserved at intraspecific level. Regarding the other 50% transferred from adzuki bean microsatellites, few were transferable, often with a single band or completely absence of amplification, revealing less conserved inter-species genome repetitive regions.

Combination ISSR, DAF and microsatellite analysis separated African, Asian and Brazilian *Vigna* accessions. Clustering of cowpea accessions within groups was similar when DAF, ISSR and SSR-derived phenograms were compared (Loarce et al. 1996).

At species level results correlated with taxonomic relationships in *Vigna*, partially established using RAPD and RFLP analysis (Fatokun et al. 1993; Kaga et al. 1996) where the Asian and African *Vigna* groups were clearly differentiated. Within the Asian *Vigna* group, *V. radiata* and *V. mungo* clustered closely to moth bean; while rice bean and *V. angularis* clustered together.

In our evaluation the combination analysis of *Vigna* species was based on a single accession of each species and 23 for cowpea. Further analysis using several accessions per species may produce a more accurate identification of the genetic diversity within and among these species.

Previous generation of genetic maps in cowpea were sometimes difficult with most authors arguing that cowpea could bear a genetic narrow basis (Menancio-Hautea 1993; Menéndez et al. 1997). Despite of that, our results showed that DAF, ISSR and SSR techniques were efficient to generate informative molecular markers and that diversity is larger than previously supposed. This brings promissory perspectives, providing important data for selection of contrasting parental lines for the construction of a map with higher marker density. Accessions with the most distinct DNA profiles are likely to contain the greatest number of novel alleles, with higher perspectives to uncover the largest number of unique and potentially agronomic useful alleles (Souframanien and Gopalakrishna 2004).

All cowpea genotypes clearly grouped into two major branches in the phenogram with bootstrap value of 100%. One branch represented the African cowpea accessions,

identified as source of resistance for virus aphid-transmitted (CABMV) and cowpea severe mosaic virus (CPSMV), except IT85F-2687 that is sensitive to CPSMV. Above the main African cowpea branch, most accessions grouped into two subclusters. In the first subcluster, one African accession (IT81D1053) and four Brazilian accessions (CE 31, CE 315, BR9 Longá and TE9628222G) clustered together. The second subcluster grouped 14 accessions with diversity in response to biotic and abiotic stresses.

BR14 mulato (resistant CPSMV) has been crossed with IT85F-2687 to develop recombinant inbred lines for identifying DNA markers linked to bruchid resistance and to transfer the character into yellow mosaic virus-resistant background to develop multiple biotic-resistant genotypes. Further studies are envisaged to quantify the genetic gain in populations derived from genotypes with distinct DNA profiles. This is also the case of accessions IT81D-1053 and CE31 are contrasting for weevil (*C. malucatus*), being probably useful in future breeding programs.

Differential responses to abiotic stress were observed among clusters. The association of salt-tolerance accessions (Pitiúba, Epace 10 and IPA 201) in the same cluster, was supported by high bootstrap scores (95%), indicating that these accessions are also interesting for breeding of this feature (Gomes-Filho et al. 2002; Pimentel et al. 2002). Considering salt-sensitive accessions, two groups had been formed: the first containing three accessions (IPA 204, IPA 205 and IPA 206) and the second with two accessions (Canapu Amarelo and Pérola). Other authors have shown that the genetic variations identified by microsatellite markers are useful in evaluating upland accessions for drought-tolerance related morphology (Zeng et al. 2004).

Considering the application of the present data to cowpea breeding, our results reveal that local Brazilian germplasm comprises relatively high levels of genetic diversity to design crosses for mapping purposes employing linkage analysis of QTLs (Quantitative Trait Loci) and also fine-mapping to identify genes governing important traits with aid of DNA markers.

Acknowledgements

The authors thank to Program RENORBIO (Rede Nordeste de Biotecnologia from MCT/FINEP/BNB/FACEPE) for financial support and to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) for fellowships. For the concession of seeds of their germplasm banks we thank the Gatersleben Institute of Cultivated Plants (IPK-Gatersleben, Germany), EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisas do Meio Norte, Teresina, Brazil) and IPA (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife, Brazil).

REFERENCES

- Archana V, Jawali, N (2007) Genetic variation and relatedness in *Vigna unguiculata* revealed by Microsatellites. BARC Newsletter, Founder's Day Special 245:190-197
- Ajibade SR, Weeden NF, Chite SM (2000) Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. Euphytica 111:47-55
- Benko-Iseppon AM, Winter P, Hüttel B, Muehlbauer FJ, Stagginus C, Kahl G (2003) Pathogen-related sequences around *Fusarium* race 4 resistance locus in chickpea detected by DNA amplification fingerprinting (DAF). Theor Appl Genet 107:379–386
- Bressani R (1993) Grain quality of common beans. Food Reviews International, Madison 9:237-297
- Bornet B, Branchard M (2001) Nonanchored inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Mol Biol Reporter 9:209–215
- Caetano-Anollés G, Bassam BJ, Gresshoff PM (1991). DNA Amplification fingerprinting using short arbitrary oligonucleotide primers. BioTechnology 9:553–557
- Fang DQ, Roose ML (1997) Identification of closely related *Citrus* cultivars with inter-simple sequence repeat markers. Theor Appl Genet 95:408-417
- Fery FL (2002) New opportunities in *Vigna*. In: Janick J, Whipkey A (eds), Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria

- Fatokun C.A., Danesh D., Young N.D., Stewart E.L. (1993) Molecular taxonomic relationships in the genus *Vigna* based on RFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 85:97-104.
- Galván MZ, Bornet B, Balatti PA, Branchard M (2003) Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica* 132:297-301
- Gwag JG, Chung JW, Chung HK, Lee JH, Ma KH, Dixit A, Park YJ, Cho EG, Kim TS, Lee SH (2006) Characterization of new microsatellite markers in mung bean, *Vigna radiata* (L.). *Molecular Ecology Note* 6:1132-1134
- Gomes-Filho RR, Tahin JF, (2002) Respostas fisiológicas de cultivares de caupi (*Vigna unguiculata*, L.) eretos e decumbentes a diferentes níveis de irrigação. *Engenharia na Agricultura* 10:56- 60
- Iruela M, Rubio J, Cubero JI, Gil J, Millan T (2002) Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. *Theor Appl Genet* 104:643–651
- Jana S (1999) Some recent issues on the conservation of crop genetic resources in developing countries. *Genome* 44:562–569
- Kaga A, Ohnishi M, Ishii T, Kamajima OA (1996) Genetic linkage map of adzuki bean constructed with molecular and morphological markers using an interspecific population (*Vigna angularis* x *V. nakashimae*). *Theor Appl Genet* 93:658-663
- Langyintuo AS, Lowenberg-Deboer J, Faye M, Lambert D, Ibro G, Moussa B, Kergna A, Kushwaha S, Musa S, Ntougam G (2003) Cowpea supply and demand in west and central Africa. *Field Crops Research*, 82:215-231
- Li CD, Fatokun CA, Ubi B, Singh BB, Scoles G (2001) Determining genetic similarities among cowpea breeding lines and cultivars by microsatellite markers. *Crop Science*. 41:189-197
- Loarce Y, Gallego R, Ferrer E (1996) A comparative analysis of genetic relationships between rye cultivars using RFLP and RAPD markers. *Euphytica* 88:107–115
- Maréchal R, Macherpa JM, Stainer F (1978) Étude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces de genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base des données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. *Boissiera*, 28:1-273
- Menancio-Hautea D, Fatokun CA, Kumar L, Danesh D, Young ND (1993) Comparative genome analysis of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) and cowpea (*Vigna unguiculata*(L.) Walp.) using RFLP mapping data. *Theoretical Theor Appl Genet* 86:797-810
- Menéndez CM, Hall AE, Gepts P (1997) A genetic linkage map of cowpea (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between two inbred, domesticated lines. *Theor Appl Genet* 95:1210–1217

- Métais I, Aubry C, Hamon B, Jalouzot R, Peltier D (2000) Description and analysis of genetic diversity between commercial bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 101:1207–1214
- Michaels SD, John MC, Amasino RM (1994) Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. *Biotechniques*. 17:274-276
- Onwueme IC, Sinha TD (1991) Field crop production in tropical Africa. CTA (Technical Centre for Agriculture and Rural Cooperation), Ede, The Netherlands
- Pasquet RS (1996) Cultivated cowpea (*Vigna unguiculata*): genetic organization and domestication. In: Pickersgill B and Lock JM (ed) *Advances in Legume Systematics 8: Legumes of Economic Importance*, Royal Botanic Gardens, Kew
- Pimentel C, Sarr B, Diouf O, Abboud ACZ, Roy-Macauley H (2002) Tolerância protoplasmática foliar à seca, em dois genótipos de Caupi cultivados em campo. *Revista Universidade Rural Série Ciências da Vida* 22:07-14
- Rao LS, Usha Rani P, Deshmukh PS, Kumar PA, Panguluri SK (2007) RAPD and ISSR fingerprinting in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild progenitor *Cicer reticulatum* Ladizinsky. *Genet Resour Crop Evol* 54:1235–1244
- Ratnaparkhe MB, Santra DK, Tullu A, Muehlbauer FJ (1998) Inheritance of inter-simple-sequence-repeat polymorphisms and linkage with *Fusarium* wilt resistance gene in chickpea. *Theoretical and Applied Genetics* 96:348-353
- Rohlf FJ (2000) NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1 Exeter Software. Setauket. New York.
- Santalla M, Power JB, Davey MR (1998) Genetic diversity in mung bean germplasm revealed by RAPD markers. *Plant Breeding*. 17:473-478
- Simon MV, Benko-Iseppon A.M, Resende LV, Winter P, Kahl G (2007) Genetic diversity and phylogenetic relationships in *Vigna* Savi germplasm revealed by DNA amplification fingerprinting (DAF). *Genome* 50:538-547
- Singh BB, Cambliss OI, Sharma B (1997) Recent advances in cowpea breeding. In: Singh, B.B., Mohan Raj, D.R., Dashiell, K., Jackai, L.E.N. (ed), *Advances in Cowpea Research*. Co-publication of International Institute of Tropical Agriculture (IITA) and Japan International Centre for Agricultural Sciences (JIRCASA), IITA, Ibadan, Nigeria
- Souframanien J, Gopalakrishna T (2004) A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. *Theor Appl Genet* 109:1687–1693
- Sudupak Ma (2004) Inter and intra-species inter simple sequence repeat (ISSR) variations in the genus *Cicer*. *Euphytica*. 135:229–238
- Svetleva D, Pereira G, Carlie RJ, Cabrita L, Leitao J, Genchev D (2006) Molecular characterization of *Phaseolus vulgaris* L. genotypes included in Bulgarian collection by ISSR and AFLP™ analyses. *Scientia Horticulturae*. 109:198–206

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599

Tomooka N, Vaughan DA, Moss H, Maxted N (2002) *The Asian Vigna: Genus Vigna subgenus Ceratotropis genetic resources*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Wang XW, Kaga A, Tomooka N, Vaughan DA (2004) The development of SSR markers by a new method in plants and their application to gene flow studies in azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi and Ohashi]. *Theor Appl Genet* 109:352-360

Weising K, Nybom H, Wolff K, Meyer W (1995) *DNA fingerprinting in plants and fungi*. CRC Press, Boca Raton. P 322.

Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213-7218

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

Winter P, Benko-Iseppon AM, Hüttel B, Ratnaparkhe M, Tullu A, Sonnante G, Pfaff T, Tekeoglu M, Santra D, Sant VJ, Rajesh PN, Kahl G, Muehlbauer FJ (2000) A linkage map of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome based on recombinant inbred lines from a *C. arietinum* x *C. reticulatum* cross: localization of resistance genes for fusarium wilt races 4 and 5. *Theor Appl Genet* 101:1155–1163

Yu K, Park SJ, Zhang B, Haffner M, Poysa V (2004) An SSR marker in the nitrate reductase gene of common bean is tightly linked to a major gene conferring resistance to common bacterial blight. *Euphytica* 138:89-95

Zeng L, Kwon TR, Liu X, Wilson C, Grieve CM, Gregorio GB (2004) Genetic diversity analyzed by microsatellite markers among rice genotypes with different adaptations to saline soils. *Plant Science.* 166:1275-1285

Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176 –183

Table 1. Accession numbers and sources of *Vigna* and *Phaseolus* genotypes used in the present study. I. EMBRAPA = Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisas do Agropecuária do Meio-Norte (CPAMN), Piauí, PE, Brazil; Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), Recife, PE, Brazil; Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, CE; Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben (IPK), Germany. Accessions with no germplasm designations were acquired on local markets. Important agronomic traits considered only for cultivated cowpea accessions.

Taxon	Accession Nr.	Germplasm bank	Important Agronomic Traits
<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. ssp. <i>unguiculata</i>	Pitiúba	UFC	Tolerance Abiotic Stress (Salt/Drought)
<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. ssp. <i>unguiculata</i>	Epace 10	IPA	Tolerance Abiotic Stress (Salt/Drought)
<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. ssp. <i>unguiculata</i>	IPA 201	IPA	Susceptible CPSMV
<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. ssp. <i>unguiculata</i>	Vita 3	EMBRAPA	Tolerance Abiotic Stress (Salt)
<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. ssp. <i>unguiculata</i>	Sempre Verde	EMBRAPA	Susceptible CPSMV
<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. ssp. <i>unguiculata</i>	Vita 5	EMBRAPA	Tolerance Abiotic Stress (Salt)
<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. ssp. <i>unguiculata</i>	BR17 Gurguéia	EMBRAPA	Resistant CPSMV
<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. ssp. <i>unguiculata</i>	Canapu Amarelo	EMBRAPA	Sensitive Abiotic Stress (Salt/Drought)
<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. ssp. <i>unguiculata</i>	Pérola	EMBRAPA	Sensitive Abiotic Stress (Salt/Drought)
<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. ssp. <i>unguiculata</i>	CNC0434	IPA	Resistant CPSMV
<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. ssp. <i>unguiculata</i>	BR14 Mulato	EMBRAPA	Resistant CPSMV, Sensitive CABMV
<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. ssp. <i>Unguiculata</i>	IPA 204	IPA	Sensitive Abiotic Stress (Salt) Susceptible CPSMV
<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. ssp. <i>Unguiculata</i>	IPA 205	IPA	Sensitive Abiotic Stress (Salt) Susceptible CPSMV
<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. ssp. <i>Unguiculata</i>	IPA 206	IPA	Sensitive Abiotic Stress (Salt)
<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. ssp. <i>Unguiculata</i>	TE 96.282.22G	EMBRAPA	Resistant CABMV
<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. ssp. <i>Unguiculata</i>	CE 31	UFC	Susceptible Nematoid (<i>M.incognita</i>)
<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. ssp. <i>Unguiculata</i>	BR9 Longá	UFC	Susceptible Weevie (<i>C. malucatus</i>)
<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. ssp. <i>Unguiculata</i>	CE315	UFC	Resistant Nematoid (<i>M.incognita</i>) Susceptible CPSMV
<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. ssp. <i>unguiculata</i>	IT81D 1053	EMBRAPA	Resistant Weevie (<i>C. malucatus</i>)
<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. ssp. <i>unguiculata</i>	IT85F 2687	EMBRAPA	Sensitive CPSMV Resistant CABMV
<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. ssp. <i>unguiculata</i>	IT86D 716 1	EMBRAPA	Resistant CABMV
<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. ssp. <i>unguiculata</i>	TVU 382	EMBRAPA	Resistant CPSMV
<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp. ssp. <i>unguiculata</i>	TVU 379	EMBRAPA	Resistant CPSMV
<i>V. ung.</i> (L.) Walp. ssp. <i>cylindrica</i> (L.) Verdc.	VIG 79/82	IPK	-
<i>V. ung.</i> (L.) Walp. ssp. <i>sesquipedalis</i> (L.) Verdc.	VIG 28/76	IPK	-
<i>V. angularis</i> (Willd.) Ohwi et Ohashi	Azikiñnen	IPK	-
<i>V. radiata</i> (L.) Wilcz	Mungbohnen	IPK	-
<i>V. mungo</i> (L.) Hepper	PHA 81 48/85	IPK	-
<i>V. aconitifolia</i> (Jacq.) Maréchal	PHA 8150/80	IPK	-
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Neckar	IPK	-
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Delinel	IPK	-

Table 2. List of ISSR primers used and their nucleotide sequence, including the total number of polymorphic bands and the number of polymorphic bands at intra and interspecific level.

ISSR Primer	Sequence (5'→3')	Polymorphisms		
		Intraspecific	Interspecific	Total
ISSR – 888	5' BDB CAC ACA CAC ACA CA	17	52	57
ISSR – 825	5' ACA CAC ACA CAC ACA CT	16	40	45
ISSR – 841	5' GAG AGA GAG AGA GAG AYC	9	33	39
ISSR – 835	5' AGA GAG AGA GAG AGA GYC	9	17	22
ISSR – 834	5' AGA GAG AGA GAG AGA GYT	7	37	39
ISSR – 807	5' AGA GAG AGA GAG AGA GT	6	34	41
ISSR – 887	5' DVD TCT CTC TCT CTC TC	5	30	35
ISSR – 828	5' TGT GTG TGT GTG TGT GA	4	22	27
ISSR – 857	5' ACA CAC ACA CAC ACA CYG	3	30	32
ISSR – 861	5' ACC ACC ACC ACC ACC ACC	2	34	38
ISSR – 810	5' GAG AGA GAG AGA GAG AT	1	18	21
ISSR – 826	5' ACA CAC ACA CAC ACA CC	0	30	33
ISSR – 866	5' CTC CTC CTC CTC CTC CTC	0	26	29
ISSR – 840	5' GAG AGA GAG AGA GAG AYT	0	25	28
ISSR – 811	5' GAG AGA GAG AGA GAG AC	0	39	41
ISSR – 880	5' GGA GAG GAG AGG AGA	8	31	34
ISSR – 885	5' BHB GAG AGA GAG AGA GA	0	28	32
ISSR – K1	5' HVH CAC ACA CAC ACA CA	3	27	30
ISSR – 846	5' GAG AGA GAG AGA GAG AA	11	23	29
ISSR – 884	5' HBH AGA GAG AGA GAG AG	7	24	28
ISSR – 848	5' CAC ACA CAC ACA CAC ARG	6	21	25
ISSR – 847	5' CAC ACA CAC ACA CAC ARC	5	20	24
TOTAL		119	641	729

Note: ISSR primers were obtained from the University of British Colombia. N = (A,G,C,T); R = (A,G); Y = (C,T); B = (C,G,T) (i.e. not A); D = (A,G,T) (i.e. not C); H = (A,C,T) (i.e. not G), V = (A,C,G) (i.e. not T).

Table 3. List of DAF primers used and their nucleotide sequence, including the total number of polymorphic bands and the number of polymorphic bands at intra and interspecific level.

DAF Primer	Sequence (5'→3')	Polymorphisms		
		Intraspecific	Interspecific	Total
OP-G06	5' GTG CCT AAC C	21	47	52
OP-K14	5' CCC GCT ACA C	19	41	44
OP-R26010	5' GAC CGA CAC G	18	28	32
OP-B07	5' GGT GAC GCA G	6	32	33
TOTAL		64	148	161

Table 4. Original primers (Left-L and Right-R) used in SSR (Simple Sequence Repeat) methodology, with their sequences and polymorphisms. Primers from VM group developed by Li et al. (2001) while CEDG group were identified by Wang et al. (2004) and GBssr-MB group were identified by Gwag et.al. (2006).

SSR Primer	Pairs Sequence (5'→3')	Polymorphisms		
		Intraspecific	Interspecific	Total
VM 39	5' GAT GGT TGT AAT GGG AGA GTC 5' AAA AGG ATG AAA TTA GGG AGC A	13	13	13
VM 10	5' TCC CAC TCA CTA AAA TAA CCA ACC 5' GGA TGC TGG CGG CGG AAG G	10	12	13
VM 36	5' ACT TTC TGT TTT ACT CGA CAA CTC 5' GTC GCT GGG GGT GGC TTA TT	8	9	10
VM 31	5' CGC TCT TCG TTG ATG GTT ATG 5' GTG TTC TAG AGG GTG TGA TGG TA	7	9	11
VM 37	5' TGT CCG CGT TCT ATA AAT CAG C 5' CGA GGA TGA AGT AAC AGA TGA TC	6	10	11
VM 32	5' GAA AAA GGG AGG AAC AAG CAC AAC 5' AGC GAA AAC ACG GAA CTG AAA TC	6	9	10
VM 68	5' CAA GGC ATG GAA AGA AGT AAG AT 5' TCG AAG CAA CAA ATG GTC ACA C	6	9	9
VM 5	5' AGC GAC GGC AAC AAC GAT 5' TTC CCT GCA ACA AAA ATA CA	5	9	10
VM 27	5' GTC CAA AGC AAA TGA GTC AA 5' TGA ATG ACA ATG AGG GTG C	3	6	6
CEDG 008	5' GCC CAT ATT TTT ACG CCC AC 5' AGG CGA GGT TTC GTT TCA AG	5	9	10
CEDG 043	5' ACT ATT TCC AAC CTG CTG GG 5' AGG ATT GTG GTT GGT GCA TG	4	9	12
CEDG 024	5' TTT GGT GAA GAT GAC AGC CC 5' CAT CTT CCT CAC CTG CAT TC	3	4	5
CEDG 026	5' TGG GAC AAA CCT CAT GGT TG 5' TCA GCA ATC ACT CAT GTG GG	0	5	6
CEDG 015	5' CGC CAA AGG AAA CGC AGA AC 5' CCC GAT GAA CGC TAA TGC TG	0	4	5
CEDG 007	5' GAA GTT GAC ACT CAT CCA CC 5' GTG CAG CCA CTA CAT GAA TG	0	2	2
GBssr-MB77	5' GGA GAG GAA GGA ACA GGG 5' GGC AGA GCA TAA CAT GGC	6	11	13
GBssr-MB14	5' TGG AAT TTG GAA GGA AGG A 5' GAT GCA GGT GTT TGG GAG	7	11	12
GBssr-MB13	5' GCA GCA ACA ACA GCA ACA 5' GCA GGT TTT GTG GCT CAG	0	5	6
GBssr-MB17	5' ACC TGC AAG TTG GCA AGA 5' TAT GTG CAC GCA TGG AAG	0	6	7
GBssr-MB91	5' GAG GCC AAT CCC ATA ACT TT 5' AGC ACC ACA TCA GAG ATT CC	0	4	4
TOTAL		89	156	175

Table 5. Number of detected alleles in cowpea and related *Vigna* species using microsatellite primers developed by Li *et al.* (2001).

SSR Primer	Number of alleles						
	<i>V.aconitifolia</i>	<i>V. radiata</i>	<i>V. mungo</i>	<i>V. angularis</i>	<i>V. unguiculata</i>	<i>V.ung.cylindrica</i>	<i>V.ung.sesquipedalis</i>
VM 39	0	0	0	0	13	1	2
VM 10	2	1	1	2	10	2	1
VM 36	1	1	1	1	8	1	1
VM 31	1	1	1	1	7	1	1
VM 37	1	1	1	1	7	1	2
VM 32	1	1	0	1	6	1	0
VM 68	0	1	1	0	6	1	0
VM 5	1	1	0	1	5	1	1
VM 27	1	0	1	1	3	1	1

Table 6. Number of detected alleles in cowpea and related *Vigna* species using microsatellite primers developed by Wang *et al.* (2004).

SSR Primer	Number of alleles						
	<i>V.aconitifolia</i>	<i>V. radiata</i>	<i>V. mungo</i>	<i>V. angularis</i>	<i>V. unguiculata</i>	<i>V.ung.cylindrica</i>	<i>V. ung.sesquipeda</i>
CEDG 008	0	1	1	1	5	1	1
CEDG 043	1	1	1	1	3	1	1
CEDG 024	1	1	0	1	3	1	1
CEDG 026	1	2	1	2	1	1	1
CEDG 015	1	1	1	1	1	1	1
CEDG 007	1	0	0	1	0	0	0

Table 7. Number of detected alleles in cowpea and related *Vigna* species using microsatellite primers developed by. Gwag *et.al.* (2006).

SSR Primer	Number of alleles						
	<i>V.aconitifolia</i>	<i>V. radiata</i>	<i>V. mungo</i>	<i>V. angularis</i>	<i>V. unguiculata</i>	<i>V.ung.cylindrica</i>	<i>V. ung.sesquipeda</i>
GBssr-MB77	1	1	1	1	7	2	2
GBssr-MB14	1	1	1	0	7	1	2
GBssr-MB13	1	1	1	1	1	1	1
GBssr-MB17	1	1	1	1	1	1	1
GBssr-MB91	1	1	1	0	1	1	1

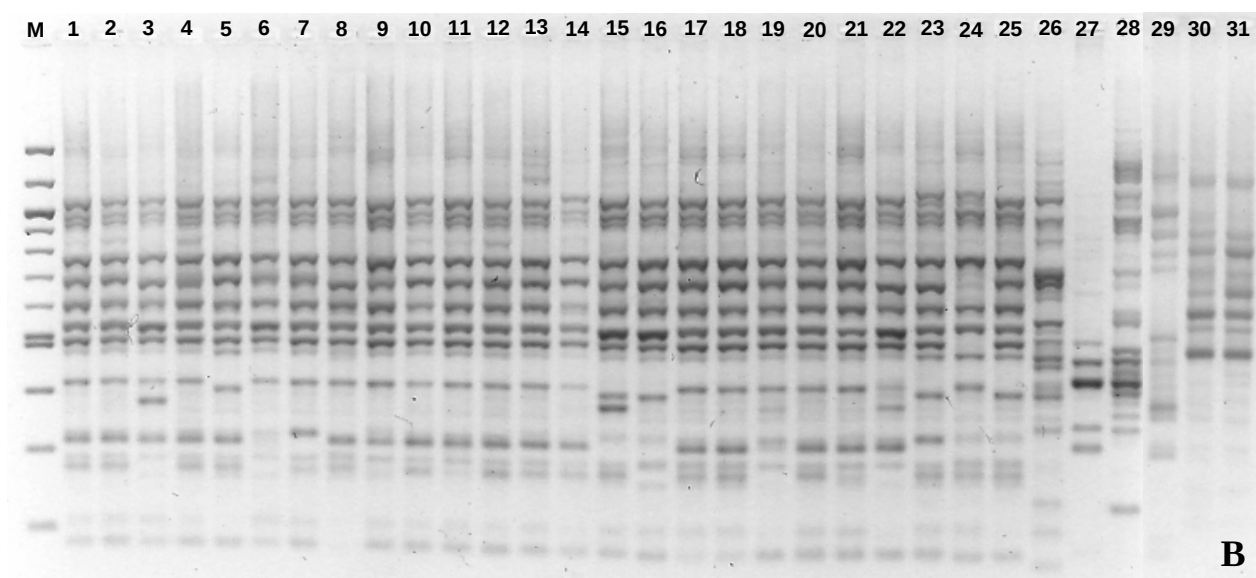
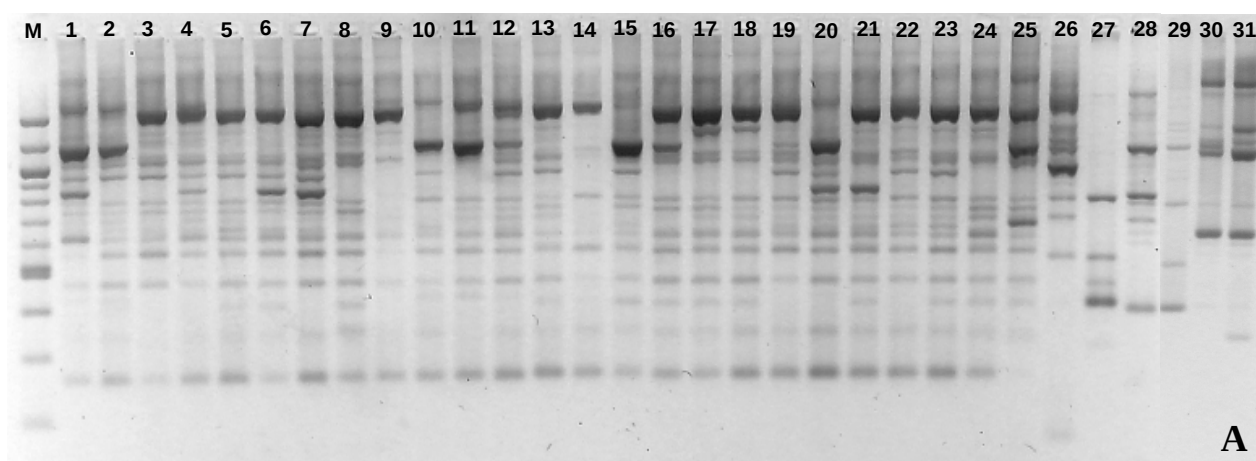


Figure 1. A) Fragments obtained of DAF reaction for 31 accessions with the primer OPKG6 after electroforesis in agarose gel. **B)** The ISSR polymorphism using the ISSR primer 888. **M:** 100 bp ladder molecular weight marker; **1:***Vigna unguiculata*–Pitiuba; **2:***V.ung.*-Epace10; **3:***V.ung.*-Vita; **4:***V.ung.*-IPA201; **5:***V.ung.*-Vita5; **6:***V.ung.*-Sempre Verde; **7:***V.ung.*-Canapu Amarelo; **8:***V.ung.*-Pérola; **9:***V.ung.*-BR17-Gurguéia; **10:***V.ung.*-IPA204; **11:***V.ung.*-IPA205; **12:***V.ung.*-IPA206; **13:***V.ung.*-CNC0434; **14:***V.ung.*-BR14Mulato; **15:***V.ung.*-IT85F-2687; **16:***V.ung.*-IT86D-716-1; **17:***V.ung.*-TVU382; **18:***V.ung.*-TVU379; **19:***V.ung.*-TE96.282.22G; **20:***V.ung.*-CE31; **21:***V.ung.*-CE315; **22:***V.ung.*-BR9Longá; **23:***V.ung.*-IT81D-1053; **24:***V.ung. cylindrical*; **25:***V.ung. sesquipedalis*; **26:** *V. angularis*; **27:** *V. radiata*; **28:** *V. mungo*; **29:** *V. aconitifolia*; **30:** *Phaseolus vulgaris*-Neckar; **31:** *P. vulgaris*-Delinel.

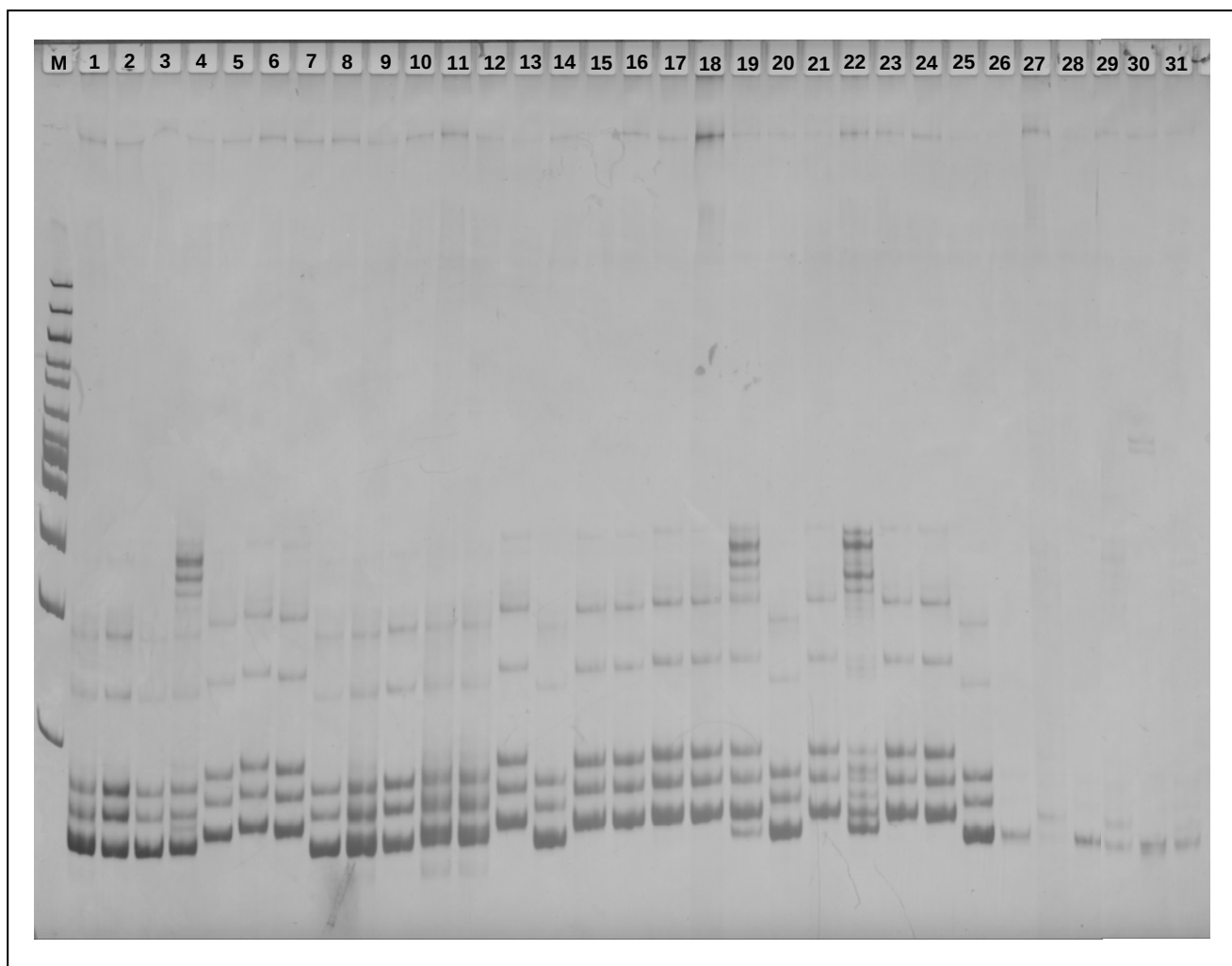


Figure 2. The SSR polymorphism using the primer VM36. **M:** 100 bp ladder molecular weight marker. **1:** *Vigna unguiculata*–Pitiuba; **2:** *V.ung.*-Epace10; **3:** *V.ung.*-Vita; **4:** *V.ung.*-IPA201; **5:** *V.ung.*-Vita5; **6:** *V.ung.*-Sempre Verde; **7:** *V.ung.*-Canapu Amarelo; **8:** *V.ung.*-Pérola; **9:** *V.ung.*-BR17-Gurguéia; **10:** *V.ung.*-IPA204; **11:** *V.ung.*-IPA205; **12:** *V.ung.*-IPA206; **13:** *V.ung.*-CNC0434; **14:** *V.ung.*-BR14Mulato; **15:** *V.ung.*-IT85F-2687; **16:** *V.ung.*-IT86D-716-1; **17:** *V.ung.*-TVU382; **18:** *V.ung.*-TVU379; **19:** *V.ung.*-TE96.282.22G; **20:** *V.ung.*-CE31; **21:** *V.ung.*-CE315; **22:** *V.ung.*-BR9Longá; **23:** *V.ung.*-IT81D-1053; **24:** *V.ung.* cylindrical; **25:** *V.ung.*sesquipedalis; **26:** *V. angularis*; **27:** *V. radiata*; **28:** *V. mungo*; **29:** *V. aconitifolia*; **30:** *Phaseolus vulgaris*-Neckar; **31:** *P. vulgaris*-Delinel.



Figure 3. Consensus tree of the analyzed *Vigna unguiculata* germplasm and other *Vigna* species based on SSR, ISSR and DAF data. Phenogram generated with the program TreeView based on Neighbor Joining analyses (complete deletion and p-distance) using MEGA4 program. Bar indicates genetic distance. Bootstrap values >60% [1000 replicates] are depicted above the branches.

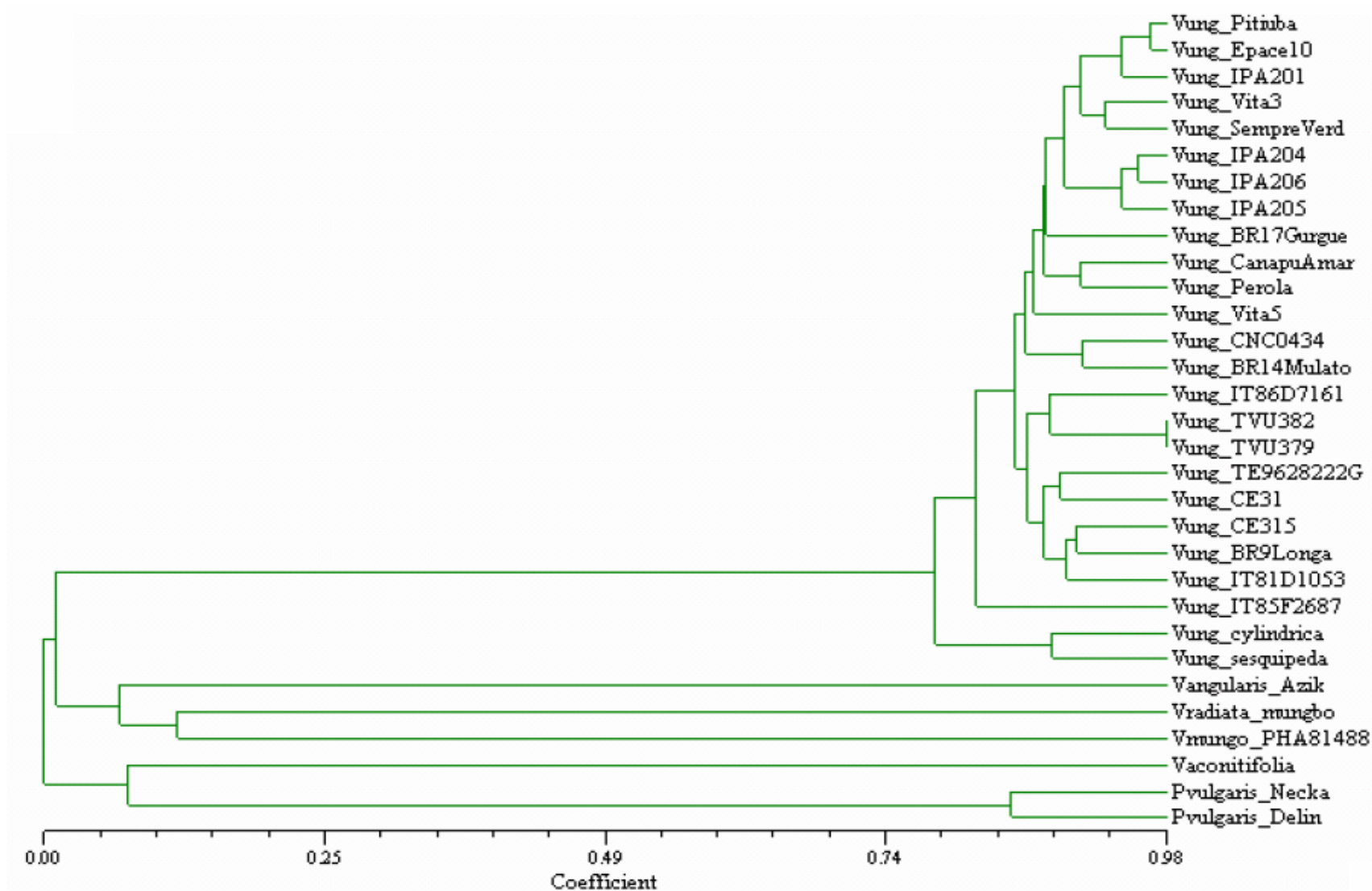


Figure. 4. Phenogram, generated after evaluation of *Vigna unguiculata* germplasm as compared with other *Vigna* species based on SSR, ISSR and DAF data, using UPGMA analysis with NTSys 2.1 program. Scale represent distance coefficient.

ANEXO

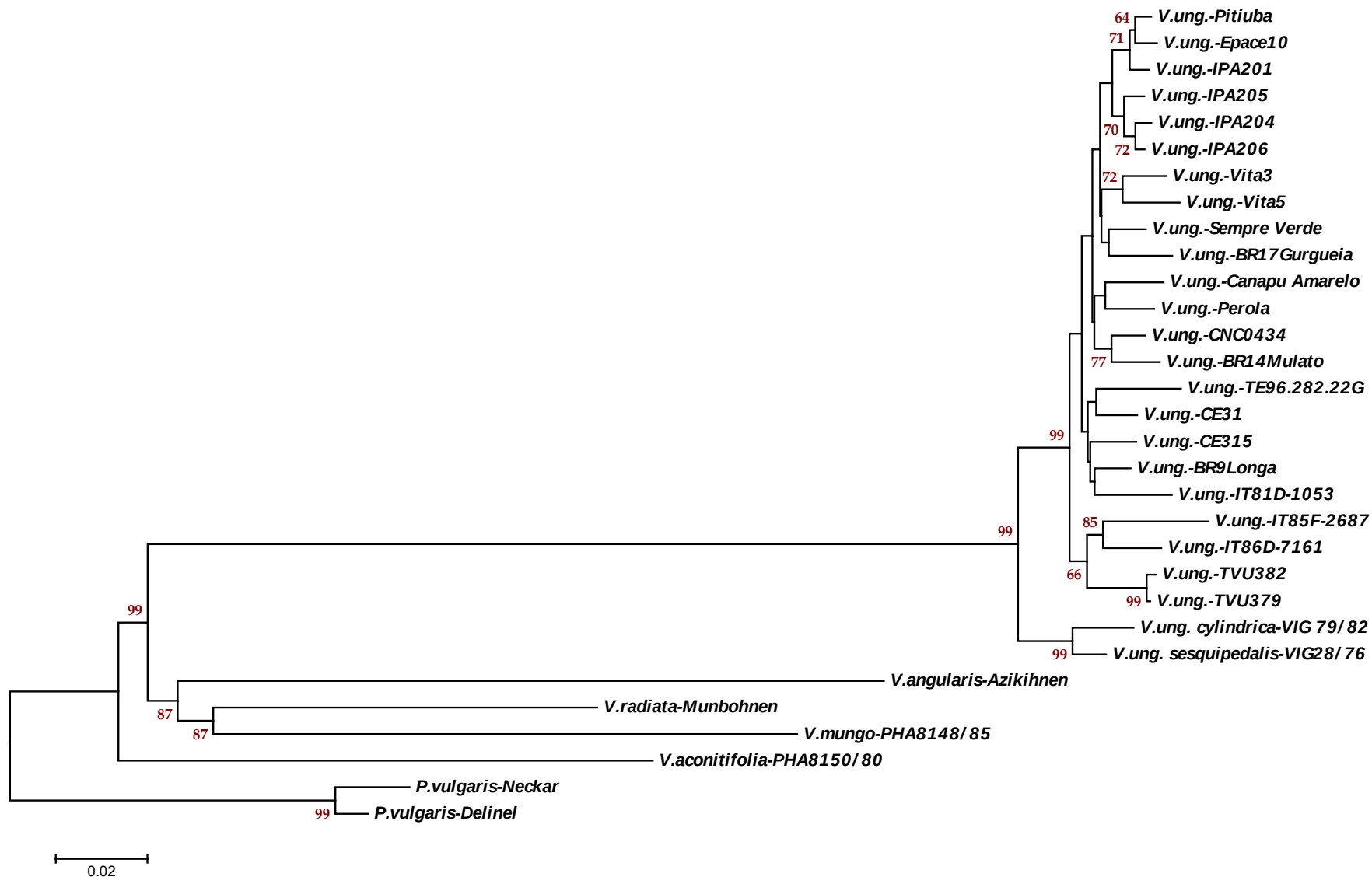


Figure. 1. Consensus tree of the analyzed *Vigna unguiculata* germplasm and other *Vigna* species based on ISSR data. Phenogram generated with the program TreeView based on Neighbor Joining analyses (complete deletion and p-distance) using MEGA4 program. Bar indicates genetic distance. Bootstrap values >60% [1000 replicates] are depicted above the branches.

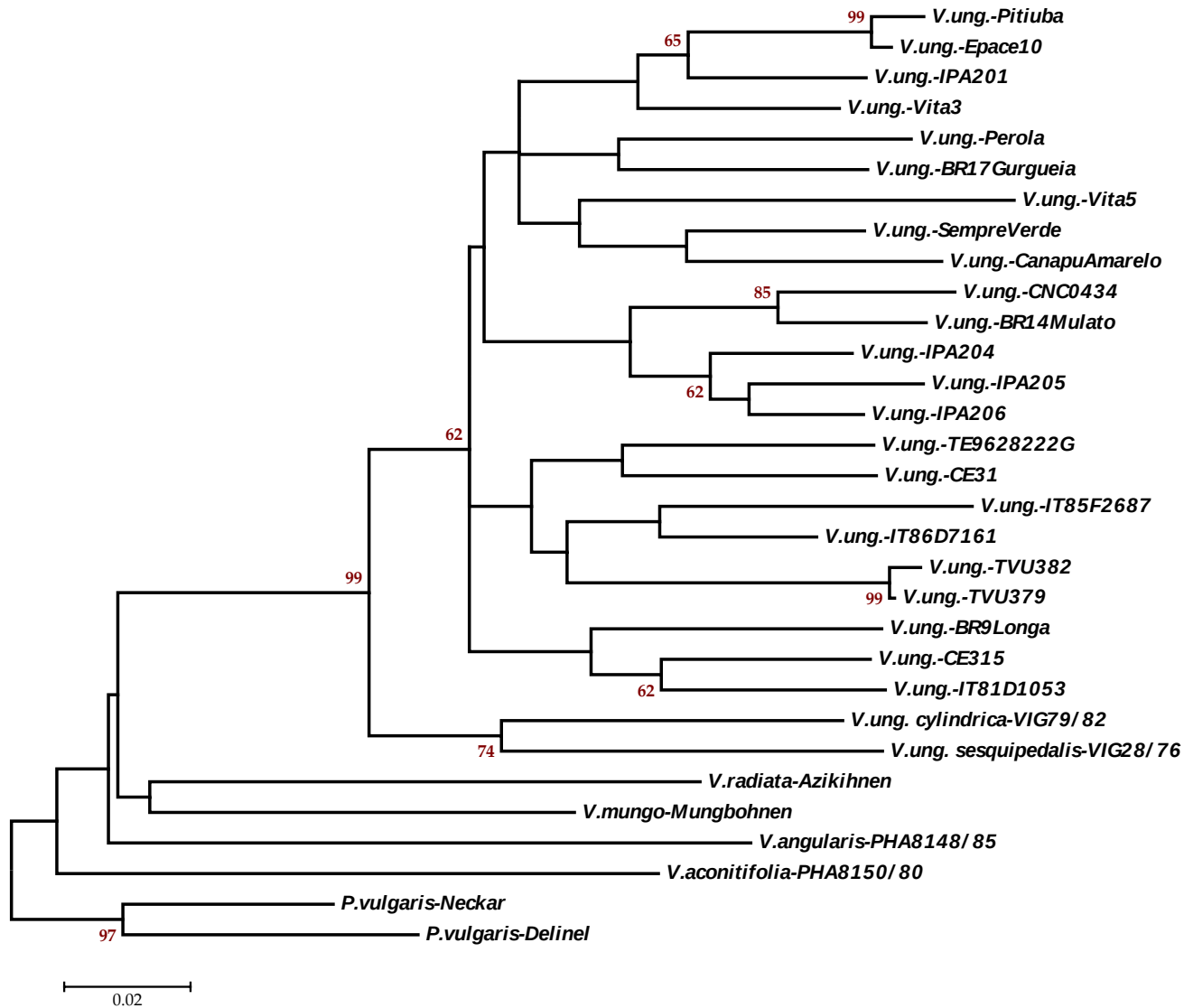


Figure. 2. Consensus tree of the analyzed *Vigna unguiculata* germplasm and other *Vigna* species based on SSR data. Phenogram generated with the program TreeView based on Neighbor Joining analyses (complete deletion and p-distance) using MEGA4 program. Bar indicates genetic distance. Bootstrap values >60% [1000 replicates] are depicted above the branches.

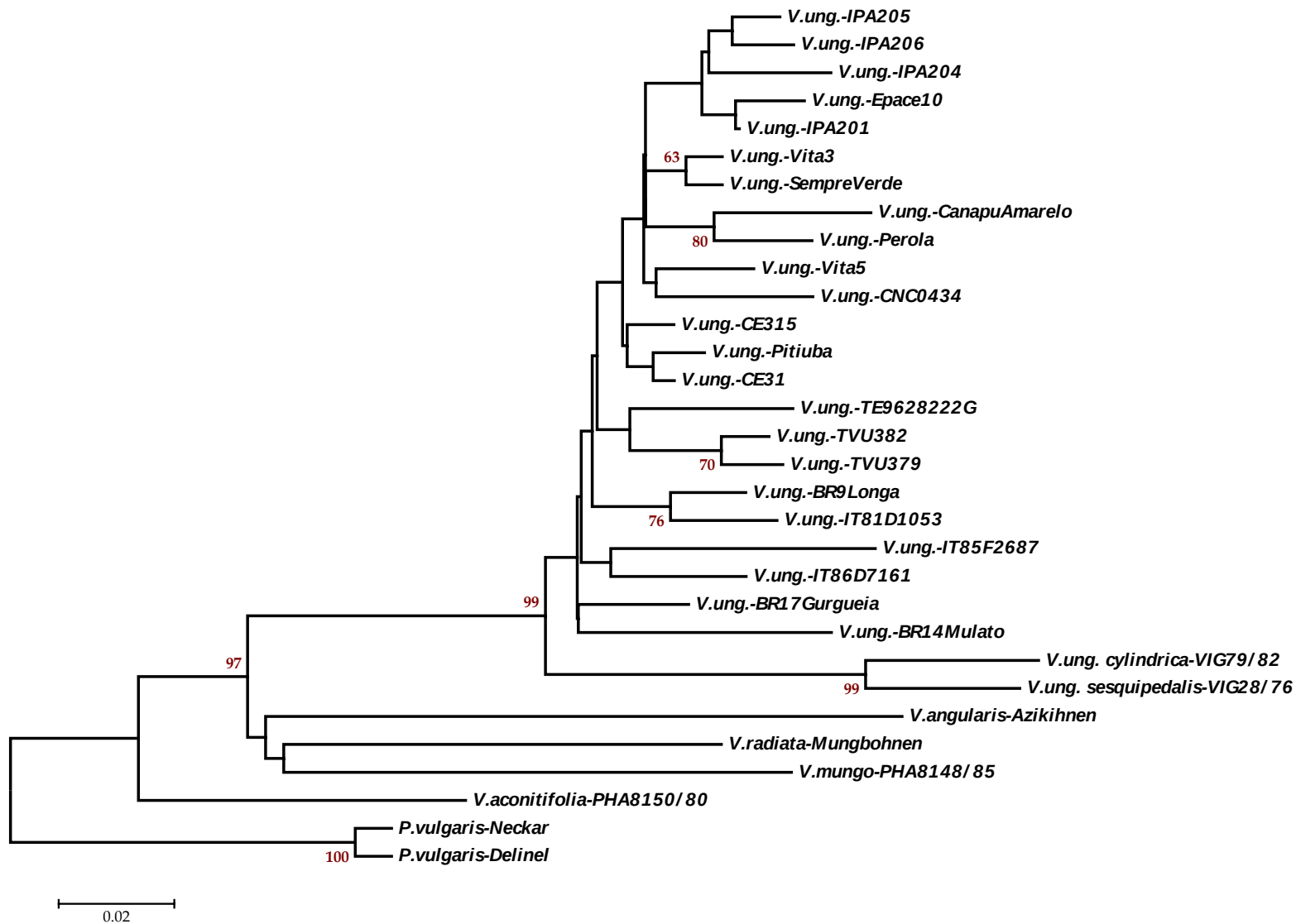


Figure. 3. Consensus tree of the analyzed *Vigna unguiculata* germplasm and other *Vigna* species based on DAF data. Phenogram generated with the program TreeView based on Neighbor Joining analyses (complete deletion and p-distance) using MEGA4 program. Bar indicates genetic distance. Bootstrap values >60% [1000 replicates] are depicted above the branches.

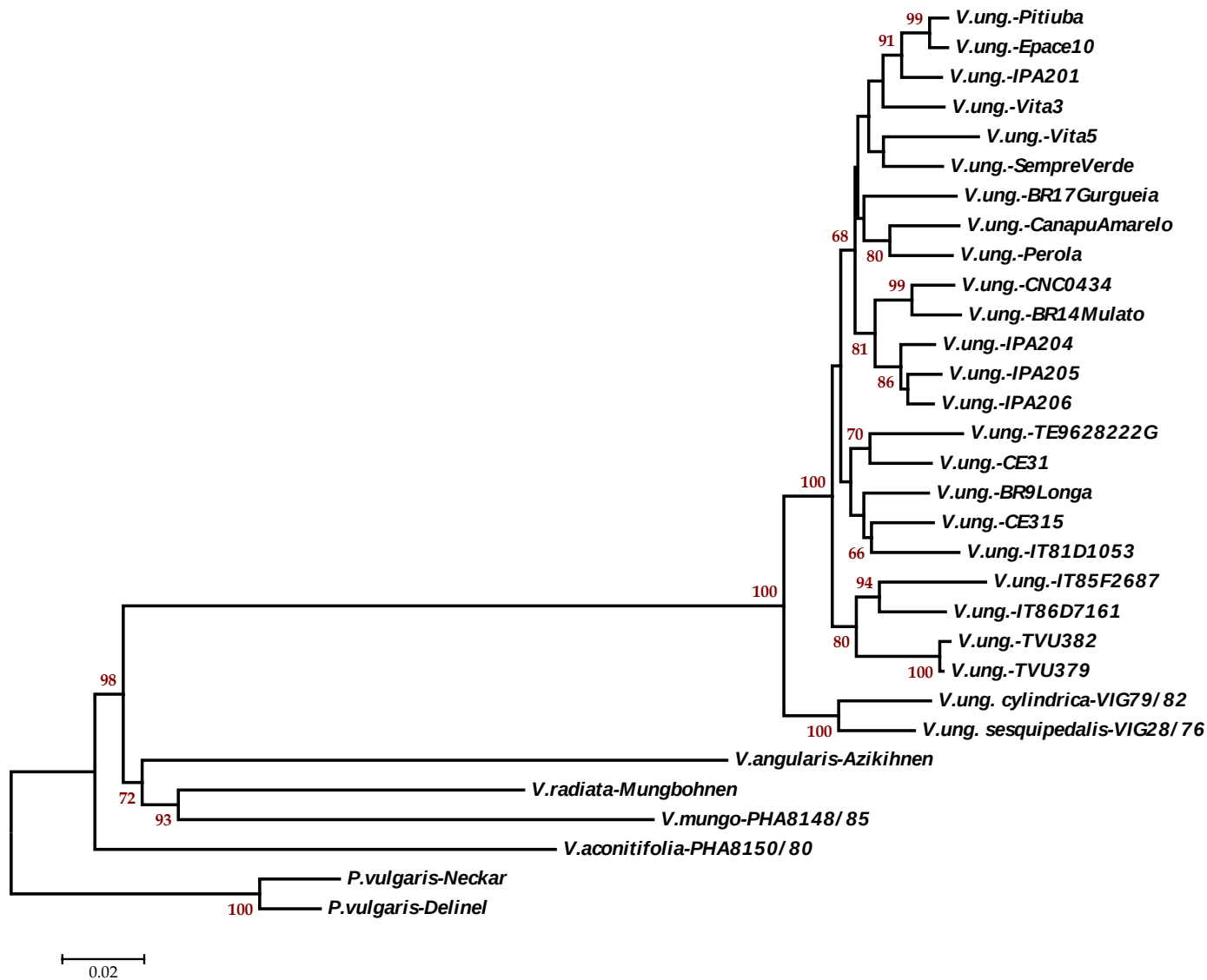


Figure. 4. Consensus tree of the analyzed *Vigna unguiculata* germplasm and other *Vigna* species based on ISSR and SSR data. Phenogram generated with the program TreeView based on Neighbor Joining analyses (complete deletion and p-distance) using MEGA4 program. Bar indicates genetic distance. Bootstrap values >60% [1000 replicates] are depicted above the branches.

Onofre, Alberto Vinicius Casimiro

Diversidade genética e avaliação de genótipos de feijão-caupi contrastantes para resistência aos estresses bióticos e abióticos com marcadores SSR, DAF e ISSR / Alberto Vinicius Casimiro Onofre. – Recife: O Autor, 2008.

76 folhas : il., fig. tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2008.

Inclui bibliografia.

1. Diversidade genética 2. Evolução de Plantas 3. Feijão-caupi - genótipos. I. Título.

582.739	CDU (2.ed.)	UFPE
583.74	CDD (22.ed.)	CCB – 2008- 106