



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



LIDIANE L. BARBOSA AMORIM

**Construção de um mapa genético para feijão-caupi com
marcadores moleculares ISSR, DAF e CAPS**

**RECIFE
2009**

LIDIANE L. BARBOSA AMORIM

**Construção de um mapa genético para feijão-caupi com
marcadores moleculares ISSR, DAF e CAPS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológicas**, área de concentração em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Ana Maria Benko Iseppon.

Co-orientador: Dr. Reginaldo de Carvaho.

**RECIFE
2009**

Amorim, Lidianne Lindinalva Barbosa
Construção de um mapa genético para feijão-caupi com marcadores
moleculares ISSR, DAF E CAPS/ Lidianne Lindinalva Barbosa Amorim –
Recife: O Autor, 2009

103 folhas: il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CCB. Ciências Biológicas, 2009.

Inclui bibliografia

**1.Feijão-caupi- mapeamento genético. 2. Feijão-caupi 3.CPSMV-
vírus. 4.Marcadores moleculares. I Título.**

575:582.739
575

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCB – 2009- 85

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

PARECER DA COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
DE

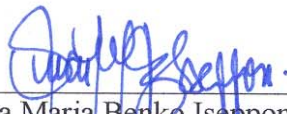
Lidiane L. Barbosa Amorim

**“Construção de um mapa genético para feijão-caupi com marcadores moleculares ISSR,
DAF e CAPS”**

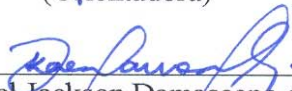
A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro,
considera a candidata

LIDIANE L. BARBOSA AMORIM como _____

Recife, 10 de março de 2009



Dra. Ana Maria Benko Iseppon
Universidade Federal de Pernambuco
(Orientadora)



Dr. Kaesel Jackson Damasceno e Silva
Embrapa Meio-Norte (Membro titular)



Dr. Tercílio Calsa Júnior
Universidade Federal de Pernambuco (Membro titular)

Dr. Éderson Akio Kido

Universidade Federal de Pernambuco (Membro suplente)

Dedico a minha família pela confiança e apoio nos momentos difíceis e por todo amor! E ao querido Alberto Onofre (Lindinho) pela compreensão, estímulo e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e por mais esta graça concedida.

A todos os meus familiares em especial aos **meus Pais (José Amorim e Neide Amorim)**, irmãos (**Gomes Amorim e Liliane Amorim**), avós (**seu Zezinho, Dona Deda, vô Luiz, Dona Irene**), primos (**Livia e Paulo**) que sempre contribuíram para minhas conquistas, pela compreensão, paciência, pelo amor!

Ao querido Alberto Onofre (Lindinho), que trouxe muitos ensinamentos para minha vida, por todos os momentos felizes que passamos juntos. Pela humildade, solidariedade, alegria, companheirismo, carinho, afeto, amizade, por seu amor, são poucas as palavras para agradecer todo o bem que me faz.

A minha orientadora: Ana Maria Benko-Iseppon, exemplo de profissional e de grande ser humano, exemplo de ética, pela orientação, amizade, compreensão, respeito, dedicação e oportunidade de crescimento adquiridos com seu nível de exigência e estímulo frente aos desafios surgidos.

Ao meu co-orientador: Reginaldo de Carvalho, exemplo de profissional, pela amizade, alegria e ajuda essencial para o término do trabalho. Neste momento, não posso deixar de lhe expressar o meu mais profundo reconhecimento pela confiança que sempre depositou em mim, logo após a primeira conversa que tivemos.

A todos os professores que foram responsáveis pela minha formação como pesquisadora, em especial aos professores: **Willian Severi, Ana Carla Asfora, Ederson Kido, Tercilio Calsa, Paulo Paes Andrade e Ana Christina Brasileiro Vidal** pelos ensinamentos e bons momentos.

Aos membros da banca de qualificação Roseane Cavalcanti, Gilvan Pio Ribeiro e Tercilio Calsa Júnior, por terem aceitado o singelo convite e por ter contribuído para o melhoramento da nossa dissertação! Muito obrigada! **A banca examinadora** final, pelas contribuições e críticas para o aperfeiçoamento do trabalho.

Ao Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Márcio Moretzsohn pela cordialidade e imensa ajuda na inclusão dos marcadores moleculares no mapa genético. **Aos pesquisadores da Embrapa Meio-Norte Ilza M. Sittolin, Maurisrael Rocha, Francisco Freire Filho e Kaesel Damasceno** pelas pesquisas com a população segregante do feijão-caupi para o mapeamento.

Aos pesquisadores do Laboratório de Fitovirologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco **Genira Pereira Andrade e Gilvan Pio Ribeiro** pela amizade e imenso apoio nas avaliações fenotípicas/sorológicas da resistência ao mosaico severo do feijão-caupi.

A **todos do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal-LGBV**, onde tive a oportunidade de realizar este trabalho, pela amizade, brincadeiras e festas, pelo convívio agradável, pelos ensinamentos e pelo apoio durante esse tempo. Em especial àqueles que **batalharam comigo de domingo a domingo e nas madrugadas (Bené, Bruno, Karlinha, Kyria, Rafaela, Santelmo)**. E aos **fotógrafos do Caupi: Hayana e Giovanne!**

Aos **Super-técnicos do LGBV, Vanessa, Valéria e Diego Valério** pela ajuda e amizade sempre presentes.

A todos do Laboratório de Genética Molecular e da Positiva em especial a **Neto, Valesca Pandolfi e Pedranne** pelo entusiasmo e imenso apoio!

À **Dona Zizi e Romildo**, pessoas maravilhosas, um exemplo de pessoas que batalham muito pelo bem do próximo, sempre prontos para ajudar a todos!

Ao grupo do Laboratório Genética, Bioquímica e Sequenciamento e DNA da UFRPE, por disponibilizar água destilada e utensílios quando necessário, em especial à **Lucília**, pela troca de experiências e pelos momentos divertidos e atrapalhados.

Aos meus amigos, que apesar da distância conseguimos cultivar o carinho: **Analice, Andréa Calado, Cecile Carvalho, Ivângela Gouveia, Mavial Fonseca, Ricardo Teixeira e Rodrigo Teixeira**.

Ao grupo Batucarte por dividirem a experiência maravilhosa que os instrumentos oferecem! Aprendi a tocar e admirar a percussão pelo maracatu!

Ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas, que viabilizou a realização deste mestrado, o qual é representado pela pessoa de **Suely Galdino e de 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 aos financiadores (**MCT/RENORBIO/FINEP, BNB/FACEPE e CNPq**) pelo apoio financeiro ao projeto.

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para minha formação e para a realização deste trabalho, que aqui não foram citados.

Não existe esta coisa de homem feito por si mesmo. Somos formados por milhares de outros. Cada pessoa que alguma vez tenha feito um gesto bom por nós, ou dito uma palavra de encorajamento para nós, entrou na formação do nosso carácter e nossos pensamentos, tanto quanto do nosso sucesso.

George Matthew Adams

Sem sombra de dúvida, a vontade do capitalista consiste em encher os bolsos, o mais que possa. E o que temos a fazer não é divagar acerca da sua vontade, mas investigar o seu poder, os limites desse poder e o carácter desses limites.

Karl Marx

AMORIM, L. L. B. **Construção de um mapa genético para feijão-caupi com marcadores moleculares ISSR, DAF e CAPS**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

RESUMO

A cultura do feijão-caupi é de grande importância econômica no Brasil, sendo a região Nordeste a principal produtora. A baixa resistência aos principais patógenos é um dos fatores limitantes para a competitividade brasileira da cultura no mercado nacional e internacional. Uma das doenças mais importantes é a virose, causado pelo *Cowpea severe mosaic virus* - CPSMV. O controle de CPSMV pode ser obtido com o uso de inseticidas no combate aos insetos vetores. Contudo, é necessário aumentar o emprego de medidas mais econômicas e que não agredam o ambiente, com a utilização de cultivares resistentes. Atualmente, o melhoramento genético de plantas está utilizando ferramentas que possibilitam a obtenção de resultados mais rápidos e precisos. Dentre elas podem-se citar os mapas genéticos, obtidos por meio de marcadores moleculares do tipo ISSR, DAF e CAPS, os quais apresentam elevado polimorfismo. Este trabalho buscou a construção de um mapa genético, visando o mapeamento de genes de resistência a doenças em feijão-caupi. Pelo cruzamento dos parentais contrastantes BR 14-Mulato e IT85F-2687 obteve-se 92 linhas endogâmicas recombinantes F₆₋₇ que foram mecanicamente inoculadas e avaliadas quanto à reação ao *Cowpea severe mosaic virus* – CPSMV. O programa MapMarker 2.0 foi utilizado para a construção do mapa adotando-se LOD 2.0, frequência de recombinação $r < 0.40$ e função de mapeamento de Kosambi. Foi gerado o mapa com 6 marcadores DAF, 27 ISSR e 6 CAPS distribuídos em 11 grupos de ligação (GL), cobrindo 492,128 cM e uma distância média entre marcadores de 16,9 cM. A reação fenotípica ao CPSMV foi codificada como um marcador e mapeado como característica qualitativa, sendo localizado a uma distância genética estimada em 28,7 cM do marcador ISSR-878. Contudo, esta distância entre a marca e o gene não permite ainda o uso de seleção assistida. O desenvolvimento de mapas de ligação para o feijão-caupi é o primeiro passo na integração de biotecnologia nos programas de melhoramento genético visando a introgressão de genes de resistência.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*, marcadores moleculares, mapeamento genético, mosaico severo do caupi.

AMORIM, L. L. B. **Construction of cowpea genetic map using ISSR, DAF e CAPS markers.** 2009. Dissertation (Master of Biology). Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ABSTRACT

Cowpea crop is of great economical importance in Brazil being the Northeastern region the main producer. The low levels of resistance to pathogens is one of the restricting factors for the Brazilian competitiveness worldwide. One of the most important disease is caused by *Cowpea severe mosaic virus* - CPSMV. The control of CPSMV can be achieved whit the use of insecticides to control insects vectors. However, it is necessary to increase the use of less expensive control methods whit a minimum environmental impact such as resistant cultivars. Nowadays, the genetic improvement of plants is using tools that make possible to obtain faster and robust results, as the genetic maps obtained trough ISSR, DAF and CAPs markers, which presents high polymorphism. The present work aimed to obtain a cowpea (*Vigna unguiculata*) genetic map including a virus resistance feature (*Cowpea severe mosaic virus*, CPSMV). For this purpose two contrasting parents (BR 14-Mulato and IT85F-2687) were crossed and obtained 92 recombinant inbred lines in F₆₋₇ that were screened for resistance/susceptibility against CPSMV. The data matrix was evaluated using the program MapMarker 2.0 with a minimum LOD 2.0, recombination rate $r < 0.40$ and the Kosambi mapping function. The generated map included 27 ISSR, six DAF and six CAPS markers distributed over 11 linkage groups (LG), covering 492.1 cM, with an average distance of 16.9 cM. The phenotypic evaluation of the CPSMV revealed a quantitative pattern, with a single associated marker (ISSR-878) at a distance of 28.7 cM, still too far to allow marker assisted selection. The development of linkage map is the first step in the integration of biotechnologies to the genetic improvement.

Key-words: *Vigna unguiculata*, molecular marker, genetic mapping, *Cowpea severe mosaic virus*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Plantas da população segregante de feijão-caupi inoculadas com o *Cowpea severe mosaic virus*, CPSMV. (a) e (b) plantas suscetíveis com mosaico severo, bolhosidade e necrose do caule e das folhas (seta indica ampliação da imagem); (c) planta resistente assintomática. 38
- Figura 2.** Teste de dupla difusão em ágar com anti-soro para o isolado *Cowpea severe mosaic virus*, CPSMV. A) Anti-soro contra o CPSMV; 1, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 26, 28 e 30 extratos de plantas infectadas com CPSMV; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 27 e 29 extrato de plantas saudáveis. 39
- Figura 3.** Amplificações com marcadores DAF nos parentais BR 14-Mulato (1) e IT85F-2687 (2) e no cruzamento teste IT86D-716 (3) e TVU 382 (4) usando os primers 15-3, 15-2, 15-19, 15-17a, B17 e C02. 42
- Figura 4.** Gel da reação de amplificação do primer DAF- 15-3. As setas apontam bandas polimórficas entre os genitores. Siglas: L = ladder 100 pb fermentas, PR= parental resistente ao CPSMV, PS = parental suscetível ao CPSMV, números de 1 a 39 representam indivíduos da população segregante de feijão-caupi. 43
- Figura 5.** Gel exibindo os produtos da reação de amplificação do primer ASN2 seguida de digestão com a enzima de restrição *NlaIII*. A seta aponta padrão de digestão diferente entre os genitores. Siglas: L = ladder 100 pb fermentas, PR =parental resistente ao CPSMV, PS = parental suscetível ao CPSMV. 48
- Figura 6.** Mapa de ligação para o feijão-caupi baseado em marcadores DAF, ISSR e CAPS, obtidos através da análise de 92 linhas endogâmicas recombinantes F₆ geradas a partir do cruzamento entre BR14-Mulato e IT85F-2687. O LOD mínimo foi de 2,0 e a máxima fração de recombinação (θ) de 0,40. Os nomes dos marcadores são mostrados à direita e as distâncias em cM (centiMorgan) são mostradas à esquerda. Os marcadores DAF encontram-se representados em laranja; verde e azul indicam marcadores ISSR e CAPS, respectivamente. Os dados de segregação para resistência ao *Cowpea severe mosaic virus* está representado pela sigla CPSMV, destacada em vermelho. Os 11 grupos de ligação estão ordenados de acordo com o seu tamanho. 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Descritores agronômicos dos genótipos parentais BR 14-Mulato e IT85F-26787.	31
Tabela 2.	<i>Primers</i> mais informativos pela metodologia de DAF, incluindo número de bandas polimórficas e o número total nos parentais (BR 14-Mulato e IT85F-2687).	41
Tabela 3.	Marcadores ISSR que geraram bandas polimórficas entre os parentais (BR 14-Mulato e IT85F-2687).	45
Tabela 4.	Designação dos <i>primers</i> EST de leguminosas que produziram bandas únicas nos parentais do mapa, bem como tamanho dos fragmentos gerados em pares de bases (pb). Organismos e sequências dos <i>primers</i> citados encontram-se disponíveis em http://bioweb.abc.hu/cgimt/pisprim/pisprim .	46
Tabela 5.	<i>Primers</i> CAPS a partir de etiquetas de sequências expressas (EST) de leguminosas com respectivos tamanhos (em bp) gerados após a amplificação, bem como a partir da digestão de fragmentos monomórficos nos parentais.	47

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.	15
2.1.1 Aspectos botânicos, origem e domesticação	15
2.1.2 Importância econômica e social	17
2.1.3 Principais doenças e pragas do feijão-caupi, com ênfase em virose	19
2.2 Programas e principais demandas do melhoramento	21
2.2.1 Marcadores moleculares	23
2.2.1 Marcadores moleculares e desenvolvimento de mapas de ligação	25
3. OBJETIVO	30
4. METODOLOGIA	31
4.1 Avaliação da resistência das RILs ao CPSMV	31
4.2 Genotipagem das RILs por meio de marcadores moleculares	33
4.2.1 Extração de DNA	33
4.2.2 Marcadores DAF	34
4.2.3 Marcadores ISSR	34
4.2.4 Marcadores EST e geração de marcadores CAPS	35
4.3 Construção do mapa de ligação	36
5. RESULTADOS	37
5.1 Avaliação da resistência das RILs ao CPSMV	37
5.2 Amplificação dos locos DAF, ISSR e EST	39
5.3 Genotipagem das RILs com marcadores polimórficos e construção do mapa	49
6. DISCUSSÃO	51
7. CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
APÊNDICES	74
Apêndice A – Manuscrito para submissão	75
ANEXOS	96
Anexo A – Instruções para autores para submissão de trabalhos na revista PAB	97

1 INTRODUÇÃO

A família Leguminosae é uma das maiores e mais importantes famílias dentre as Angiospermas, principalmente devido aos elevados teores de proteínas, óleo e pelo alto rendimento de grãos, além de possuir teores consideráveis de fibras, vitaminas como tiamina e riboflavina, além de cálcio, ferro e carboidrato (EMBRAPA, 2006).

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] também conhecido como feijão-de-corda ou feijão-macassar, é uma das leguminosas mais adaptadas, versáteis e nutritivas. Constitui-se como um alimento básico para a população – consumido na forma de grãos secos ou verdes – principalmente às camadas de renda menos favorecidas, do norte e do nordeste do Brasil, abastecendo a mesa de 25 milhões de nordestinos e gerando 1,5 milhões de empregos diretos (ATHAYDE SOBRINHO, 2004; BURGOS; TALBERT, 1996).

Nos Estados Unidos, o feijão-caupi é conhecido como “*Blackeyed pea*” ou ervilha do sul, sendo um produto para exportação e consumo interno, na forma de enlatados (do tipo seleta de legumes). Algumas variedades e espécies próximas são usadas na obtenção de *moyashi* (broto-de-feijão), uma iguaria de alto valor da cozinha asiática, já difundida no mundo todo, também comercializada em laticínios ou congelados. Além de produzir os grãos citados, trata-se de uma planta muito valiosa como forrageira, com uma capacidade ímpar de fertilizar solos pobres, mesmo em condições de calor, seca e salinidade (EHLERS; HALL, 1997).

Em termos mundiais, a área ocupada com feijão-caupi é de cerca de 12,5 milhões de hectares, com oito milhões (64% da área mundial) na parte oeste e central da África. A outra parte está localizada nas Américas do Sul e Central, bem como na Ásia, com pequenas áreas espalhadas pelo sudoeste da Europa, sudoeste dos Estados Unidos e Oceania. Os principais produtores mundiais são Nigéria, Níger e Brasil (QUIN, 1997).

Apesar da sua importância econômica e social, as estatísticas brasileiras de produção da cultura são relativamente expressivas, sendo que no período de 1998-2007 a média de área plantada foi de 1.432.763 ha e a produção nacional da ordem de 495.282 toneladas (IBGE, 2007). A produtividade média na região nordeste está em torno de 317 kg.ha⁻¹, que é baixa quando comparada à produtividade observada em campos de 1.250 até 2.600 kg.ha⁻¹ quando se dispõe de tecnologia e manejo adequado de variedades melhoradas (ALCÂNTARA et al., 2001; BEZERRA, 1997; SANTOS et al., 2007; XAVIER et al., 2008). Além disso, esta

produtividade média é menor que a de outras leguminosas cultivadas no país como o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* (L.) e a soja (*Glycine max* (L.) Merrill), que é de 783 kg.ha⁻¹ e 2.835 kg.ha⁻¹, respectivamente (CONAB, 2007; DESENBAHIA, 2008).

Em função da baixa produtividade média, os programas de melhoramento genético de feijão-caupi objetivam principalmente a obtenção de cultivares com alta produtividade e que apresentem estabilidade de produção em ambientes variados. Características como arquitetura de planta, resistência a doenças, aos nematóides e aos insetos, bem como tolerância a diversos fatores abióticos e qualidade do grão, estão entre os objetivos dos programas de melhoramento da cultura. Cultivares mais produtivas propiciam um maior retorno econômico para o produtor. No entanto, ainda é preciso conhecer e resolver muitos problemas enfrentados pela cultura, dentre eles: a insuficiência de estudos básicos na área de genética que fundamentam o melhoramento e, por conseguinte, a falta de variedades homogêneas e produtivas, tolerantes às principais doenças e pragas, bem como a ausência de tecnologias de produção mais adequadas aos diferentes mercados.

Dentro do grupo de agentes patogênicos à cultura do feijão-caupi que ocorrem na região nordeste, as viroses ocupam lugar de destaque, devido aos grandes prejuízos que causam à cultura. Especialmente o vírus do mosaico severo do caupi (*Cowpea severe mosaic virus*, CPSMV) e os mosaicos de potyvírus (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*, CABMV e o vírus do mosaico do feijão-caupi estirpe “blackeye”, *Blackeye cowpea mosaic virus*, BICMV). Estas viroses ocorrem em todas as regiões produtoras de feijão-caupi no Brasil e em outros países da América Latina e dependendo da interação entre cultivar e estirpe, bem como da época de infecção, perdas acima de 50% têm sido relatadas em condições de campo e casa de vegetação (LIMA; NELSON, 1977; PIO-RIBEIRO; ASSIS; ANDRADE, 2005). As fontes de resistência frequentemente apresentam baixa produtividade, além de cor, tamanho e dureza dos grãos que fogem do padrão comercial necessário (BARRETO, 1999).

A configuração futura dos programas de melhoramento genético do feijão-caupi deverá ser moldada pelo avanço muito rápido do conhecimento em campos como a biotecnologia, especialmente pelo uso dos marcadores moleculares tanto na caracterização, na avaliação e no manejo de germoplasma, como na identificação de cultivares e no desenvolvimento de mapas genéticos, além de ser influenciada pelo grande crescimento de expectativas da sociedade em relação à segurança alimentar e ambiental.

O mapeamento genético consiste em uma das estratégias mais eficazes para a realização de estudos avançados de genética, podendo facilitar a seleção assistida por

marcadores, o entendimento da herança, estrutura e organização dos genomas, estudos de sintenia, introgressão, identificação e isolamento de genes (MALIEPAARD et al., 1997).

O melhoramento de genótipos de feijão-caupi visando à substituição de um único gene é quase impraticável com as técnicas convencionais de melhoramento, mas torna-se possível desde que os genes em questão tenham sido clonados. Neste contexto, o mapeamento genético do feijão-caupi possibilita a localização com precisão no genoma dos genes de resistência às viroses, podendo os mesmos ser então clonados e sequenciados para posterior aplicação tanto na transferência do mesmo para cultivares suscetíveis via engenharia genética, como na seleção assistida por marcadores.

Contudo, a grande maioria dos estudos dessa natureza tem sido realizado em países da África e nos Estados Unidos, utilizando acessos resistentes as principais doenças e pragas locais e adaptados às condições ambientais diferentes das encontradas no nordeste do Brasil.

A proposta deste trabalho foi construir um mapa genético de feijão-caupi baseado em marcadores moleculares, mediante a análise de uma população segregante F_{6-7} oriunda do cruzamento entre os acessos BR 14-Mulato e IT85F-2687. A primeira etapa do trabalho foi a caracterização de alguns indivíduos da população segregante quanto à resposta ao vírus do mosaico severo do caupi. Para tal, parâmetros fenotípicos e sorológicos foram utilizados. Em seguida, foram selecionados marcadores DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e CAPS (*Cleaved amplified polymorphic sequence*) com base no polimorfismo entre os genitores.

O mapa aqui gerado será futuramente integrado a um mapa de marcadores moleculares derivados de genes específicos, sondas oriundas de projetos de mapeamento de leguminosas anteriores conduzidos em Universidades no exterior, microssatélites, AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), RGAs (*Resistance Gene Analogs*) e dCAPS da mesma progênie. Tais mapas, bem como a condução dos experimentos para mapeamento QTLs (*Quantitative Trait Loci*, Locos de Herança Quantitativa) associados a características de interesse agrônomo, vêm sendo desenvolvido no âmbito do Projeto Genômica Estrutural Funcional e Comparativa do feijão-caupi (NordEST/Renorbio – convênio: MCT/FINEP/CNPq/BNB/FACEPE).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

2.1.1 Aspectos botânicos, origem e domesticação

Na sistemática botânica de classificação, o feijão-caupi pertence à classe Dicotyledoneae, ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolineae, gênero *Vigna*, secção *Catjang*, espécie [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e subespécie *unguiculata* (MARÉCHAL et al., 1978; PADULOSI; NG, 1997). Trata-se de uma espécie diplóide com $2n=22$ cromossomos, sendo cinco cromossomos maiores, cinco médios e um pequeno (PIGNONE et al., 1990), com um genoma estimado em 450-500 Mb. Este genoma está entre os menores de leguminosas, apresentando tamanho aproximado ao do genoma do feijão comum, um terço do genoma do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e cinco vezes o genoma de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (BENKO-ISEPPON, 2001).

As demais espécies mais cultivadas do gênero *Vigna* nos países da África, Ásia e algumas regiões da América Latina pertencem ao subgênero *Ceratotropis* (Piper) Verdcourt – 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.) Maréchal].

O feijão-caupi apresenta variação de porte, desde ereto até prostrado e hábito de crescimento determinado a indeterminado (FREIRE FILHO et al., 1999). O tegumento das sementes apresenta ampla diversidade de cores, variando do preto ao branco, bege, esverdeada, marrom, podendo ter coloração uniforme ou apresentar estrias, manchas ou pontuações; ser opaco, brilhoso ou de brilho intermediário; com presença ou ausência de hilo.

As subclasses Sempre-verde e Brancão - grãos de tegumento de cor esverdeada e grãos com tegumento branco, rugoso e sem halo, respectivamente- são os mais consumidos no Brasil. Os grãos de tegumento preto e as outras cores são de utilização menos expressiva e regionalizada, por exemplo, os de tegumento preto são utilizados como forrageiras no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, já a subclasse manteiga - grãos com tegumento de cor creme-amarelada - é muito cultivada na região norte, principalmente no estado do Pará. O

escurecimento dos grãos está estreitamente associado à preferência para o consumo e ao valor comercial do produto, sendo um parâmetro de interesse nos programas de melhoramento genético (FREIRE FILHO et al., 2005).

O modo preferencial de reprodução da espécie é por autogamia, o que é facilitada pelo mecanismo de cleistogamia, sendo que a taxa de fecundação cruzada pode chegar até 1,42%. Teófilo et al. (1999) encontraram uma taxa de cruzamento natural de 0,8%. Souza et al. (2005) encontraram uma taxa que variou de zero 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.

Sua origem até hoje, constitui fonte de divergência entre os pesquisadores. Diversas hipóteses tentam explicar não somente a origem da planta, mas também de quando teria o homem começado a utilizá-la como uma cultura doméstica. Algumas evidências levam à hipótese de que o centro de origem da planta e sua domesticação como cultura teriam ocorrido na região da África, uma vez que uma maior concentração de espécies do gênero, bem como do número elevado de espécies endêmicas, foram encontrados nessa região. Há outra corrente de pesquisadores que, baseada em achados arqueológicos sustentam a hipótese de que a origem da planta seria a Ásia ou América do Sul (FREIRE FILHO, 1988; MAGLOIRE, 2005).

Freire Filho (1988) destaca que entre as espécies que ocorrem na África, *V. unguiculata*, aparece predominantemente em algumas regiões enquanto que suas formas selvagens não têm sido encontradas fora deste continente. Por outro lado, Simon et al. (2007) não apóiam a teoria da origem africana, apontando para uma origem na região sudoeste da Ásia, berço das subtribos Phaseolinae, Galegeae, Lotea, Trifolieae e Vicieae. Segundo Steele e Mehra (1980) e Ng e Maréchal (1985) a Nigéria é o centro primário de diversidade da espécie. Entretanto, Padulosi e Ng (1997) afirmam que provavelmente a região de Transvaal (África do Sul) representaria seu centro de diversidade e especiação. Faris (1965) acredita que a domesticação do feijão-caupi ocorreu a partir de *V. unguiculata* ssp. *dekindtiana* na região da Etiópia juntamente com o milheto (*Pennisetum glaucum* L. R. BR.) e o sorgo (*Sorghum*

bicolor L Moench), supondo-se que o Oeste da África seja apenas um centro secundário da diversidade do feijão-caupi.

Acredita-se que o feijão-caupi foi introduzido na América Latina no século XVI, pelos colonizadores espanhóis e portugueses, primeiramente nas colônias espanholas e em seguida no Brasil, provavelmente pelo estado da Bahia (FREIRE FILHO, 1988). A partir da Bahia o feijão-caupi foi levado pelos colonizadores para outras áreas da região Nordeste e para outras regiões do país.

As coleções de germoplasma de feijão-caupi têm sido mantidas com a função de garantir a sua diversidade genética, multiplicação, distribuição aos usuários e promoção de sua caracterização por diferentes metodologias.

A maior coleção de germoplasma de feijão-caupi, com cerca de 8.000 acessos, está localizada na Nigéria onde é mantida pelo IITA (Instituto Internacional de Agricultura Tropical). No Brasil, o principal banco ativo de germoplasma é administrado pela Embrapa Meio-Norte ou Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte – CPAMN (Teresina, PI) é, onde as pesquisas com esse produto viabilizam a produção econômica. A Coleção ativa está constituída de 4.153 acessos, dos quais, 63% dos acessos foram coletados ou trabalhados no país e 37% foram introduzidos, disponibilizando informações sobre o nome comum, instituição ou região de origem da variedade, cor, tipo e tamanho do grão, dentre outras (WETZEL et al., 2005).

2.1.2 Importância econômica e social

O feijão-caupi destaca-se mundialmente como um dos produtos agrícolas de alta expressão econômica, social e nutricional, sendo um alimento básico tanto em países subdesenvolvidos quanto em desenvolvimento, das regiões tropicais e subtropicais, particularmente África e na América do Sul.

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; ELIAS, 1980; MAIA et al., 2000; PRINYAWIWATKUL et al., 1996), podendo

ser utilizada, também, 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 N_2 atmosférico (VALENZUELA; SMITH, 2002).

No Brasil, a região nordeste é responsável por 1.205.839 ha (94,40%) da área e 412.458 t (87,73%) da produção total de feijão-caupi (DAMASCENO SILVA, 2007). Admitindo-se que um hectare de feijão-caupi gere 1,0 emprego/ano, a cultura deve gerar em torno de 1,5 milhão de empregos diretos, movimentando cerca de R\$ 600 milhões de reais/ano. Esses dados são extremamente importantes, pois refletem a participação da cultura no contexto de geração de emprego, 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 (FREIRE FILHO et al., 1999; SANTOS; SANTOS; RODRIGUES, 2007).

O estado do Ceará é o maior produtor nacional, seguido pelo Piauí. 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, em consórcio com culturas mais tradicionais, assim como o milho e o algodão (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).

2.1.3 Principais doenças e pragas do feijão-caupi, com ênfase em viroses

As principais doenças e pragas que ocorrem no feijão-caupi podem causar perdas superiores a 50% na produção de vagens, quando medidas de controle adequadas não são utilizadas.

Dentre os principais problemas fiopatológicos que afetam o feijão-caupi, as doenças de etiologia viral são indiscutivelmente as de maior importância no Brasil. Entre os que infectam naturalmente o feijão-caupi, podem-se mencionar os pertencentes às seguintes famílias e gêneros: família *Comoviridae*, gênero *Comovirus*, vírus do mosaico severo do feijão-caupi; família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*, vírus do mosaico do feijão-caupi, transmitido por afídeos; família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus*, o vírus do mosaico dourado do feijão-caupi e família *Bromoviridae*, gênero *Cucumovirus*, vírus do mosaico do pepino que têm reduzido drasticamente a produção de feijão-caupi no Brasil e em outros países da América Latina (BARRETO, 1999; FREIRE FILHO et al., 1999; LIMA; SITTOLIN; LIMA, 2005; PIO-RIBEIRO et al., 2005; ROCHA et al., 2003).

O primeiro relato do vírus do mosaico severo do feijão-caupi no Brasil foi realizado por Oliveira (1947) no Rio Grande do Sul. Desde então, a distribuição deste vírus alcançou todas as regiões produtoras de feijão-caupi no país. Os sintomas de plantas infectadas pelo CPSMV podem aparecer em toda parte aérea e são, geralmente, drásticos nas cultivares suscetíveis, causando inclusive necrose da extremidade superior do caule, morte dos brotos terminais e queda prematura das folhas, com perdas de até 81% na produção. A par das perdas quantitativas, o vírus afeta intensamente a qualidade das sementes. Embora não sirvam como meio de perpetuação do vírus, as sementes de plantas doentes apresentam-se chochas e manchadas, constituindo mais uma fonte de prejuízo, por depreciarem o produto, tanto para o consumo como para o plantio (LIMA; SITTOLIN; LIMA, 2005).

O vírus do mosaico severo do feijão-caupi encontra-se disseminado e apresenta difícil controle devido à grande variedade de hospedeiros e à numerosa população de vetores, a maioria deles dos gêneros *Cerotoma* e *Diabrotica* (FREIRE FILHO et al., 1999). Sem controle, a doença freqüentemente alcança dimensões epidêmicas (LIMA; NELSON, 1977).

Muitos trabalhos têm relatado fontes de resistência ao CPSMV no germoplasma de feijão-caupi (PASSOS et al., 1999; PAZ et al., 1999; UMAHARAN et al., 1996; VALE; LIMA, 1995). Em alguns casos a resistência foi incorporada em cultivares comerciais, como

por exemplo, a cultivar BR 10-Piauí (SANTOS et al., 1987), BR 14-Mulato (CARDOSO et al., 1990) e BR 17-Gurguéia (FREIRE FILHO et al., 1994). No entanto, os programas de melhoramento para resistência ao CPSMV não têm sido um processo contínuo, ou seja, a resistência não é incorporada nas cultivares lançadas mais recentemente de feijão-caupi. Isto ocorre devido ao fato dos genes identificados nem sempre apresentam um amplo espectro de ação, já que sua efetividade depende do isolado viral considerado (ASSUNÇÃO et al., 2005).

A resistência ao CPSMV foi atribuída a três genes recessivos não ligados (UMAHARAM et al., 1996). No entanto, a teoria mais aceita foi apresentada por JIMENEZ et al. (1989) citados por Fery e Singh (1997) na qual a reação ao CPSMV é controlada por um único gene e que a resistência é conferida pelo alelo recessivo *ims* em homozigose, com modo de herança três suscetíveis para um resistente.

Recentemente Assunção et al. (2005) trabalhando com alguns genótipos resistentes de feijão-caupi demonstraram que as variedades CNC-0434 e Macaíbo apresentavam o mesmo gene de resistência e que esse gene era distinto daquele apresentado pela linhagem L 254.008. A elucidação deste fato pode ter importante impacto no melhoramento genético da citada cultura, pois genes distintos podem ser combinados em uma mesma cultivar, sendo que essa cultivar hipotética provavelmente apresentará uma resistência mais duradoura e de espectro mais amplo.

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 (PAZ et al., 1999; UMAHARAN et al., 1997). 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).

Além das viroses, outras doenças são consideradas importantes, podendo também gerar perdas significativas dependendo da cultivar utilizada, da região, da forma de cultivo e da época de plantio, destacando-se na região norte a mela (*Rhizoctonia solani* Kühn); nos cerrados da região meio-norte a antracnose *Colletotrichum gloesporioides* (Penz.) e mancha de cercóspora ou cercosporiose (*Pseudocercospora cruenta* (Sacc.) Deigton); no sertão pernambucano a murcha-de-fusarium (*Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *Tracheiphilum* E. F.

Smith, W.C. Synder & H. N. Hansen) e no Estado do Piauí a mancha bacteriana [*Xanthomonas campestris* pv. *vignicola* (Burkholder) Dye (*X. axonopodis* pv. *vignicola*)] e a pústula-bacteriana (*Xanthomonas* sp.) (NECHET; HALFELD-VIEIRA, 2006; SOBRINHO et al., 2005).

Mais de 30 espécies de fitonematóides associadas ao feijão-caupi já foram descritas. Embora poucas espécies apresentem patogenicidade comprovada, os nematóides-das-galhas do gênero *Meloidogyne*, principalmente *M. incognita* e *M. javanica*, que possuem extensa disseminação em toda área de cultivo do feijão-caupi, os nematóides-das-lesões-radiculares do gênero *Pratylenchus* e os nematóide-reniforme da espécie *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira, são os principais responsáveis pela redução de produção ou pela depreciação da qualidade do produto a ser comercializado (SILVA, 2005; PONTE, 1988).

O feijão-caupi pode, ainda, ser hospedeiro de muitas pragas que atacam as raízes, colo da planta, folhas, órgãos reprodutivos e os grãos armazenados. Dentre as pragas que atacam os grãos de feijão-caupi durante o armazenamento, destacam-se as espécies pertencentes à família Bruchidae por causarem danos economicamente significativos, reduzindo a qualidade e o valor comercial do produto. As principais são: *Zabrotes subfasciatus* (Boh.), *Acanthoscelides obtectus* (Say), *Callosobruchus maculatus* (Fabr.), sendo esta última conhecida como caruncho ou gorgulho (SALES et al., 2005; SILVA; CARNEIRO; QUINDERÉ, 2005). *Callosobruchus maculatus* e *C. chinensis* são responsáveis por perdas dos grãos armazenados estimadas em 20–60% (ABROL, 1999; TARVER et al., 2007).

2.2 Programas de melhoramento e suas demandas

Os principais objetivos dos programas de melhoramento do feijão-caupi no mundo envolvem: resistência múltipla a doenças e pragas, resistência a nematóides, melhoria das características de grão, porte, tolerância ao calor, ao frio, à salinidade e à seca (EHLERS; HALL, 1997). Os projetos de melhoramento dessa cultura têm se limitado a cruzamentos de seleção de descendentes sob condições de campo com ênfase para os seguintes caracteres: (a) aumentar a produtividade e melhorar a qualidade visual e nutricional dos grãos; (b) o aumento a adaptabilidade, a estabilidade e tolerâncias aos estresses hídricos e salinos; (c) a

incorporação resistência múltipla a doenças e incorporar resistência a inseto; (d) obter porte mais compacto e ereto, possibilitando a colheita mecânica e processamento industrial (FREIRE FILHO et al., 1999).

O programa de melhoramento de feijão-caupi no Brasil está hoje concentrado principalmente na Embrapa Meio-Norte, embora tenha tido expressão em alguns programas de melhoramento regionais como aqueles das empresas estaduais de pesquisa de Pernambuco (IPA) e do Ceará (EPACE) (QUEIROZ; LOPES, 2007).

No ano de 2007, a Embrapa Meio-Norte lançou a cultivar BRS-Novaera (porte semi-ereto) para os estados das regiões Norte (Rondônia, Amazonas, Roraima, Amapá, e Pará), Nordeste (Maranhão e Rio Grande do Norte) e Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul). Esta cultivar, além do benefício do bom porte, apresenta um grão de excelente qualidade e que certamente será bem aceita comercialmente nos mercados interno e externo. No ano de 2008, cinco novas cultivares de feijão-caupi foram registradas e uma delas já foi lançada, a cultivar BRS-Xiquexique, a qual tem como principal destaque os seus altos teores de ferro e zinco no grão. No que diz respeito ao aspecto social, esta cultivar traz grandes contribuições, principalmente para as regiões mais pobres do país, onde existe um alto índice de crianças desnutridas e anêmicas. A inserção deste alimento nas merendas escolares seria de grande valia, pois além dessa riqueza em minerais, também é rico em proteínas e apresenta fibras de excelente qualidade (DAMASCENO SILVA, 2008).

É importante mencionar que além do mercado interno, as cultivares de feijão-caupi tem conquistado o mercado externo, principalmente as cultivares de grão branco. No entanto, o mercado externo, exige cultivares com grãos grandes e este tamanho figura como um dos principais fatores determinadores de preço. Em função disso, a Embrapa Meio-Norte tem focado o seu trabalho na obtenção do grão com tamanho aceito externamente. O aumento exponencial das exportações de feijão-caupi justifica a necessidade de uma linha de pesquisa específica para atender a essa demanda. No ano de 2005, o Brasil exportou 1.379 toneladas, já no ano de 2006 foram exportadas 5.178 toneladas de grãos e no ano de 2007 o Brasil exportou 30.469 toneladas (DAMASCENO SILVA, 2008).

Visto que os recursos aplicados em programas de melhoramento genético são relativamente altos, devido principalmente as avaliações extensivas dos genótipos, são necessárias metodologias ou mecanismos de seleção que possibilitam identificar genótipos promissores, logo no início da fase de avanço de gerações após os cruzamentos,. Uma dessas metodologias é a identificação de marcadores associados a características de herança

quantitativa como cor e peso do grão e a genes que conferem resistência a patógenos, o que permite monitorar e acelerar a introdução desses genes no germoplasma cultivado (BENKO-ISEPPON, 2001).

2.2.1 Marcadores moleculares

A biotecnologia abre muitas possibilidades no campo do melhoramento genético, permitindo que os processos sejam mais rápidos e confiáveis. Neste sentido, as ferramentas biotecnológicas mais interessantes são a seleção assistida por marcadores moleculares, as técnicas de cultivo *in vitro* e a transformação genética (GÉRMAN, 2005).

Os marcadores moleculares são abundantes nos genomas vegetais e não sofrem influências ambientais, revelando diretamente os polimorfismos de sequências de DNA. Marcadores moleculares, baseados ou não na amplificação de fragmentos de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido largamente empregados nos programas de melhoramento de plantas, como na caracterização de populações, construção de mapas de ligação e detecção de QTL dentre outras aplicações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Vários tipos de marcadores estão disponíveis, diferenciando-se entre si quanto ao custo de aplicação, facilidade de uso e consistência dos resultados (BORÉM; CAIXETA, 2006). As categorias de marcadores baseadas na amplificação por PCR mais utilizados são: DAF, AFLP, CAPS, RGAs, RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), SSR (*Simple Sequence Repeat*), SCARs (*Sequence Characterized Amplified Regions*), e SNPs (*Single Nucleotides Polymorphisms*) (CAETANO-ANOLLÉS et al., 1991; HOWARD et al., 1999; KANAZIN et al., 1996; PARAN; MICHELMORE, 1993; WILLIAMS et al., 1990; ZABEAU, 1993).

O marcador molecular DAF é similar à técnica RAPD, com pequenas variações no comprimento e concentração do *primer* usado na amplificação mediada pela DNA polimerase, e na separação e detecção dos fragmentos. Além disso, possui as vantagens de ser altamente reprodutível, apresentar herança mendeliana e possuir um bom nível de polimorfismo. Por ser baseado em uma reação altamente específica de PCR, não usar radioatividade, requerer pequena quantidade de DNA e não necessitar de qualquer transferência física de seu 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 e desenvolvimento de mapas de diversas leguminosas como o *Lotus japonicus* L., grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), soja e amendoim (BENKO-ISEPPON et al., 2003; CAETANO-ANOLLÉS et al., 1991; JIANG; GRESSHOFF, 1997; PRABHU; GRESSHOFF, 1994; WINTER et al., 2000) revelando-se relativamente vantajosa quando comparada com o RAPD, notadamente por sua elevada reprodutibilidade e por gerar um grande número de polimorfismo (BENKO-ISEPPON et al., 2003).

Os ISSR foram desenvolvidos por Zietkiewicz, Rafalski e Labuda (1994) com base nos marcadores SSR que são sequências pequenas de nucleotídeos - uma a seis bases - repetidas em *tandem*. A técnica envolve a amplificação de DNA por PCR, usando um único *primer* semi-arbitrário composto de uma sequência com padrões de microssatélites, podendo ser não ancorado ou mais comumente, ancorada na região 3' ou 5', incluindo um a quatro nucleotídeos arbitrários ou degenerados. Tais marcadores são dominantes e reproduzíveis com a vantagem de gerar grandes quantidades de bandas, sendo abundantes ao longo do genoma de eucariontes e evoluem rapidamente (FANG; ROOSE, 1997; GUPTA et al., 1994).

O desenvolvimento de polimorfismo dos marcadores CAPS decorre das diferenças entre os genótipos na distribuição dos sítios de restrição. Como as enzimas reconhecem sequências de bases específicas no DNA, a alteração em uma única base (SNP) pode criar ou eliminar um sítio de restrição em determinado loco do genoma, gerando o polimorfismo. Uma possibilidade de diagnóstico é amplificar por PCR a região de interesse e digerir em seguida, o fragmento obtido com a enzima de restrição específica (LUKOWITZ et al., 2000; TAYLOR; PROVART, 2006). Os *primers* são sintetizados pela comparação das sequências disponíveis em bancos de dados públicos de bibliotecas genômicas ou cDNA ou por clonagem e sequenciamento de fragmentos de DNA amplificados por RAPD. A análise de CAPS é versátil e pode ser combinada com a técnica SCAR, AFLP ou RAPD para aumentar a possibilidade de encontrar polimorfismo de DNA (AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008).

Thiel et al. (2004), por exemplo, analisaram 413 sequências de alinhamentos múltiplos derivadas ESTs para a identificação de polimorfismos nos sítios de restrição e posterior conversão de SNPs em marcador CAPS em seis cultivares de cevada (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) e uma da espécie selvagem *H. vulgare* spp. *spontaneum*. 204 das sequências alinhadas apresentaram apenas SNPs, 19 revelaram InDels (inserções ou deleções) e 91 dos alinhamentos restantes SNPs e InDels juntos. Dos 314 alinhamentos, 90%

apresentaram marcadores CAPS com a ocorrência de sítio único para endonuclease de restrição. As enzimas selecionadas efetuaram cortes nos produtos da PCR produzindo fragmentos com tamanhos em número e tamanhos como predito na análise das sequências ESTs.

SNPs podem ser responsáveis por mais de 90% da variação no genoma de muitos organismos. A frequência habitual de SNPs relatados para genomas de plantas é de cerca de 1 SNP a cada 100-300 pb (GUPTA et al., 2001). Na maioria dos organismos estudados até agora, SNPs são mais frequentes nas regiões não codificantes do genoma. Dentro da região codificante um SNP pode não ser sinônimo mudando a sequência de um aminoácido, ou quando sinônimo não altera a sequência do aminoácido sendo então chamado de neutro (SUNYAEV et al., 1999; SHEN et al., 2005). Devido à alta frequência de ocorrência nos genomas, os SNPs são uma rica fonte de variabilidade que podem ser utilizados para saturar mapas genéticos, e também são potencialmente úteis para associação de mapeamento de características interessantes (ALVES, 2008).

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, a ervilha (*Pisum sativum* L.), a soja e a alfafa (*Medicago sativa* L.) (EHLERS; HALL, 1997; BENKO-ISEPPON, 2001). O mesmo ocorre em recursos genômicos como bibliotecas de ESTs e bibliotecas SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*). 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.

2.2.2 Marcadores moleculares e desenvolvimentos de mapas de ligação

O desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares na análise genética de espécies e, potencialmente, no melhoramento de plantas. No contexto do melhoramento de plantas, os mapas genéticos possibilitam a cobertura e análise completa de genomas, a decomposição de características genéticas complexas nos seus componentes mendelianos, a localização de

regiões genômicas que controlam caracteres de importância, a quantificação do efeito dessas regiões na característica estudada e a canalização de toda essa informação para uso em programas de melhoramento (FALEIRO et al., 2003).

O mapeamento de caracteres agronômicos em uma espécie exige a utilização de uma população segregante e a avaliação fenotípica destas características. Assim sendo, estudos de segregação genética e testes estatísticos para a detecção de associações podem ser realizados. Geralmente, populações F_2 ou retrocruzamentos F_1 são empregados com este objetivo; entretanto, para plantas de autofecundação, populações de linhagens homozigotas desenvolvidas pelo método de SSD (*Single Seed Descent*) ou duplo-haplóides são preferencialmente utilizadas. A facilidade de manutenção e multiplicação dos genótipos a serem estudados para o mapeamento é uma das vantagens da utilização de linhagens homozigotas (BERED et al., 1997).

Dois métodos podem ser utilizados para agilizar a identificação de marcadores ligados a um gene ou a uma região genômica: a análise em linhagens quase isogênicas (NIL's - *Near Isogenic Lines*) ou a análise de populações segregantes com fenótipos contrastantes, pela técnica de análise de *bulks* segregantes (MICHELMORE et al., 1991).

A análise de *bulks* segregantes (*Bulked Segregant Analysis*, BSA), envolve a comparação de duas misturas (*pools*) de amostras de DNA dos indivíduos que apresentam o mesmo fenótipo para determinada característica, provenientes de uma população segregante originária de um único cruzamento. Dentro de cada "*pool*" ou "*bulk*", os indivíduos são identificados para características ou gene de interesse, mas são arbitrários para todos os outros genes. Dois *bulks* contrastantes para uma característica (por exemplo: resistência ou suscetibilidade a uma doença particular) são analisados para identificar marcadores que os distinguem. Assim, o marcador que co-segrega com os "*bulks*" tem grande probabilidade de estar ligado à característica avaliada (ZAMPROGNO, 2005).

Esta abordagem foi, entre outras, da maior importância na cultura da leguminosa grão-de-bico, que apresenta comportamento reprodutivo, número de grupos de ligação e tamanho de gerações semelhantes a *V. unguiculata*, com a identificação de três regiões genômicas importantes para o melhoramento da cultura (resistência a duas raças de *Fusarium* e a *Ascochyta*) através de mapeamento fino e *chromosome walking* (WINTER et al., 2000; BENKO-ISEPPON et al., 2003; RAKSHIT et al., 2003).

A técnica de BSA com marcadores aleatórios RAPD também foi utilizada com sucesso em população de mapeamento de *Vigna radiata* por Chen et al. (2007) identificando marcadores ligados a genes de resistência ao caruncho (*Callosobruchus chinensis* L.).

Os mapas genéticos desenvolvidos para espécies do gênero *Vigna* podem ser classificados em dois grupos distintos: mapas de referência, com o objetivo de servir de base para pesquisas futuras (CHAITIENG et al., 2006; HAN et al. 2005; OUÉDRAOGO et al., 2002), e mapas específicos, que visam localizar genes de interesse, como genes de resistência a doenças e pragas.

Kaga et al. (1996) construíram um dos primeiros mapa de ligação para *V. angularis* a partir de uma população F₂ resultante do cruzamento interespecífico dessa espécie com seu parente silvestre (*V. nakashimae* (Ohwi) Ohwi & Ohasshi). Um total de 132 marcadores foram mapeados, sendo 108 RAPDs, 19 RFLPs e cinco marcadores morfológicos, em 14 grupos de ligação, cobrindo 1,250 cM do genoma.

O primeiro cruzamento intra-específico de feijão-caupi 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 os marcadores gerados eram na sua maioria monomórficos. Ouédraogo et al. (2002) utilizando a população de mapeamento empregadas por Menéndez et al. (1997), nesse caso em F₉, construíram o mais avançado mapa de ligação de referência para o genoma de feijão-caupi, tanto em relação à cobertura do genoma, como em relação à densidade de marcadores. Além do mapa em si, foram identificados marcadores associados a várias características de interesse agrônomo, tais como resistência a duas raças de *Striga gesnerioides*, nematóide das galhas, viroses e fungos. Vale salientar, no entanto, que não existem mapas genéticos associados a marcadores moleculares desenvolvidos a partir de cruzamentos com cultivares brasileiras de feijão-caupi (BENKO-ISEPPON, 2001).

O trabalho de Myers et al. (1996) também ocupa papel de destaque no que concerne ao mapeamento de genes agronomicamente importantes, ou genes que controlam características de resistência a pragas. Nesse estudo foram cruzadas duas cultivares de feijão-caupi contrastantes para característica de resistência ao pulgão *Aphis craccivora* (Koch), sendo utilizada a técnica de RFLP para detectar a presença de ligação entre o gene *Rac 1*, de resistência a esse pulgão, e marcadores RFLP. Como resultado, foram encontrados um marcador RFLP (o bg4D9b) fortemente ligado ao gene de resistência *Rac 1*, e vários marcadores flanqueando esse gene no mesmo grupo de ligação. A forte ligação entre o gene

Rac 1 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 pode ser empregada para o desenvolvimento de cultivares resistentes ao pulgão.

Em relação a doenças, Souframanien e Gopalakrishna (2006), utilizando marcadores ISSR, identificaram o marcador (ISSR8111₃₅₇) ligado ao gene de resistência ao vírus da família *Geminiviridae*, *Mungbean yellow mosaic virus* (MYMV), usando para isso uma população segregantes F₈ do cruzamento entre *V. mungo* (cv. TU 94-2) e *V. mungo* var. *silvestris*. O marcador ISSR8111₃₅₇ foi sequenciado e convertido em SCAR. O SCAR foi testado nas RILs e distinguiu as plantas resistentes e suscetíveis, concordando com os dados fenotípicos. O marcador ISSR8111₃₅₇ também foi validado usando diferentes genótipos contrastantes para resistência ao MYMV. O marcador é considerado útil para o desenvolvimento de genótipo de *V. mungo* resistentes ao MYMV, uma vez que co-segrega com o gene de resistência.

Marcadores SSR também têm sido empregados com sucesso para propósitos de saturação de mapas genéticos no gênero *Vigna*. A maior vantagem dos marcadores microssatélites é que eles são facilmente transferíveis de um mapa para outro, sendo muito úteis também no alinhamento de mapas. Chaitieng et al. (2006) desenvolveram o primeiro mapa de ligação para *V. mungo* com 148 marcadores, sendo 61 SSR, 56 RFLPs, 27 AFLPs e 1 marcador morfológico. Os marcadores formaram 11 grupos de ligação com uma distância média entre os marcadores de 5,7 cM, totalizando 768 cM. O mapa de ligação construído quando comparado com o mapa de *V. angularis* (HAN et al., 2005) mostra que a conservação na ligação entre os locos e a ordem dos marcadores SSR é alta.

Onofre et al. (2008), avaliaram 20 microssatélites desenvolvidos para espécies do gênero *Vigna* por diferentes grupos de pesquisa, analisando a transferibilidade dos mesmos para o feijão-caupi concluindo que devido à conservação dos sítios que flanqueiam os microssatélites, é possível amplificar *primers* heterólogos nas diferentes espécies do gênero. Dos iniciadores analisados 19 foram consistentemente polimórficos e transferíveis, sendo então recomendados para o desenvolvimento de mapas de ligação em feijão-caupi e estudo de sintenia.

Os bancos de dados EST e os transcritos ou *tags* obtidos pela técnica de SAGE fornecem um recurso útil para desenvolvimento de marcadores. Existem várias vantagens em realizar estudos genéticos com marcadores EST-PCR ou outros baseados em cDNA em relação aos que utilizam os *primers* aleatórios. Eles marcam genes expressos e, portanto são

particularmente úteis para o mapeamento fino e de QTL. Se um marcador EST-PCR é encontrado ligado a um QTL é possível que o gene, a partir do qual o marcador EST-PCR foi derivado, controle a característica em questão. Pelo fato de serem originados de regiões codificadoras, que são mais conservadas entre populações e espécies do que as não codificadoras, os marcadores EST-PCR são úteis para o estudo de mapeamento comparativo (ROWLAND et al., 2003).

Os EST-PCR foram derivados para várias espécies vegetais e têm sido amplamente usados para diversas aplicações (VARSHNEY et al. 2005; LINDQVIST et al. 2006; JING et al. 2007; MIURA et al. 2007; PROITE et al. 2007). Esta tecnologia é particularmente importante para feijão-caupi, e poucos trabalhos utilizando marcador gene-específicos nesta cultura foram desenvolvidos.

Das et al. (2008) desenharam marcadores SFP (*Single Feature Polymorphism*) para feijão-caupi baseados em genes de soja. Os autores sugerem que estes marcadores possibilitam uma série de pesquisas relacionadas ao entendimento da herança e identificação de regiões genômicas associadas à resistência/tolerância a estresses bióticos e abióticos.

Correia et al. (2008) identificaram motivos SSRs em ESTs do projeto NordEST/Renorbio a partir de 4.919 sequências, gerando oito marcadores polimórficos. Segundo os autores, este trabalho ratifica que o conhecimento da ocorrência e frequência de sequências repetidas nos genomas é importante não apenas para um entendimento de sua distribuição, mas, também, para direcionar o desenvolvimento de marcadores SSR específicos para uso em análises genéticas.

A atual disponibilidade de técnicas de marcadores moleculares, as quais fornecem um elevado número de polimorfismo, permitirá grandes avanços no mapeamento genético de feijão-caupi nos próximos anos em relação a vários fatores determinantes na produção.

3 OBJETIVO

- Construção de um mapa de ligação, utilizando-se linhas endogâmicas recombinantes F_{6-7} , resultantes de cruzamento entre os acessos BR 14-Mulato e IT85F-2687, com marcadores moleculares do tipo ISSR, DAF e CAPS. Tal mapa será utilizado futuramente na identificação de QTL e detecção de associações com características morfológicas e produtivas importantes (principalmente resistência a patógenos e às condições climáticas do nordeste brasileiro), bem como a integração de EST de interesse.

4 METODOLOGIA

4.1 Avaliação da resistência das RILs ao CPSMV

Uma população segregante composta por 368 linhagens endogâmicas recombinantes (RILs) de feijão-caupi foi obtida pela Embrapa Meio-Norte e cultivada em casa de vegetação, a partir do cruzamento dos genitores BR 14-Mulato e IT85F-2687 contrastantes para várias características de interesse agrônomo (Tabela 1).

Tabela 1 - Descritores agrônômicos dos genótipos parentais BR 14-Mulato e IT85F-2687.

Características agrônômicas	Parentais	Mapeamento
	BR 14-Mulato ♂	IT85F-2687 ♀
Hábito de crescimento	indeterminado	indeterminado
Porte	prostrado	prostrado
Tipo de folha	globosa	semi-lanceolada
Cor da flor	roxa	branca
Cor do estandarte	roxo	branco
Cor do cálice	verde	roxo
Cor da quilha	branca	branca
Cor da asa	roxa	branca
Cor da vagem imatura	verde	verde
Cor da vagem na maturidade fisiológica	amarela	roxa
Cor da vagem na maturidade de colheita	amarela	roxa
Comprimento da vagem	20 cm	16,5 cm
Número de grãos por vagem	17	12
Nível de inserção das vagens	acima da folhagem	acima da folhagem
Forma da semente	rombóide	reniforme
Cor de tegumento	marrom	branco
Peso de 100 grãos	16g	14g
Produtividade de grãos sob sequeiro	833 kg/ha	1.725kg/ha
Produtividade de grãos sob irrigação	1.968 kg/ha	-
Classe comercial	cores	branco
Subclasse comercial	mulato	branco
Número de dias para a floração plena	45-55dias	40-45dias
Ciclo	65 – 75 dias	65-70dias
Reação ao <i>Cowpea severe mosaic virus</i>	resistente	suscetível
Reação ao <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i>	suscetível	imune
Reação ao <i>Cumcuber mosaic virus</i>	-	imune
Reação ao <i>Cowpea golden mosaic virus</i>	altamente resistente	altamente resistente
Reação ao Oídio (<i>Erysiphe polygoni</i>)	moderadamente resistente	moderadamente resistente

Fonte: Embrapa Meio-Norte.

A avaliação da resistência das 221 linhas endogâmicas recombinantes F₇ ao CPSMV foi feita com base em ensaio conduzido na casa de vegetação do Departamento de genética da Universidade Federal de Pernambuco no período de março a dezembro de 2007.

O isolado do CPSMV utilizado neste estudo foi proveniente de plantas cultivadas na casa de vegetação do Depto. de Agronomia da UFRPE (Universidade Federal Rural de Pernambuco), infectadas por mosaico severo e apresentando sintomas típicos de mosaico e bolhosidade nas folhas. A inoculação foi realizada por meio da fricção de gaze embebida de extrato foliar, obtido por maceração de folhas infectadas em tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0 acrescido de 0,1% de sulfito de sódio, na proporção de 1:10 (p/v) sobre a superfície das folhas, previamente polvilhadas com Carborundum 600 *mesh*. Após isso, as folhas foram pulverizadas com água destilada para remoção do excesso de inóculo.

A avaliação sintomatológica foi realizada duas semanas após a inoculação mediante inspeção visual efetuada independentemente por quatro avaliadores. Foram consideradas suscetíveis, plantas com sintomas evidentes de mosaico, bolhosidades ou distorções foliares, enquanto as que não apresentavam sintomas foram consideradas resistentes. Como controle, foi feita inoculação em dois indivíduos de cada parental.

Todas as plantas assintomáticas foram testadas por dupla difusão em ágar em placas com anti-soro contra o CPSMV no Laboratório de Fitovirologia do Departamento de Agronomia da UFRPE. Para realização dos testes de dupla difusão em ágar, foram abertos orifícios em géis constituídos de Agar Noble (0,85%), azida de sódio (0,05%), NaCl (0,85%) e água destilada, preparados em placas de Petri. As amostras foram maceradas individualmente na presença de água destilada na proporção 1:2 (p/v), sendo os extratos obtidos depositados em orifícios abertos, em arranjos hexagonais, constituídos de um orifício central e seis periféricos. Nos orifícios externos foram colocados os extratos das plantas a serem testados (antígenos) e nos centrais o anti-soro específico para o CPSMV. Em todos os testes foram incluídos, como controle, extratos de plantas sadias e extratos de plantas infectadas. As placas foram mantidas em câmara úmida em temperatura ambiente por 12 a 18 h, sendo observadas quanto à presença de faixas de precipitação resultantes das combinações específicas entre antígeno e anticorpo.

4.2 Genotipagem das RILs por meio de marcadores moleculares

4.2.1 Extração de DNA

O isolamento do DNA genômico dos parentais e das 92 linhas endogâmicas recombinantes F₆ foi realizado usando-se folhas frescas, ou congeladas em freezer a -80°C, segundo a metodologia descrita em Weising et al. (1995). Este protocolo usa quantidades significativas de tecido vegetal (4 a 8 g de tecido), sendo recomendado para obtenção de grandes quantidades de DNA, necessárias, por exemplo, para avaliação em série de genótipos com diversos marcadores, ou ainda para materiais que necessitem de etapas de purificação posteriores.

Cerca de 4 g de folhas frescas foram lavadas e trituradas em almofariz com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Após transferência do macerado para tubos de polipropileno de 50 mL, foram adicionados 12 mL de tampão de extração (2% CTAB; 0,1 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA pH 8,0; 1,4 M NaCl; 2% β-mercaptoetanol) a 60 °C. Os tubos foram mantidos a 60°C por 30 min sob agitação periódica para completa homogeneização. Após o resfriamento, foi adicionado ao extrato o mesmo volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), efetuando-se uma homogeneização seguida de centrifugação por 20 min a 4000 rpm. O sobrenadante resultante foi transferido para um novo tubo, adicionando-se 0,6 volume de isopropanol (7,5 mL), misturando-se cuidadosamente por inversão, seguido de incubação por 10 min a -20°C. Após este período, os tubos foram centrifugados a 4000 rpm por 20 minutos, ocorrendo assim a precipitação do DNA. O *pellet* foi lavado com etanol 70%. Ao DNA precipitado foram adicionados 5 mL da solução de precipitação de polissacarídeos (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 25 mM NaCl) contaminantes conforme descrito por Michaels et al. (1994). O DNA obtido foi ressuspensionado em 500 µL de solução TE (10 mM de Tris e 1 mM de EDTA, pH 8,0) e RNase numa concentração de 10 µg/mL e incubado à 37 °C por 1 hora para digestão do RNA. A quantificação do DNA foi efetuada pelo método comparativo em gel de agarose a 1,2% usando-se diferentes concentrações de λ-DNA como referencial.

4.2.2 Marcadores DAF

A geração de marcadores DAF seguiu metodologia descrita por Caetano-Anollés et al. (1991), com as modificações introduzidas por Winter et al. (2000) e Benko-Iseppon et al. (2003), utilizando-se 1 ng/μL de DNA molde, 1,5 μL 10x PCR buffer, 2,5 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTP-mix (Fermentas), 50 μM de *primer* e 0,7 U de ‘*Taq* DNA polimerase’ (Fermentas ou LGC), ajustando-se o volume final de 15 μL com H₂O bidestilada estéril.

A amplificação da reação ocorreu em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradiente, com 2 min de desnaturação inicial a 95°C, seguidos de 40 ciclos compostos de três etapas: desnaturação de 15 seg a 95°C; anelamento de 1 min a 35°C e alongamento final de 2 min a 72°C. Ao final dos 40 ciclos a reação foi completada com um alongamento final de 2 min a 72°C, permanecendo a 4°C até seu processamento. As reações foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,8%, corado com brometo de etídio a 0,5 μg/mL, onde os produtos da amplificação foram separados sob uma voltagem constante de 70 Volts durante 4 horas.

Para a análise DAF, foram testados 71 oligonucleotídeos randômicos nos parentais que deram origem à população segregante.

4.2.3 Marcadores ISSR

De um conjunto de 100 *primers* (UBC set nº 9) obtidos do Laboratório de Biotecnologia da Universidade de British Columbia, 89 *primers* foram testados para amplificação via PCR, usando os parentais. Os marcadores ISSR seguiram o protocolo de Bornet e Branchard (2001) otimizado para o presente estudo. As reações de PCR foram conduzidas em um volume final de 20 μL contendo: 0,7 U de enzima ‘*Taq* DNA polimerase’, tampão da enzima 1 X, 2,5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 50 μM de *primer* e 25 ng de DNA genômico. O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento do *primer* a 49,7-58°C (dependendo do *primer*) por 35 seg e extensão a 72°C por 2 min, seguida de extensão final por 7 min a 72°C. A amplificação foi separada por eletroforese em gel de agarose a 1,8% contendo

brometo de etídio a 0,5 µg/mL em tampão de TBE 0,5 X, sendo visualizados e fotografados sob luz ultra-violeta.

4.2.4 Marcadores EST e geração de marcadores CAPS

Foram utilizados 277 *primers* universais para amplificar regiões específicas do genoma dos parentais do mapa, disponíveis no banco de ESTs de ervilha, *Medicago truncatula* e *Lotus japonicus* a partir de uma lista de 459 sequências (<http://bioweb.abc.hu/cgimt/pisprim/pisprim>) e buscas no NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov>).

As reações de amplificação foram compostas de 2,5 µL de DNA genômico a 5 ng/µL, 2,5 µL tampão 10x, 1,8 mM MgCl₂, 10 mM de dNTPs, 5 µM *primer* e 0,1 U ‘*Taq* DNA polimerase’ a 5 U/µL, sendo o volume final da reação ajustado para 25 µL. As amplificações foram feitas em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient programado para uma desnaturação inicial de 4 min a 94°C, seguida de 40 ciclos, cada qual constituído pela seguinte sequência: desnaturação de 30 seg a 94°C, anelamento a 58°C durante 60 seg, e extensão de 2 min a 72°C. Após 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de 10 min a 72°C. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 2% em tampão TBE 0,5X e corados com brometo de etídeo. Após coloração o gel foi fotografado sob luz ultravioleta, para documentação de bandas e possíveis polimorfismos em seus pesos moleculares.

As regiões de EST que não foram polimórficas entre os parentais, foram digeridas por 21 endonucleases (*AluI*, *AflIII*, *AvaII*, *BpmI*, *BsmI*, *BpsmI*, *Bpu10I*, *CellI*, *DraI*, *HpaII*, *HinfII*, *Hpy188*, *MboI*, *MboII*, *MseI*, *NlaIII*, *RsaI*, *SfaI*, *TruI*, *TaqI*, *XapI*) visando à geração de marcadores CAPS.

4.3 Construção do mapa de ligação

As análises de ligação foram feitas usando-se o programa Mapmaker, versão 2.0 (LANDER et al., 1987). Um LOD score mínimo de 3 e uma fração de recombinação máxima (θ) de 0,40 foram utilizados como parâmetros para o estabelecimento dos grupos de ligação, usando-se a função “*group*”. Em seguida, o LOD mínimo foi reduzido para 2, a fim de incluir novos marcadores. A ordem mais provável dos marcadores em cada grupo de ligação foi estimada pelo método de máxima verossimilhança, usando a função “*first order*”. As ordens dos marcadores foram confirmadas por comparações das verossimilhanças (LOD scores) de todas as possíveis ordens usando o comando “*compare*” e por permutações de todas as trincas de marcadores adjacentes (função “*ripple*”). As frações de recombinação foram convertidas em distâncias de mapa, em centimorgans (cM), usando a função de mapeamento de Kosambi, que leva em consideração a interferência (I).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da resistência das RILs ao CPSMV

Foi possível distinguir com facilidade os indivíduos suscetíveis (n=137) dos resistentes (n=84), uma vez que os primeiros apresentaram sintomas inequívocos de mosaico severo, bolhosidade nas folhas e necrose nos caules (Figura 1), enquanto que os indivíduos resistentes não apresentaram sintomas.

Os sintomas de suscetibilidade e de resistência observados no ensaio incluíram mosaico e deformações foliares em plantas suscetíveis e lesões necróticas em plantas resistentes sem a presença de sintomas sistêmicos. Durante a fenotipagem, ainda foi possível observar clara distinção nas reações dos genótipos parentais, tendo sido observado mosaico apenas no genótipo suscetível.

Em testes de dupla difusão em ágar a formação de linha de precipitação foi observada apenas nos indivíduos suscetíveis (Figura 2), claramente identificados pelos sintomas descritos.

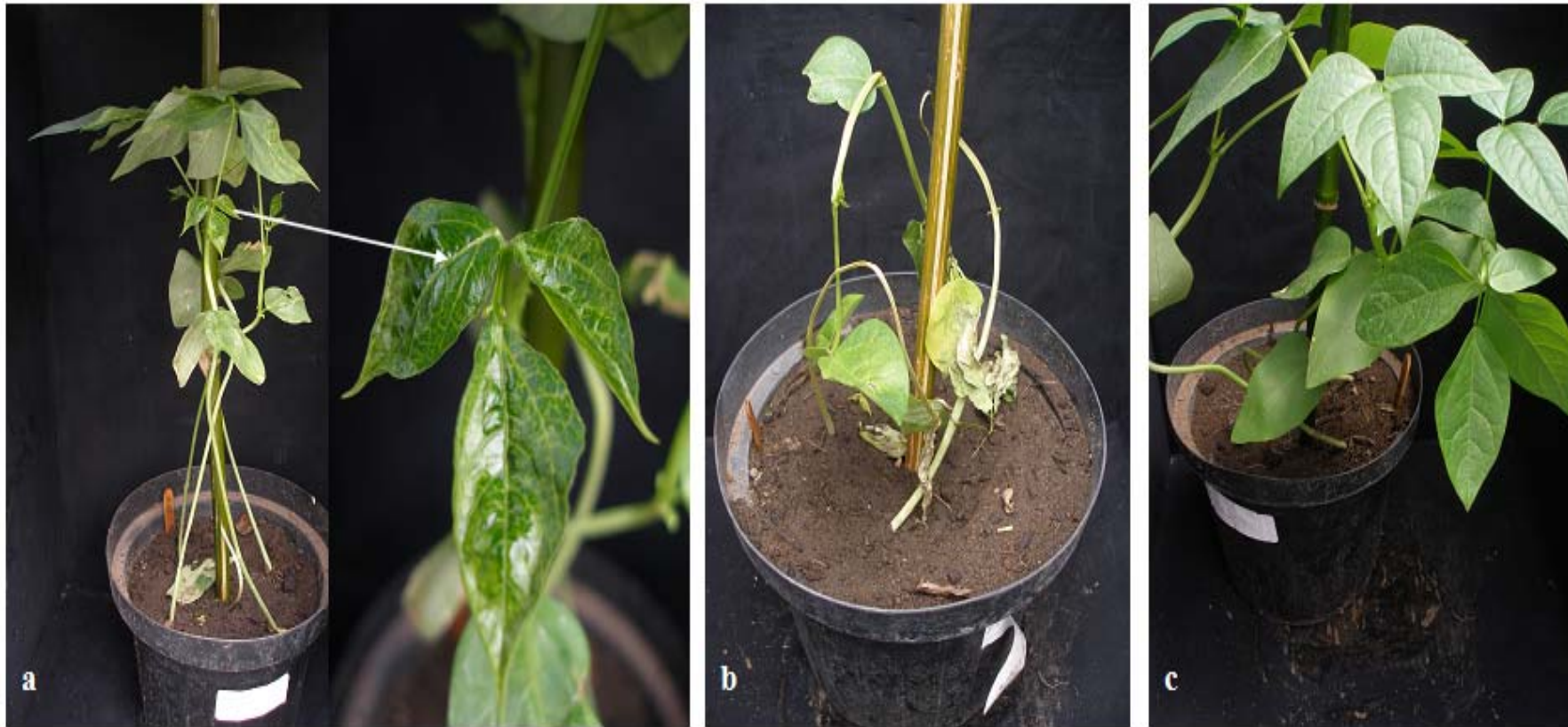


Figura 1. Plantas da população segregante de feijão-caupi inoculadas com o *Cowpea severe mosaic virus*, CPSMV. (a) e (b) plantas suscetíveis com mosaico severo, bolhosidade e necrose do caule e das folhas (seta indica ampliação da imagem); (c) planta resistente assintomática.

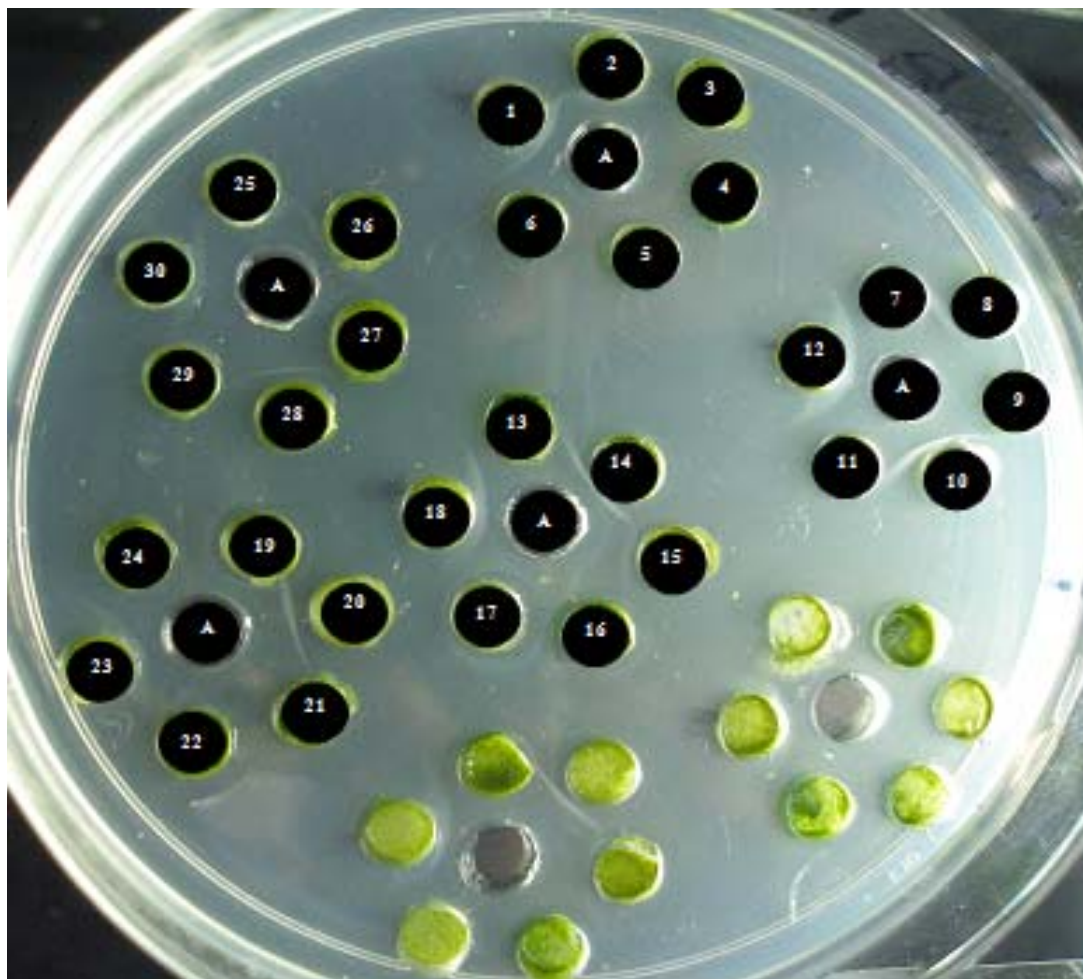


Figura 2. Teste de dupla difusão em ágar com anti-soro para o isolado *Cowpea severe mosaic virus*, CPSMV. A) Anti-soro contra o CPSMV; 1, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 26, 28 e 30 extratos de plantas infectadas com CPSMV; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 15, 16, 17, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 27 e 29 extrato de plantas saudáveis.

5.2 Amplificação dos locos DAF, ISSR e EST

Para a etapa de seleção de *primers* DAF foram testados 71 oligonucleotídeos randômicos nos parentais (BR 14-Mulato e IT85F-2687), sendo selecionados 48 *primers* mais informativos (42 decâmeros, dois 11-mero e quatro 15-meros), baseando-se principalmente na presença/ausência e intensidade do loco, bem como na sua reprodutibilidade (Tabela 3).

Os 48 *primers* permitiram a amplificação de 563 bandas, sendo que 126 foram polimórficas entre os parentais e seis (HPBIII, B17, Z10, R260-10, R160-9 e 15-3) foram aplicados na população segregante F₆.

A Figura 3 mostra os perfis de sequências aleatórias DAF no genoma dos parentais do mapa e a Figura 4 na população segregante.

Tabela 2- *Primers* mais informativos pela metodologia de DAF, incluindo número de bandas polimórficas e o número total nos parentais (BR 14-Mulato e IT85F-2687).

Nº	Nome	Sequência do <i>Primer</i>	Polimorfismos	Nº de Total de Fragmentos
		5'→3'		
1.	B-07	GGTGACGCAG	4	12
2.	G-10	AGGGCCGTCT	4	15
3.	G-06	GTGCCTAACC	4	18
4.	B-09	TGGGGGACTC	4	14
5.	F-10	GGAAGCTTGG	3	14
6.	D13	GGGGTGACGA	3	18
7.	15_7a	GAACCTACGGTGAAG	3	17
8.	J-16	CCACACTACC	3	10
9.	R160-9	CGTCGTTACC	3	13
10.	G-12	CAGCTCACGA	3	13
11.	15_19	CTATGCCGACCCGAC	3	14
12.	D-7	TTGGCACGGG	3	10
13.	J-12	GTCCCGTGGT	3	11
14.	N-7	CAGCCCAGAG	3	12
15.	R260-10	GACCGACACG	3	9
16.	A-14	TCTGTGCTGG	3	10
17.	15_3	TGCGTGCTTGAGAGA	3	14
18.	D-13	GGGGTGACGA	3	14
19.	D-5	TGAGCGGACA	3	13
20.	I-16	TCTCCGCCCT	3	5
21.	N-5	ACTGAACGCC	3	11
22.	E-12	TTATCGCCCC	3	12
23.	U03-1	CTATGCCGAC	3	9
24.	A-04	AATCGGGCTG	3	10
25.	15-1	GGAAGCCAAC	3	12
26.	G-05	CTGAGACGGA	3	11
27.	J-13	CCACACTACC	3	13
28.	OPE-6	AAGACCCCTC	3	12
29.	G-08	TCACGTCCAC	3	10
30.	C02	GTGAGGCGTC	3	12
31.	M-14X	AGGGTCGTTT	3	12
32.	L-5	ACGCAGGCAC	2	12
33.	K-14	CCCGCTACAC	2	12
34.	D12	CACCGTATCC	2	21
35.	G-04	AGCGTGTCTG	2	9
36.	K-4	CCGCCCAAAC	2	10
37.	L-03	CCAGCAGCTT	2	14
38.	AIV	GCGAAAGCCAA	2	15
39.	L-17	AGCCTGAGCC	2	11
40.	H-5	AGTCGTCCCC	2	10
41.	B-17	AGGGAACGAG	2	12
42.	W16	CAGCCTACCA	2	12
43.	OPH-1	GGTCGGAGAA	2	7
44.	15-12	AGGTCTTGGGTAGGC	1	9
45.	I-5	TGTTCCACGG	1	5
46.	HPB III	GCGACAGCAGA	1	11
47.	R460-2	GCAGGATACG	1	6
48.	Z10	CCGACAAACC	1	7

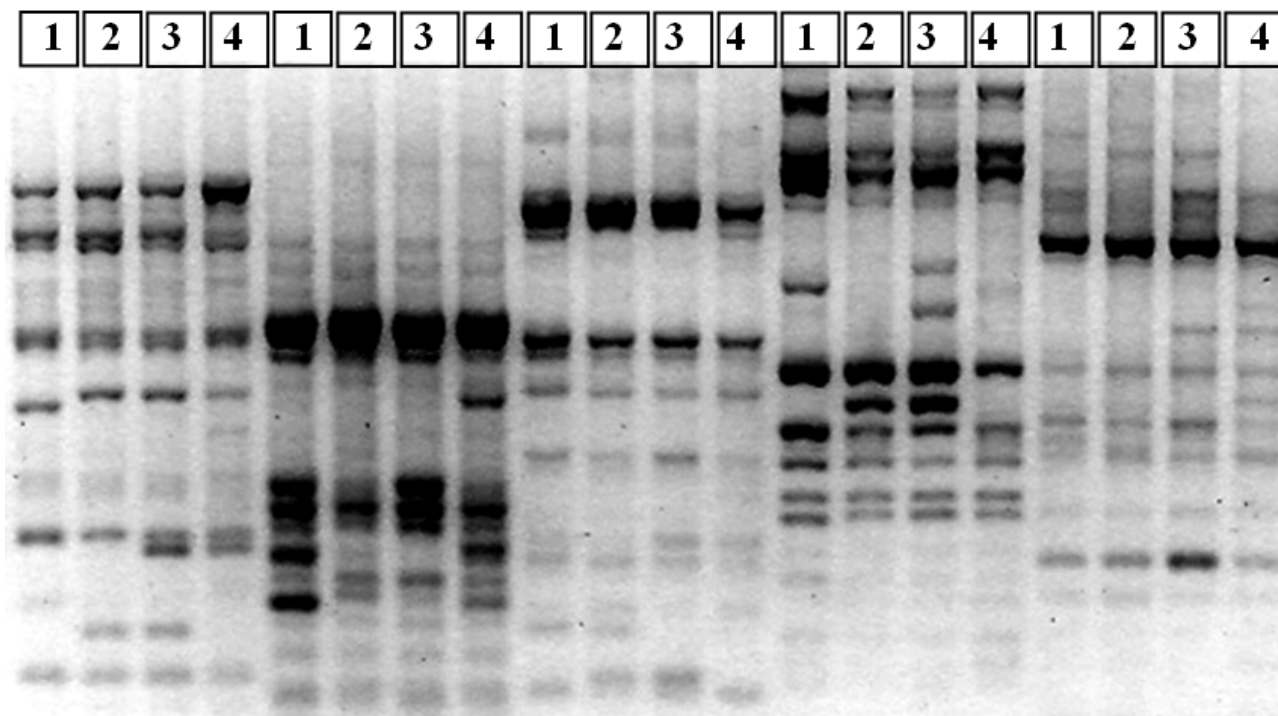


Figura 3. Amplificações com marcadores DAF nos parentais BR 14-Mulato (1) e IT85F-2687 (2) e no cruzamento teste IT86D-716 (3) e TVU 382 (4) usando os primers 15-3, 15-2, 15-19, 15-17a, B17.

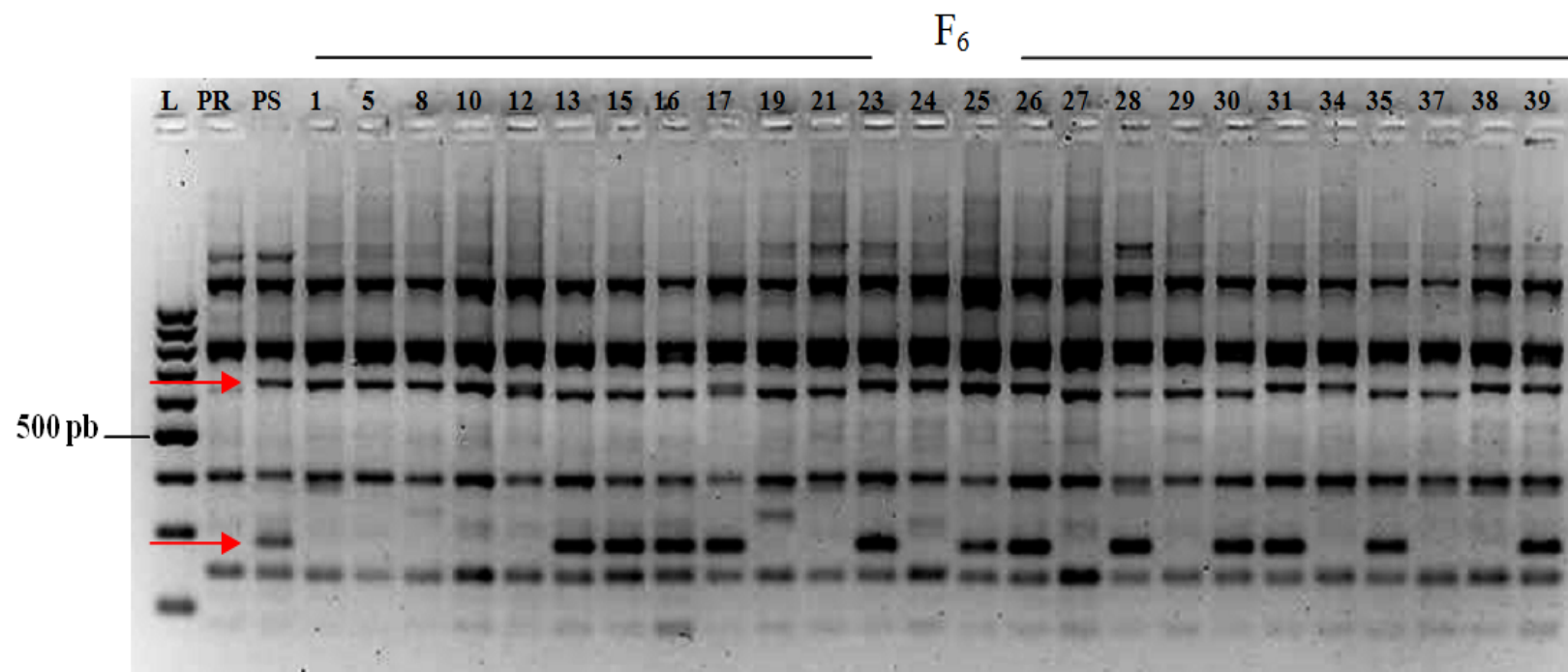


Figura 4. Gel da reação de amplificação do primer DAF- 15-3. As setas apontam bandas polimórficas entre os genitores. Siglas: L = ladder 100 pb fermentas, PR= parental resistente ao CPSMV, PS = parental suscetível ao CPSMV, números de 1 a 39 representam indivíduos da população segregante de feijão-caupi.

Dos 89 *primers* ISSR testados, 32 não amplificaram, 23 amplificaram apenas locos monomórficos e 34 foram informativos entre os parentais com uma média de 2,1 bandas polimórficas (Tabela 4). Para obter um maior número de marcas ISSR informativas, alguns marcadores foram testados aos pares, gerando 11 bandas polimórficas.

Os fragmentos amplificados por PCR com 85 *primers* ESTs dos mapas de *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula* e *Pisum sativum* produziram bandas únicas que variaram em tamanho de 200 a 1200 pares de bases, sendo todas monomórficas (Tabela 5). Os fragmentos foram então digeridos por 21 endonucleases visando à geração de polimorfismos informativos via marcadores CAPS (Tabela 6). A figura 5 mostra os fragmentos obtidos com a utilização do marcador ASN2 seguida de digestão com a enzima de restrição *NlaIII*

Tabela 3 - Marcadores ISSR que geraram bandas polimórficas entre os parentais (BR 14-Mulato e IT85F-2687).

<i>Primer</i>			Polimorfismo e Número total de fragmentos	
UBC	Repetições	Ta (°C)	Polimorfismo	Total
808	(AG) ₈ C	52, 8	3	9
809	(AG) ₈ G	52, 8	2	11
810	(GA) ₈ T	50,4	2	9
812	(GA) ₈ A	50,4	1	9
816	(CA) ₈ T	50,4	4	9
818	(CA) ₈ G	52, 8	1	8
824	(TC) ₈ G	51,9	1	3
826	(AC) ₈ C	52, 8	1	9
828	(TG) ₈ A	52, 8	1	10
830	(TG) ₈ G	52, 8	1	6
834	(AG) ₈ YT	52, 8	2	10
836	(AG) ₈ YA	54,0	2	5
841	(GA) ₈ YC	52, 8	1	12
842	(GA) ₈ YG	54,0	4	12
844	(CT) ₈ RC	52, 8	1	6
847	(CA) ₈ RC	54,0	1	6
849	(GT) ₈ YA	52, 8	2	12
850	(GT) ₈ YC	54,0	3	11
851	(GT) ₈ YG	54,0	2	9
856	(AC) ₈ YA	52,0	1	13
858	(TG) ₈ RT	52,0	1	9
859	(TG) ₈ RC	54,0	3	10
862	(AGC) ₆	58,0	1	8
864	(ATG) ₆	51,9	3	10
869	(GTT) ₆	50,4	1	2
873	(GACA) ₄	52,0	1	9
878	(GGAT) ₄	52,0	1	9
879	(CTTCA) ₃	49,7	1	16
880	(GGAGA) ₃	49,7	2	14
886	VDV(CT) ₇	52,0	2	15
887	DVD(TC) ₇	52,0	2	13
888	BDB(CA) ₇	52,0	3	12
889	DBD(AC) ₇	52,0	3	19
891	HVH(GT) ₇	52,0	3	12
811x807	(GA) ₈ C x (AG) ₈ T	52,0	2	16
807x841	(AG) ₈ Tx (GA) ₈ YC	52,0	2	14
811x857	(GA) ₈ C x (AC) ₈ YG	52,0	2	13
808x857	(AG) ₈ C x (AC) ₈ YG	52,0	3	12
810x857	(GA) ₈ T x (AC) ₈ YG	52,0	2	16

R = (A,G); Y = (C,T); B = (C,G,T); D = (A,G,T) (i.e. not C); H = (A,C,T) (i.e. not G), V = (A,C,G) (i.e. not T)

Tabela 4 - Designação dos *primers* EST de leguminosas que produziram bandas únicas nos parentais do mapa, bem como tamanho dos fragmentos gerados em pares de bases (pb). Organismos e sequências dos primers citados encontram-se disponíveis em <http://bioweb.abc.hu/cgimt/pisprim/pisprim>.

<i>Primer</i>	<i>pb</i>	<i>Primer</i>	<i>pb</i>	<i>Primer</i>	<i>pb</i>	<i>Primer</i>	<i>pb</i>	<i>Primer</i>	<i>pb</i>
1GM	1200	mtmt_50_03	1000	mtmt_076_01_1	400	mtmt_GEN_01027_04	350	mtmt_GEN-00312_13	800
3 GM	500	mtmt_58_10	200	mtmt_346_09_1	1150	mtmt_578_04	350	mtmt_GEN_00251_06	300
4 GM	800	mtmt_GEN_00074_07_5	350	mtmt_595_10	350	mtmt_547_02	400	ASN2	450
7 GM	300	mtmt_GEN_00075_02_1	400	mtmt_367_05	500	mtmt_385_06	600	mtca_EST_219_	300
Leg036	1000	mtmt_3179_	400	mtmt_359_07	650	mtmt_00336_11	380	mtca_EST_00229_02_1	400
11 GM	1100	mtmt_992_02	370	mtmt_400_07_1	500	mtmt_281_02_1	500	mtca_EST_00211_09_1	700
17 GM	700	mtmt_1114_05_01	400	mtmt_348_03	500	mtmt_3174_07	230	Pis_GEN_10_1_1	500
20 GM	1000	mtmt_355_07_3	1000	mtmt_GEN_312_13_3	500	mtmt_3188_06_08	1100	Pis_GEN_11_2_1	200
23 GM	650	mtmt_444_11	350	mtmt_1152_06	520	mtmt_859_06	1000	Pis_GEN_27_2_1	400
TC 811	1000	mtmt_3186_02	550	mtmt_853_01	500	mtmt_3302_02_4	700	Pis_GEN_21_1_1	450
TC 987	1200	mtmt_237_01	750	mtmt_932_02_1	1000	mtmt_DEG_3328_03_01	500	psat_EST_00176_01_4	600
mtmt_01_1	450	mtmt_00018_01_1	850	mtmt_423_02	600	mtmt_3370_04_07_1	300	psat_EST_00170_01_1	300
mtmt_09	500	mtmt_3183_04	700	mtmt_432_01	850	mtmt_320_01	550	Pis_GEN_18_2_1	450
mtmt_23_01	200	mtmt_866_02	260	mtmt_304_03	500	mtmt_3301_01_1	1200	Pis_GEN_25_2-3_1	700
mtmt_32_01	200	mtmt_510_01	700	mtmt_257_03	200	mtmt_3365_05_1	300	Pis_GEN_15_1_1	500
mtmt_00022_02_1	700	mtmt_1026_01	350	mtmt_255_05	450	mtmt_3381_01_03	800	mtca_EST_00213_11_2	400
mtmt_00047_01_1	1100	mtmt_00049_01_1	300	mtmt_00040_01_2	500	mtmt_GEN_00035_01_1	1000	mtmt_GEN00030_07_1	400

Tabela 5 - *Primers* CAPS a partir de etiquetas de sequências expressas (EST) de leguminosas com respectivos tamanhos (em bp) gerados após a amplificação, bem como a partir da digestão de fragmentos monomórficos nos parentais.

<i>Primer</i>	Tamanho dos fragmentos amplificados	Tamanho dos fragmentos após digestão	Enzima
CAP1 (pis_GEN_25_2_3_1)	700	300, 400, 550	<i>Bp</i> U10I
CAP2 (mtmt_1114_05_01)	400	100, 150, 250, 300	<i>Hpa</i> II
CAP3 (mtmt_400_07_1)	500	150, 200, 350	<i>Hpa</i> II/ <i>Mse</i> I
CAP4 (mtmt_3186_02)	550	100, 200, 250	<i>Hpa</i> II
CAP5 (mtmt_367_05_1)	500	50, 100, 250	<i>Hpa</i> II
CAP6 (mtmt_304_03)	500	400, 100	<i>Hpa</i> II
CAP7 (Pis_Gen_18_2_1)	450	150, 200, 300	<i>Taq</i> I
CAP8 (mtmt_853_01)	700	200, 300	<i>Alu</i> I
CAP9 (mtmt_1026_01)	350	150, 200, 300	<i>Hpy</i> 188I
CAP10 (mtmt_355_07_3)	1000	500, 850	<i>Sfa</i> nI
CAP11 (mtmt_00336_11_1)	380	250	<i>Alu</i> I,
CAP12 (mtmt_281_02_1)	500	400, 100, 200	<i>Sfa</i> nI
CAP13 (mtmt_578_04_1)	300	150	<i>Hpa</i> II/ <i>Alu</i> I
CAP14 (20GM)	1000	500, 850	<i>Taq</i> I / <i>Dra</i> I
CAP15 (11GM)	1100	700, 450, 300	<i>Taq</i> I
CAP16 (Leg036)	1000	900, 300	<i>Alu</i> I, <i>Ava</i> II
CAP17 (mtmt_GEN_932_02_1)	1000	500, 850	<i>Alu</i> I, <i>Dra</i> I
CAP18 (mtmt_GEN_312_13_3)	500	300	<i>Sfa</i> nI
CAP19 (1GM)	1200	500	<i>Taq</i> I
CAP20 (ASN2)	450	200	<i>Nla</i> III
CAP21 (mtca_EST_00213_11_2)	400	200	<i>Mbo</i> II
CAP 22 (mtmt_GEN_01027_04)	350	300	<i>Alu</i> I

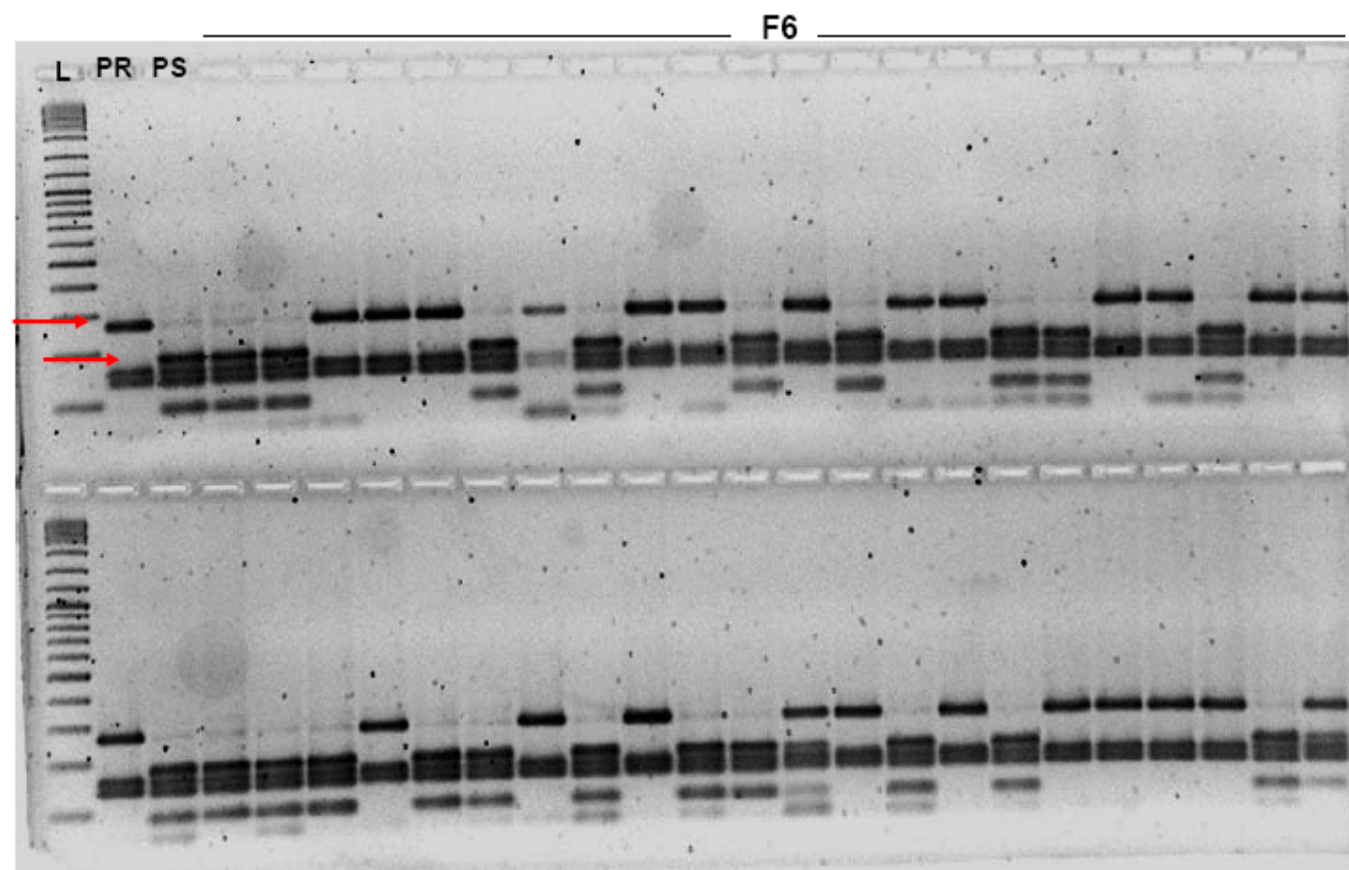


Figura 5. Gel exibindo os produtos da reação de amplificação do primer ASN2 seguida de digestão com a enzima de restrição *NlaIII*. A seta aponta padrão de digestão diferente entre os genitores. Siglas: L = ladder 100 pb fermentas, PR =parental resistente ao CPSMV, PS = parental suscetível ao CPSMV.

5.3 Genotipagem das RILs com marcadores polimórficos e construção do mapa

Foram selecionados 39 *primers*, de acordo com seu grau de polimorfismo entre os genitores. Esses *primers* foram analisados, com reação de amplificação, com o DNA de 92 indivíduos da população, gerando 51 marcas informativas.

Com um LOD de 2,0 e uma taxa de recombinação de 0,40, bem como 39 marcas moleculares (6 de DAF, 27 de ISSR e 6 do tipo CAPS) e um marcador fenotípico da resistência ao vírus do mosaico severo do feijão-caupi foram mapeados 11 grupos de ligação (Figura 6).

Os comprimentos dos grupos de ligação variaram de 7,923 a 150,691 cM, totalizando um comprimento final de 492,128 cM. Os grupos de ligação foram numerados sequencialmente daquele com maior número de marcadores para o de menor número. Para melhor distinção, os marcadores DAF foram indicados na cor laranja, os ISSR em verde, os EST em azul e o CPSMV em vermelho.

Considerando o número de marcas mapeadas (39), isto corresponde a uma densidade média de uma marca a cada 16,9 cM. Os marcadores não foram uniformemente distribuídos no mapa, observando-se que as distâncias de ligação entre as marcas variaram de ,0,6 a 42,4 cM, indicando que o mapa não está saturado. No mapa desenvolvido por Ouédraogo et al. (2002) apenas nove dos 412 marcadores foram separados por mais de 25 cM. Contudo, esse resultado pode ser considerado bom se levarmos em conta o número de iniciadores utilizados, no presente trabalho.

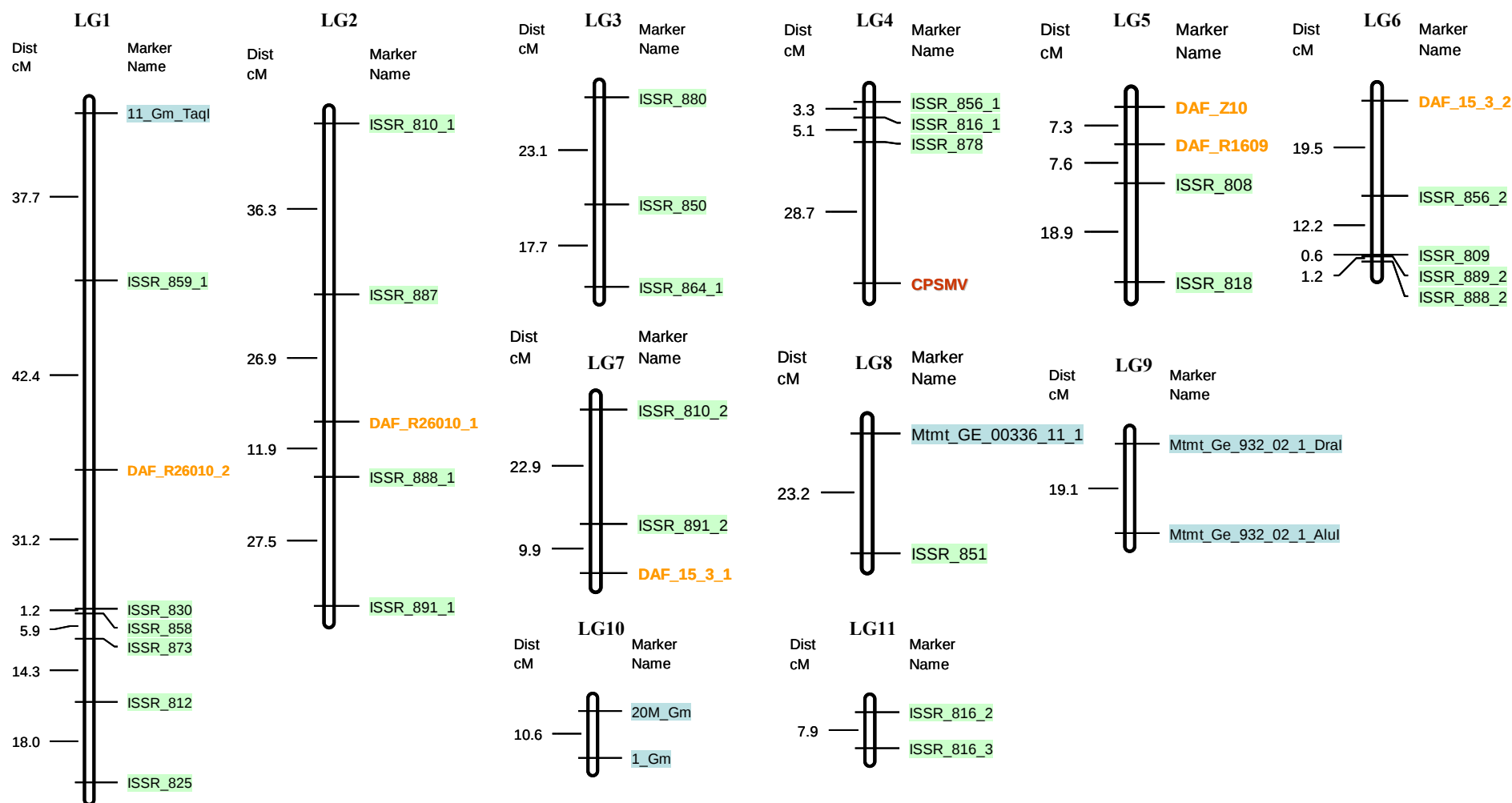


Figura 6. Mapa de ligação para o feijão-caupi baseado em marcadores DAF, ISSR e CAPS, obtidos através da análise de 92 linhas endogâmicas recombinantes F_6 geradas a partir do cruzamento entre BR 14-Mulato e IT85F-2687. O LOD mínimo foi de 2,0 e a máxima fração de recombinação (θ) de 0,40. Os nomes dos marcadores são mostrados à direita e as distâncias em cM (centiMorgan) são mostradas à esquerda. Os marcadores DAF encontram-se representados em laranja; verde e azul indicam marcadores ISSR e CAPS, respectivamente. Os dados de segregação para resistência ao *Cowpea severe mosaic virus* está representado pela sigla CPSMV, destacada em vermelho. Os 11 grupos de ligação estão ordenados de acordo com seu tamanho.

6 DISCUSSÃO

Os sintomas de suscetibilidade e de resistência observados apresentaram a mesma sintomatologia descrita em outros trabalhos, como por exemplo em Umaraham et al. (1997), observando-se claros sinais de mosaico e deformações foliares em plantas suscetíveis enquanto observaram-se lesões necróticas locais em plantas resistentes.

Considerando-se avaliações prévias, admiti-se que a reação ao CPSMV seja controlada por um único gene, sendo a resistência conferida pelo alelo recessivo em homozigose. É o caso das cultivares CNC-0434 (JIMÉNEZ et al., 1989) e Macaibo (VALE; LIMA, 1995). Em outro estudo, a resistência ao CPSMV foi atribuída a três genes recessivos não ligados (UMAHARAM et al., 1996). Pretendemos avaliar em breve um maior número de linhas endogâmicas recombinantes na geração $F_{2:3}$, perfazendo um total de 368 indivíduos, de modo a melhor definir a segregação da herança da resistência ao CPSMV.

Uma das etapas mais importantes na confecção de mapas de ligação está na seleção dos parentais para a geração da população segregante, sendo desejável que estes sejam contrastantes, de modo a otimizar a saturação do mapa com o maior número de marcadores possíveis, permitindo assim maior eficiência e precisão para o mapeamento de genes relacionados aos caracteres de interesse (BORÉM; CAIXETA, 2006).

A baixa geração de marcas polimórficas tem sido um problema para construção de mapas intraespecíficos de feijão-caupi (FATOKUN et al., 1993; MENÉNDEZ et al., 1997). Por outro lado, a utilização de cruzamentos interespecíficos (KAGA et al., 1996) geralmente resultam em alta frequência de locos com distorção de segregação, dificultando previsões no que concerne às segregações genótípicas, bem como estimativas de frequências de recombinações em análises genômicas (ROSADO, 2007). Exemplos de distorções na segregação em cruzamentos interespecíficos são reportadas em diversos mapas genéticos de plantas, incluindo leguminosas como, *Glycine* spp. (KEIM et al., 1997), *Arachis* spp. (GARCIA et al., 2005) e em *Cicer* ssp. (COBOS et al., 2009). Tanksley et al. (1992) sugeriram que tais distorções tem causas genéticas e fisiológicas, como rearranjos cromossômicos, supressão de recombinação na meiose, bem como seleção no estágio gamético, zigótico e pós-zigótico.

Apesar da suposta estreita base genética do feijão-caupi domesticado, nossos resultados mostraram que com a utilização da técnica de DAF (CAETANO-ANOLLÉS et al., 1991) nos acessos BR 14-Mulato e IT85F-2687, associada a uma seleção prévia de iniciadores mais polimórficos, foi eficiente na geração de marcas moleculares informativas. DAF é

comparável ao RAPD, mas utiliza menos DNA (0,1 a 1 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$) e maior concentração de *primer*. A técnica DAF foi escolhida, principalmente pela superioridade deste marcador em relação ao RAPD, especialmente pela alta reprodutibilidade e polimorfismo que apresentou no projeto de mapeamento de grão-de-bico e no estudo de diversidade genética e relação filogenética entre espécies do gênero *Vigna* (BENKO-ISEPPON et al., 2003; RAKSHIT et al., 2003; SIMON et al., 2007; WINTER et al., 2000).

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*) e os acessos de feijão-caupi ficaram mais próximo das subespécies de *V. unguiculata* (*unguiculata*, *sesquipedalis* e *cylindrica*). Os marcadores do DAF foram bastante informativos no nível inter e intraespecífico, motivando o uso destes marcadores no presente estudo.

Polimorfismos de isoenzimas foram empregado por Pasquet (1996, 2000) para analisar acessos silvestres e cultivados de *V. unguiculata*. Foram detectados baixos níveis de polimorfismos entre os acessos cultivados. Os marcadores isoenzimáticos apresentam uma baixa cobertura do genoma analisado, em função do pequeno número de locos que podem ser detectados, e o baixo nível de polimorfismo detectado por loco (BORÉM; CAIXETA, 2006). Em contraste, em nosso trabalho, a técnica DAF possibilitou a geração de elevado número de polimorfismos entre os acessos.

Em outro estudo para identificar o parentesco entre linhagens melhoradas desenvolvidas pelo IITA (LI et al., 2001), somente 27 de 46 marcadores puderam amplificar microssatélites de sítio único para todos os materiais. Foram detectados de dois a sete alelos com uma média de 4,7 fragmentos polimórficos por *primer*. O grau de polimorfismo em feijão-caupi foi relativamente baixo quando comparado com feijão-comum (2-19), soja (11-26) e amendoim (3-15) (NAITO et al., 2008; RONGWEN et al., 1995; ZHANG; BLAIR; WANG, 2008).

Coulibaly et al. (2002) aplicaram a técnica AFLP, comparando 47 acessos de feijão-caupi cultivados (*ssp. unguiculata* var. *unguiculata*) com 52 acessos silvestres da *ssp. unguiculata* var. *spontanea* originária do oeste da África. Os autores detectaram altos níveis de polimorfismo, enfatizando a superioridade do método sobre isoenzimas e sua habilidade de

discriminar a variação ente acesso domesticados e silvestres. O método apresenta qualidades correspondentes ao DAF na geração de polimorfismos, com a desvantagem de ser mais caro e exigir mais tempo.

Tal como os microssatélites, os marcadores ISSR tem apresentado grande aplicabilidade em estudos genéticos. Culturas de maior importância econômica têm sido avaliadas com esses marcadores em relação à variabilidade genética de acessos cultivados e espécies silvestres, visando à obtenção de resultados que auxiliem em programas de melhoramento.

Vários trabalhos visando selecionar *primers* e marcadores ISSR foram feitos em leguminosas. Souframanien e Gopalakrishna (2004) analisaram 18 genótipos de *V. mungo* com 16 iniciadores ISSR e encontraram 55 marcas polimórficas, gerando em média 3,4 bandas polimórficas por iniciador. O número de marcas polimórficas por iniciador variou de 1 a 10, valor superior aos dados obtidos neste trabalho para feijão-caupi (1 a 4). Entretanto, Muthusamy, Kanagarajan e Ponnusamy (2008) analisando variedades tradicionais de *V. umbellata* com 37 iniciadores ISSR, encontraram 296 marcas polimórficas, gerando em média oito bandas polimórficas por iniciador.

Os acessos estudados por Souframanien e Gopalakrishna (2004) constituíram-se de genótipos modernos e melhorados. Por outro lado, no trabalho de Muthusamy, Kanagarajan e Ponnusamy (2008) a análise foi feita com base em raças locais (*landraces*) que constituem fontes de novos alelos em relação à estreita base genética das variedades modernas. Em contraste, o presente estudo foi desenvolvido com parentais melhorados de feijão-caupi visando à identificação de marcas para o mapeamento genético. Este tipo de resultado foi encontrado no trabalho de Gupta, Souframanien e Gopalakrishna (2008), no qual os autores testaram 100 *primers* ISSR nos parentais do mapa de *V. mungo* e encontraram 21 *primers* polimórficos, obtendo 1 a 3 fragmentos polimórficos por *primer*, com média de 1,9 bandas por *primer*.

Bhagyawant e Srivastava (2008) trabalharam com genótipos grão-de-bico com características de interesse agrônomo, como alto rendimento e maturidade precoce obtendo 5,8 bandas polimórficas por *primer*. Sudupak (2004) avaliou espécies do gênero *Cicer*, verificando a ocorrência de alta variabilidade genética ao nível interespecífico em que 100% dos locos foram polimórficos. Por outro lado, ao nível intraespecífico a porcentagem dos locos polimórficos variou de 2,0 a 43,3%. Nesses trabalhos, as diferenças ocorreram devido ao número de *primers* testados e, principalmente, em função da composição genética das

espécies estudadas. Dessa forma, pode-se salientar que o grau de polimorfismo depende do grau de divergência dos acessos analisados, como observado por Duarte (1998).

Ratnaparkhe et al. (1998) utilizaram a técnica de ISSR para localizar marcadores possivelmente associados a genes de resistência à *Fusarium* em grão-de-bico. O marcador com a repetição (AC)₈YT (UBC-885500) apresentou-se ligado em repulsão ao gene de resistência à raça 4 de *Fusarium* a uma distância genética estimada em 5,2 cM. Uma vez que Santra et al. (2000) e Souframanien e Gopalakrishna (2006) também conseguiram localizar marcadores ISSR ligados a genes de resistência a doenças, respectivamente, em grão-de-bico e *V. mungo*, espera-se que os 34 marcadores selecionados no nosso estudo possam promover uma melhor associação com características importantes para o melhoramento, inclusive QTLs (atualmente em avaliação. De fato, no presente estudo, apenas marcadores ISSR (especificamente os três marcadores ISSR_856_1; ISSR_816_1 e ISSR_878) mostraram-se agrupados no mesmo grupo de ligação do gene de resistência contra o CPSMV, indicando o potencial desta categoria de marcadores para estudos subsequentes de mapeamento fino desta característica.

O desenvolvimento de marcadores capazes de permitir amplificação de forma específica de genes envolvidos em mecanismos de respostas a estresses bióticos e abióticos é fundamental para estudos de mapeamento fino. Estes marcadores funcionais detectam variações alélicas nos diversos acessos devido a eventos de inserção, deleção ou mesmo por alterações de uma única base entre fragmentos homólogos de DNA (SNPs). Dados da literatura têm demonstrado a grande eficiência dos marcadores moleculares baseados em SNPs na identificação de indivíduos, em populações segregantes, com características agrônômicas desejáveis.

Os marcadores EST de *M. truncatula*, *P. sativum* e *L. japonicus* utilizados no presente estudo mostraram padrões de amplificações claros e reprodutíveis em feijão-caupi. Para identificar polimorfismo nos fragmentos monomórficos entre os parentais, foram aplicadas diferentes enzimas de restrição. A identificação de diferenças entre os parentais na distribuição dos sítios de restrição foram convertidos em 22 marcadores CAPS.

Exemplos de desenvolvimento de marcadores CAPS podem ser observados tanto no gênero *Vigna* como em outras espécies. Weiland e Yu (2003) isolaram um produto amplificado por RAPD de 600 pb do DNA de beterraba (*Beta vulgaris* L.) altamente associado à resistência ao nematóide *Meloidogyne* spp., sendo usado para a identificação de plantas resistentes a este patógeno em populações segregantes. A análise da sequência da banda de 600 pb proporcionou o desenho de *primers* para a amplificação específica de um produto de 580 pb. Este produto foi amplificado tanto em plantas suscetíveis como nas

resistentes. A comparação entre sequências de bases geradas em plantas resistentes e suscetíveis revelou um grande número de substituições de nucleotídeos. A substituição de uma adenina por uma guanina na sequência de bases TTAGATAA e TTAAATAA, associada à susceptibilidade levou ao reconhecimento de um sítio de clivagem pela endonuclease de restrição *MseI*. Assim plantas que apresentaram o nucleotídeo A no sítio de reconhecimento da enzima tiveram seu DNA digerido pela enzima *MseI*, característica esta, associada à susceptibilidade ao nematóide. Os autores puderam mostrar de forma prática, como a identificação e a validação dos SNPs podem ser úteis no reconhecimento de genótipos com características genéticas herdáveis e de importância agronômica.

No presente estudo seis marcadores CAPs foram incluídos no mapa gerado, sendo três oriundos de soja (sigla Gm) e três de alfafa (sigla Mtmt). Um dos marcadores (11_Gm_TaqI) associou-se ao grupo de ligação G1, onde seis marcadores ISSR e um DAF também mapearam, a considerável distância (37,7 cM). Um segundo marcador (Mtmt_GE_0336_11_1) apresentou-se associado a um ISSR no G8. Porém, em G9 e G10 dois marcadores CAPs apareceram associados (em G9: Mtmt_Ge_932_02_1_DraI e Mtmt_Ge_932_02_1_Alul; em G10: 20M_Gm e 1Gm) sugerindo que em feijão-caupi genes de resistência encontrem-se fisicamente clusterizados, tal como observado em outras plantas cultivadas, incluindo leguminosas como grão-de-bico (BENKO-ISEPPON et al., 2003).

Chen et al. (2007) isolaram e sequenciaram produtos amplificados por RAPD em DNA de parentais de *Vigna mungo* associados com a resistência ao caruncho (*Callosobruchus chinensis*) e desenharam 4 *primers* SCAR. Os *primers* OPU11a4 e OPV02a3 produziram bandas dominantes para os parentais resistentes. Já os *primers* OPW02a4 e UBC223a7 foram monomórficos entre os parentais e, por isso, seus produtos foram clivados com várias enzimas de restrição. Após a digestão do produto amplificado pelo SCAR-OPW02a4 foram detectados polimorfismos entre os parentais (resistente e suscetível). Na análise da co-segregação, verificou-se que sete CAPS (W02s02, W02s03, W02s04, W02s06, W02s09, W02s10 e W02s11) estavam ligados ao gene de resistência *Bn*, a uma distância de 1,3 cM. Os autores sugerem novos estudos com a mesma população segregante para identificar marcadores ligados a genes de resistência de outras espécies de caruncho, visto que o parental TC1966, doador do gene de resistência ao *C. chinensis*, também é resistente a *C. maculatus*, *C. phaseolus*, *C. analis* e *Zabrotes subfasciatus*.

No que se refere ao mapa gerado, a presença de 11 grupos de ligação corresponde ao anteriormente reportado por Ouédraogo et al. (2002), sendo também encontrado em outras espécies do gênero *Vigna*, como observado em *V. mungo* (CHAITIENG et al., 2006) e *V.*

angularis (HAN et al., 2005; KAGA et al., 2008). O estudo do número cromossômico somático de espécies do gênero *Vigna*, incluindo o feijão-caupi, tem sido feito por vários autores, e o número mais frequentemente encontrado tem sido $2n=22$ (ALAM; MAHBUB, 2007; GALASSO et al., 1994; MAHBUB et al., 2007; OSUJI; EDEOGA, 2005). Verifica-se, portanto, que o número de grupos de ligação é igual ao número haplóide de cromossomos do feijão-caupi.

O comprimento total do mapa foi de 492,128 cM. O primeiro mapa de ligação para o feijão-caupi foi desenvolvido por Fatokun et al. (1993) utilizando uma população do cruzamento entre uma cultivar melhorada de feijão-caupi e um parental silvestre (*Vigna unguiculata* subesp. *dekindtiana*) cobriu uma distância aproximada de 684 cM com 92 marcadores distribuídos em 8 grupos de ligação. Menéndez et al. (1997), utilizando duas linhagens melhoradas de feijão-caupi provenientes dos Estados Unidos (524B) e da África (IT84S-2049), respectivamente, construíram um mapa formado por 12 grupos de ligação, com 181 marcadores, sendo 133 RAPDs, 19 RFLPs, 25 AFLPs, três marcadores morfológicos e um enzimático, cobrindo uma distância total de 972 cM e com uma distância média de 6,4 cM entre os marcadores. Ouédraogo et al. (2002) utilizando a população de mapeamento desenvolvida por Menéndez et al. (1997), construíram um mapa com 242 marcadores cobrindo 2.670 cM do genoma e com distância média de 6,43 cM. Assim, observa-se um aumento no comprimento do mapa a partir da inclusão de mais marcadores na estrutura do mesmo. Portanto, a distância coberta no presente estudo foi menor que os demais mapas construídos para o feijão-caupi, fato que se justifica pelo menor número de marcadores gerados até o momento.

Outro ponto pertinente é o tipo de marcador incluído na estrutura do mapa. Agrama et al. (2002) observaram um aumento de 42,61% e 36,14% no comprimento de um mapa construído com marcadores SSRs e RAPD em relação a outros dois mapas de sorgo construídos com marcadores do tipo RFLP. Estas variações nas estimativas de tamanho de genoma também estão associadas às diferenças nos tamanhos das populações e nos níveis de stringência adotados para estabelecer a ordem dos locos (BRONDANI; BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 2002).

Um dos parâmetros mais importantes para a determinação do nível de saturação e do valor de um mapa de ligação é o intervalo médio entre os marcadores. A distância média entre os marcadores de 16,9 cM, indica que o mapa do presente estudo apresenta uma saturação baixa quando comparada a outros mapas altamente saturados, como o de *Lotus japonicus*, que é composto por 1023 marcadores, que cobrem 508,5 cM do genoma, com distância média

entre marcadores de 0,5 cM enquanto a distância máxima encontrada entre marcadores foi de 11 cM (WANG et al., 2008). Já Casasoli et al. (2001), consideram o mapa de *Castanea sativa* Mill. com um bom nível de saturação uma vez que o número de grupos de ligação foi igual ao número haplóide de cromossomos, além de apresentar um baixo número de marcadores não ligados.

No mapa gerado, observa-se também uma clusterização (agrupamento) de marcas, principalmente no que se refere aos marcadores ISSR, especialmente nos grupos de ligação G1, G4 e G6. Observações similares têm sido feitas em mapas gerados para diferentes espécies vegetais, como por exemplo, em cevada (BECKER et al., 1995), em grão-de-bico (WINTER et al., 2000), onde os autores, ao lado da clusterização, destacam a subclusterização de marcadores do mesmo tipo, incluindo marcadores do tipo SSR, DAF e AFLP. Fato semelhante foi também observado no mapa genético de *L. japonicus* (SANDAL et al., 2002), para marcadores AFLP; bem como nos mapas genéticos prévios de feijão-caupi (MENANCIO-HAUTEA, 1993, MENENDEZ et al., 1997), especialmente no caso de marcadores AFLP no mapa de maior saturação (OUÉDRAOGO et al., 2002).

No caso do presente trabalho deve-se salientar que os marcadores semi-arbitrários do tipo ISSR amplificam preferencialmente áreas de DNA repetitivo não codificantes, as quais habitualmente apresentam menores taxas de recombinação (*crossing over*), incluindo análises em leguminosas como *M. truncatula* (CHOI et al., 2004). Tanksley et al. (1992) identificaram no mapa de ligação de tomate e batata regiões com alta densidade de marcadores, sugerindo que essas regiões correspondem às áreas centroméricas e teloméricas devido aos conhecidos mecanismos de supressão de recombinação associados a tais regiões em eucariotos.

Observa-se, também, que os *primers* DAF e ISSR que amplificaram mais de um fragmento polimórfico foram mapeados em diferentes grupos de ligação (DAF: 15_3_1 G7 e 15_3_2 G6; ISSR: 816_1 G4, 816_2 e 816_3 G11, 856_1 G5 e 856_2 G2, 810_1 G2 e 810_2 G7, 891_1 G2 e 891_2 G7), em concordância com o mapa desenvolvido por Ouédraogo et al. (2002) com marcadores RAPD e por Gupta, Souframanien e Gopalakrishna (2008) no mapa de *V. angularis* com marcadores RAPD e ISSR. Este resultado é semelhante a mapas de outras leguminosas também com marcadores dominantes. Por exemplo, o mapa genético de soja desenvolvido por Ferreira, Foutz e Keim (2000) e o mapa de lentilha gerado por Rubenna et al. (2006) com marcadores RAPD. Tal constatação indica a natureza diversificada de tais marcadores, confirmando sua distribuição ao longo de diversas regiões do genoma de plantas.

O primeiro mapa genético de ligação em uma população de feijão-caupi segregando para resistência ao vírus do mosaico severo foi desenvolvido com base em marcadores RAPD,

AFLP e RFLP. O gene de resistência ao CPSMV foi mapeado no grupo de ligação 3 a uma distância de 4,2 cM do iniciador M185 (OUÉDRAOGO et al., 2002). No presente estudo a reação fenotípica ao CPSMV foi codificada como um marcador e mapeado como característica qualitativa. O marcador ISSR-878 mostrou-se localizado a uma distância genética estimada em 28,7 cM da característica de interesse. Contudo, esta distância entre a marca e o gene não permite ainda o uso de seleção assistida para facilitar o melhoramento genético de feijão-caupi para esta característica servindo, porém, de base para identificar o grupo de ligação em que a característica se encontra.

Uma vez que já existem muitos marcadores de microssatélites (SSR, *Simple Sequence Repeat*) disponíveis para *Vigna* (HAN et al., 2005; LI et al., 2001; SWAG et al., 2006; WANG et al., 2004) e o nível de transferência destes marcadores entre espécies relacionadas é relativamente alto, a saturação deste mapa incluirá este tipo de marcador, muito informativo pela sua herança codominante. Pretende-se também ampliar o número de marcadores arbitrários e semi-arbitrários, bem como de marcadores-âncora derivados de ESTs de outras leguminosas como, por exemplo, *L. japonica*, *M. truncatula* e *Pisum sativum* utilizadas como plantas modelo e para as quais várias ferramentas genéticas já foram obtidas, incluindo mapas genéticos (HISANO et al., 2007; MIAN et al., 2008; THOQUET et al., 2002) com marcadores CAPS obtidos a partir destas sequências.

7 CONCLUSÕES

- A seleção de marcadores com base em poucos acessos que possuem diferenças morfológicas e agronômicas deve ser recomendada, pois permite economia de tempo, mão-de-obra e reagentes;
- Os polimorfismos obtidos pelos marcadores DAF foram superiores aos ISSR, devendo permitir uma mais eficiente saturação do mapa;
- As metodologias utilizadas nesse trabalho foram satisfatórias e garantiram a qualidade dos dados obtidos, mesmo com um número reduzido de marcadores genotipados na população segregante;
- Não houve relação entre o padrão de segregação de sequências geradas pelos marcadores ISSR, DAF e CAPS e a resistência ao mosaico severo do feijão-caupi nas plantas avaliadas, uma vez que não foi encontrado nenhum polimorfismo co-segregante ou fortemente ligado à característica de resistência;
- O presente mapa será útil na alocação de marcadores morfológicos em avaliação e na identificação de QTL relacionados a características agronomicamente importantes, incluindo a resistência a doenças, assim como para estudos genéticos e evolutivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABROL, D. P. Pulse susceptibility to *Callosobruchus chinensis* (L) (Bruchidae: Coleoptera) under field conditions. **Tropical Agriculture**, v. 76, p. 150, 1999.

AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Report**, v. 27, n. 617-631, 2008.

AGRAMA, H. A.; WIDLE, G. E.; REESE, J. C.; CAMPBELL, L. R.; TUINSTRA, M. R. Genetic mapping of QTLs associated with greenbug resistance and tolerance in *Sorghum bicolor*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 2, p. 1373-1378, 2002.

ALAM, S. S.; MAHBUB, M. N. Karyotype comparison in two varieties of *Vigna mungo* after staining with ORCEIN and CMA. **Bangladesh Journal of Botany**, v. 36, n. 2, p. 167-170, 2007.

ALCÂNTARA, J. P.; MONTEIRO, I. D.; VASCONCELOS, O. L.; FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q. Seleção de genótipos de feijão-caupi de porte enramador e tegumento branco para o estado da Bahia. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE CAUPI, 5, 2001, Teresina, Piauí. Anais. **Avanços Tecnológicos no Feijão caupi**, Teresina: Embrapa Meio-Norte, p. 211-214. (Embrapa Meio-Norte, Documentos, 56).

ALVES, D. M. T. **Uso de marcadores SNPs em *Arachis* para mapeamento de genes candidatos e análise de sintenia genômica**. 2008. 81 p. Dissertação (Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia), Universidade Católica de Brasília, Brasília.

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**. Campina Grande: Embrapa Algodão. 2005. p. 1-6. (Embrapa Algodão, Campina Grande- PB, Comunicado técnico, 264).

ASSUNCAO, I. P.; FILHO, L. R. M.; RESENDE, L. V.; BARROS, M. C. S.; LIMA, G. S. A.; COELHO, R. S. B.; LIMA, J. A. A. Genes diferentes podem conferir resistência ao *Cowpea severe mosaic virus* em caupi. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 274-278, 2005.

ATHAYDE SOBRINHO, C. **Patossistema caupi x *Macrophomina phaseolina*: método de detecção em sementes, esporulação e controle do patógeno**. 2004. 164 p. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade de São Paulo, Piracicaba.

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/livroorg/caupiceara.pdf>. Acesso em: 23/11/2008.

BECKER, J.; VOS, P.; KUIPER, M.; SALAMINI, F.; HEUN, M. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. **Molecular and General Genetic**, n. 249, p. 65-73, 1995.

BENKO-ISEPPON, A. M. Estudos moleculares e citogenéticos no caupi e em espécies relacionadas: Avanços e perspectivas. . In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE CAUPI, 5, 2001, Teresina, Piauí. Anais. **Avanços Tecnológicos no Feijão caupi**, Teresina: Embrapa Meio-Norte, p. 327-332. (Embrapa Meio-Norte, Documentos, 56).

BENKO-ISEPPON, A. M.; WINTER, P.; HUTTEL, B.; STAGGINUS, C.; MUEHLBAUER, F. J.; KAHL, G. Molecular markers closely linked to fusarium resistance genes in chickpea show significant alignments to pathogenesis-related genes located on *Arabidopsis* chromosomes 1 and 5. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, p. 379-386, 2003.

BERED, F; BARBOSA NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F. de. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, v. 27, n. 3, p. 513-520, 1997.

BEZERRA, A. A. C. **Variabilidade e diversidade genética em caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) precoce, de crescimento determinado e porte ereto e semi-ereto**. 1997. 105p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE.

BHAGYAWANT, S. S.; SRIVASTAVA, N. Genetic fingerprinting of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm using ISSR markers and their relationships. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 24, p. 4428-4431, 2008.

BLAIR, M. W.; PEDRAZA, F.; BUENDÍA, H. F.; GAITÁN-SOLÍS, E.; BEEBE, S. E.; GEPTS, P.; TOHME, J. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical Applied Genetics**, n.107, p.1362-1374, 2003.

BOREM, A.; CAIXETA, E. **Marcadores Moleculares**. Viçosa, UFV. 2006. 374p.

BORNET, B; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat ISSR Markers; reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**. v.19, p. 209-215, 2001.

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.

BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D. Towards a genus-wide reference linkage map for *Eucalyptus* based exclusively on highly informative microsatellite markers. **Mol Genetic Genomics**, v. 267, p. 338-347, 2002.

BUETOW, K. H.; EDMONSON, M. N.; CASSIDY, A. B. Reliable identification of large numbers of candidate SNP from public EST data. **Nature Genetics**, v. 21, p. 323-325, 1999.

BURGOS, N.; TALBERT, R. E. Weed control by spring cover crops and imazethapyr in no-till southern pea (*Vigna unguiculata*). **Weed Technology**, v. 10, p. 893-899, 1996.

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

CARDOSO, J. E.; FREIRE FILHO, F. R.; ATHAYDE SOBRINHO, C. **BR 14-Mulato: nova cultivar de feijão macacar para o Estado do Piauí**. Teresina, Embrapa-UEPAE de Teresina, 1990. 4 p. (Embrapa-UEPAE de Teresina. Comunicado Técnico, 48).

CASASOLI, M.; MATTIONI, C.; CHERUBINI, M.; VILLANI, F. A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p. 1190-1199, 2001.

CHAITIENG, B.; KAGA, A.; TOMOOKA, N.; ISEMURA, T.; KURODA, Y.; VAUGHAN, D. A. Development of an interspecific *Vigna* linkage map between *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi and Ohashi and *V. nakashime* (Ohwi) Ohwi & Ohashi and its use in analysis of bruchid resistance and comparative genomics. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 113, p. 1261-1269, 2006.

CHEN, H. M. ; LIU, C.A.; KUO, C. G.; CHIEN, C. M.; SUN, H. C.; HUANG, C. C.; LIN, Y. C.; KU, H. M. Development of a molecular marker for a bruchid (*Callosobruchus chinensis* L.) resistance gene in mungbean. *Euphytica*. v. 157, n. 1-2, p. 113-122, 2007.

CHOI, H-K; KIM, D.; UHM, T.; LIMPENS, E.; LIM, H.; MUN, J-H; KALO,P.; PENMETSA, R. V.; SERES, A.; KULIKOVA, O.; ROE, B. A.; BISSELING, T.; KISS, G. B.; COOK, D. R. A Sequence-Based Genetic Map of *Medicago truncatula* and Comparison of Marker Colinearity with *M. sativa*. **Genetics**, v. 166, n. 3, p. 1463-1502, 2004.

COBOS, M. J.; WINTER, P.; KHARRAT, M.; CUBERO, J. I.; GIL, J.; MILLAN, T.; RUBIO, J. Genetic analysis of agronomic traits in a wide cross of chickpea. **Field Crops Research**, v. 111, n. 1-2, p. 130-136, 2009.

CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento**. 4º Levantamento de grãos 2006/2007. 2007. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb>>. Acesso em: 25/01/2008.

CORREIA, C. N.; FERREIRA NETO, J. R. C.; HOULLOU-KIDO, L. M.; COSTA, A. F.; PANDOLFI, V.; MONTE, S. J. H.; ISEPPON, A. M. B.; KIDO, E. A. Análises de seqüências simples repetidas (SSR) em seqüências expressas (EST) de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: **Congresso Brasileiro de Genética**, 54º, 2008, Salvador, Bahia. Anais. Salvador: Sociedade Brasileira de Genética, p. 311.

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

COULIBALY, S.; PASQUET, R. S.; PAPA, R.; GEPTS, P. AFLP analysis of the phenetic organization and genetic diversity of *Vigna unguiculata* L. Walp. Reveals extensive gene flow between wild and domesticated types. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 358-366, 2001.

DAMASCENO SILVA, K. J. O feijão-caupi para processamento industrial e exportação. **Portal do Agronegócio**, Viçosa, 2007. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=23643>>. Acesso em: 22/12/2007.

DAMASCENO E SILVA, K. J. Panorama do melhoramento e mercado do feijão-caupi no Brasil. **Agrosoft Brasil**. 2008. Disponível em: <www.agrosoft.org.br/agropag/103401.htm>. Acesso: 22/12/2007.

DESENBÁHIA - **Diretoria de Desenvolvimento de Negócios Gerência de Estudos e Assessoria Unidade de Estudos Econômicos e Pesquisas**. Boletim anual do mercado de grãos: soja safra 2008/2009. Disponível em: <http://www.desenbahia.ba.gov.br/recursos/news/video/%7B8335B47C-380E-4A31-8CDF-2670A64388F5%7D_Rel%20Soja%202008.pdf>. Acesso em: 25/01/2008.

DAS, S.; BHAT, P. R.; SUDHAKAR, C.; EHLERS, J. D.; WANAMAKER, S.; ROBERTS, P. A.; CUI, X.; CLOSE, T. J. Detection and validation of single feature polymorphisms in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) using a soybean genome array. **BMC Genomics**, v. 9, p. 107, 2008.

DUARTE, J. M. **Estudo da divergência genética em raças de Feijão por meio de marcadores RAPD**. 1998. 78 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras., MG.

EHLERS, J. D.; HALL, A. E. Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Fields Crops Research**, v. 53, n. 1-2, p. 187-204, 1997.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. Tecnologia de produção de soja - região central do Brasil 2007. Londrina: Embrapa Soja - Embrapa Cerrados - Embrapa Agropecuária Oeste, 2006, 225p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 11). Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=22&cod_pai=16>. Acesso em: 18/11/2008.

FALEIRO, F. G.; SCHUSTER, I.; RAGAGNIN, V. A.; CRUZ, C. D.; CORRÊA, R. X.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. de Caracterização de linhagens endogâmicas recombinantes e mapeamento de locos de características quantitativas associados a ciclo e produtividade do feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 12, p. 1387-1397, 2003.

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

FATOKUN, C. A.; DANESH, D.; MENANCIO-HAUTEA, D. I.; YOUNG, N. D. A linkage map for cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] based on DNA markers (2N = 22). In: O'BRIEN JS (Ed.) **Genetic maps. A compilation of linkage and restriction maps of genetically studied organisms**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1992. p 6256-6258.

FERY, R. L.; SINGH, B. B. Cowpea genetics: a review of the recent literature. In: SINGH, B. B.; MOHANRAJ, D. R.; DASHIEL, K. E.; JACKAL, L. E. N. (Eds) **Advances in cowpea research**. Ibadan: IITA/Tsukuba:II RCAS, 1997. p. 13-29.

FERREIRA, A. R.; FOUTZ, K. R.; KEIM, P. Soybean genetic map of RAPD markers assigned to an existing scaffold RFLP map. **The Journal of Heredity**, v. 91, n. 5, p. 392-396, 2000.

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

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: 23 set 2008.

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.; SANTOS, A. A. dos; CARDOSO, M. J.; SILVA, P. H. S. da; RIBEIRO, V. Q. **BR 17 – Gurguéia: nova cultivar de caupi com resistência a vírus para o Piauí**. Teresina: EMBRAPA-CPAMN, 1994. 6p. (EMBRAPA-CPAMN. Comunicado Técnico, 61).

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.cpatia.embrapa.br>. Acesso em: 23 set. 2008.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, A. A. Melhoramento Genético. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Eds.) **Feijão-caupi: Avanços Tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológicas, 2005. cap. 1, p.29-92.

GAITÁN-SOLÍS, E.; DUQUE, M. C.; EDWARDS, K. J.; TOHME, J. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, characterization and cross species amplification in *Phaseolus* spp. **Crop Science**, Madison, v. 42, p. 1228-1236, 2002.

GALASSO, I.; SCHMIDT, T.; PIGNONE, D.; HESLOP-HARRISON, J. S. The molecular cytogenetics of *Vigna unguiculata* (L.) Walp: the physical organization and characterization of 18s-5.8s-25s rRNA genes, 5s rRNA genes, telomere-like sequences, and a family of centromeric repetitive DNA sequences. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, n. 6-7, p. 928-935, 1995.

GARCIA, G. M.; STALKER, H. T.; SCHROEDER, E.; LYERLY, J. H.; KOCHERT, G. A. RAPD-based Linkage Map of Peanut Based on a Backcross Population Between the Two Diploid Species *Arachis stenosperma* and *A. cardenasii*. **Peanut Science**, v. 32, n. 1, p. 1-8, 2005.

GAUDET, M.; FARA, A-J; SABATTI, M.; KUZMINSKY, E.; MUGNOZZA, G. S. Single-reaction for SNP genotyping on agarose gel by allele-specific PCR in black poplar (*Populus nigra* L.). **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 25, p.1-9, 2007.

GERMÁN, M. M. **Identificación de un candidato para el gen nsv que confiere resistencia al virus de las manchas necróticas del melón (mnsv) mediante clonaje posicional.** 2005. 163 p. Tesis (Doctoral em Ciencias Biológicas), Universitat Autònoma de Barcelona.

GUPTA, M.; CHYI, Y. S.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, p. 998-1006, 1994.

GUPTA, S. K.; SOUFRAMANIEN, J.; GOPALAKRISHNA, T. Construction of a genetic linkage map of black gram, *Vigna mungo* (L.) Hepper, based on molecular markers and comparative studies. **Genome**, v. 51, n. 8, p. 628-637, 2008.

GWAG, J-G.; CHUNG, J-W.; CHUNG, H-K.; LEE, J-H.; MA, K-H.; DIXIT, A.; PARK, Y-J.; CHO, E-G.; KIM, T-S.; LEE, S-H. Characterization of new microsatellite markers in mung bean, *Vigna radiata* (L.). **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 4, p. 1132-1134, 2006.

HAN, O. K.; KAGA, A.; ISEMURA, T.; TOMOOKA, N.; VAUGHAN, D. A. A genetic linkage map for azuki bean (*Vigna angularis*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 111, p. 1278-1287, 2005.

HISANO, H.; SATO, S.; ISOBE, S.; SASAMOTO, S.; WADA, T.; MATSUNO, A.; FUJISHIRO, T.; YAMADA, M.; NAKAYAMA, S.; NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; HARADA, K.; TAB, S. Characterization of the Soybean Genome Using EST-derived Microsatellite Markers. **DNA research**, v. 14, p. 271-281, 2007.

HOWARD, T. D.; BLEECKER, E. R.; STINE, C. O. Fluorescent allele-specific PCR (FAS-PCR) improves the reliability of single nucleotide polymorphism screening. **Biotechnology**, v. 26, p. 80-381, 1999. LIMA, J. A. A.; NELSON M. R. Etiology and epidemiology of mosaic of cowpea in Ceará, Brazil. **Plant Disease report**, .v. 61, p. 864-867, 1977.

JIANG, Q.; GRESSHOFF, P. M. Classical and molecular genetics of the model legume *Lotus japonicus*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, p. 59-68, 1997.

JIMENEZ, C. C. M.; BORGES, O. L.; DEBBROT, E. A. Herencia de la resistencia del frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) al virus del mosaic severo del caupi. **Fitopatologia Venezuelana**, v. 2, p. 5-9, 1989.

JING, R.; BOLSHAKOV, V. I.; FLAVELL, A. J. The tagged microarray marker (TAM) method for high throughput detection of single nucleotide and indel polymorphisms. **Nat. Protoc**, v. 2, p. 168-177, 2007.

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**, v. 93, n. 56, p. 658-663., 1996.

KAGA, A.; ISEMURA, T.; TOMOOKA, N.; VAUGHAN, D. A. The Genetics of Domestication of the Azuki Bean (*Vigna angularis*). **Genetics**, v. 178, n. 2, p. 1013-1036, 2008.

KANAZIN, V.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R. C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 93, p. 11746-11750, 1996.

KEIM, P.; SCHUPP, J. M.; TRAVIS, S. E.; CLAYTON, K.; ZHOU, T.; SHI, L.; FERREIRA, A.; WEBB, D. M. A high-density soybean genetic map based on AFLP markers. **Crop Science**, v. 37, p. 537-543, 1997.

KONIECZNY A.; AUSUBEL F. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. **The Plant Journal**, v. 4, n. 2, p. 403-410, 1993.

LANDER, E. S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, L.; BARLOW, A.; DALY, M. J.; LINCOLN, S. E.; NEWBURG, S. E. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, v. 1, p. 174-181, 1987.

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.

LIEBHARD, R.; KOLLER, B.; GIANFRANCESCHI, L.; GESSLER, C. Creating a saturated reference map for the apple (*Malus x domestica* Borkh) genome. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 1497-1508, 2003.

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.; RIBEIRO, V. Q. (Eds.) **Feijão-caupi: Avanços Tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológicas, 2005. cap. 11, p.404-459.

LINDQVIST, C.; SCHEEN, A.C.; YOO, M.J.; GREY, P.; OPPENHEIMER, D.G.; LEEBENS-MACK, J.H.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; ALBERT, V.A. An expressed sequence tag (EST) library from developing fruits of an Hawaiian endemic mint (*Stenogyne rugosa*, Lamiaceae): characterization and microsatellite markers. **BMC Plant Biology**, v. 6, p. 16, 2006.

LUKOWITZ, W.; GILLMOR, C. S.; SCHEIBLE, W. R. Positional cloning in *Arabidopsis*. Why it feels good to have a genome initiative working for you. **Plant Physiology**, v. 123, p. 795-805, 2000.

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.; TAMÒ, 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. 2000.p.185-195.

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.

MAGLOIRE, N. **The Genetic, Morphological and Physiological Evaluation of African Cowpea Genotypes.** 2005. 119 p. Thesis (Magister Scientiae Agriculturae) - University of the Free State, Bloemfontein, South Africa.

MAHBUB, M. N.; RUBAIYATH BIN RAHMAN, A. N. M.; ALAM, S. S. Development of Marker Chromosomes in Three Varieties of *Vigna radiata* L. (Fabaceae). **Cytologia**, v. 72, n. 2, 2007.

MALIEPAARD, C.; JANSEN, J.; VAN OOIJEN, J. W. Linkage analysis in a full-sib family of an outbreeding plant species: Overview and consequences for applications. **Genetical Research**, v.70, p.237-250, 1997.

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.

MENACIO-HAUTEA, D.; FATOKUN, C. A.; KUMAR, L.; DANESH, D.; YOUNG, N. D. Comparative genome analysis of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) and cowpea (*V. unguiculata* L. Walpers) using RFLP mapping data. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 86, 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.

MIAN, M. A. R.; KANG, S-T; BEIL, S. E.; HAMMOND, R. B. Genetic linkage mapping of the soybean aphid resistance gene in PI 243540. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, n. 6, p. 1432-2242, 2008.

MICHAELS, S. D.; JOHN, M. C.; AMASINO, R. M. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. **Biotechniques**, v. 17, p. 274-276, 1994.

MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 88, p. 9828-9832, 1991.

MIURA, Y.; HIRATA, M.; FUJIMORI, M. Mapping of EST-derived CAPS markers in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). **Plant Breeding**, v. 126, p. 353-360, 2007.

MUTHUSAMY, S.; KANAGARAJAN, S.; PONNUSAMY, S. Efficiency of RAPD and ISSR markers system in accessing genetic variation of rice bean (*Vigna umbellata*) landraces. **Electronic Journal of Biotechnology**, Chile, v. 11, n. 3, p. 1-10, 2008.

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.

NAITO, Y.; SUZUKI, S.; IWATA, Y.; KUBOYAMA, T. Genetic diversity and relationship analysis of peanut germplasm using SSR markers. **Breeding Science**, v. 58, n. 3, p. 293-300, 2008.

NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp., associados à mela do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), coletados em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 505-508, 2006.

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.

ONOFRE, A. V. C. **Diversidade genética e avaliação de genótipos de feijão-caupi contrastantes para resistência a estresses bióticos e abióticos com marcadores SSR, DAF e ISSR**. 2008. 76 p. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

OSUJI, J. O.; EDEOGA, H. O. Karyological Studies on *Vigna subterranea* (L.) Verdc. from Nigeria. **Cytologia**, v. 70, n. 2, p. 167-169, 2005.

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.

PADULOSI, 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.

PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, n. 8, p. 985-993, 1993.

PASSOS, M. M. **“Cowpea severe mosaic virus” - fontes de resistência, diferenciação biológica e sorológica, identificação molecular de sorotipos virais e produtividade de genótipos de caupi na região de Magé/RJ**. 1999. 38 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

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.

PASQUET, R. S. Allozyme diversity of cultivated cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, p.211-219, 2000.

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.

PIGNONE, D.; CIFARELLI, S.; PERRINO, P. Chromosome identification in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In **Cowpea genetic resources**. NG, N.Q.; MONTI, L.M (Ed.). IITA Ibadan, Nigéria, 1990. p. 144-150.

PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS F. M.. ANDRADE, G. P. 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 2: doenças das plantas cultivadas**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres. v. 2, 2005. p. 215-222.

PONTE, J. J. Nematóides do caupi. In: ARAUJO, J. P. P de; WATT, E. E. (Org). **O caupi no Brasil**. Brasília: IITA/EMBRAPA, 1988. p. 591-601.

PRABHU, R. R.; GRESSHOFF, P. M. Inheritance of polymorphic markers generated by DNA amplification fingerprinting and their use as genetic markers in soybeans. **Plant Molecular Biology**, v. 26, n.1, p. 105-106.

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.

PROITE, K.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; BERTIOLI, D. J.; MORETZSOHN, M. C.; DA SILVA, F. R.; MARTINS, N. F.; GUIMARÃES, P. M. ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. **BMC Plant Biology**, v. 7, p. 1-7, 2007.

QUEIROZ, M. A.; LOPES, M. A. Importância dos recursos genéticos para o agronegócio. In: NALL, L.L. (Org.) **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 281-305.

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

RAKSHIT, S.; WINTER, P.; TEKEOGLU, M.; JUAREZ MUNOZ, J.; PFAFF, T.; BENKO-ISEPPON, A. M.; MUEHLBAUER, F. J.; KAHL, G. DAF marker tightly linked to a major locus for *Ascochyta* blight resistance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Euphytica**, v. 132:, p. 23-30, 2003.

RATNAPARKHE, M. B.; SANTRA, D. K.; TULLU, A.; MUEHLBAUER, F. J. Inheritance of inter simple sequence repeat polymorphism and linkage with *Fusarium* wilt resistance gene in chickpea. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96, p. 348-353, 1998.

ROCHA, M. M.; LIMA, J. A. A.; FREIRE FILHO, F. R. M.; ROSAL, C. J. S.; 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.

RONGWEN, J.; AKKAYA, M. S.; BHAGWAT, A. A.; LAVI, U.; CREGAN, P. B. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 90, p. 43-48, 1995.

ROSADO, T. C. **Mapeamento de gene letal, responsável pela distorção de segregação e detecção de QTL para resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus* spp.** 2007. 123 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento), Universidade de Viçosa, Minas gerais.

ROWLAND, L. J.; DHANARAJ, A. L.; POLASHOCK, J. J.; ARORA, R. Utility of blueberry-derived EST-PCR primers in related Ericaceae species. IN Breeding, Cultivars, Rootstocks & germplasm resources. **HortScience**, v. 38, n. 7, p. 1428-1432, 2003.

RUBEENA, R.; FORD, P.; TAYLOR, W. J. Construction of an intraspecific linkage map of lentil (*Lens culinaris* ssp. *culinaris*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, p. 910-916, 2003.

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 (Epape 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.

SANDAL, N.; KRUSELL, L.; RADUTOIU, S.; OLBYRT, M.; PEDROSA, A.; STRACKE, S.; SATO, S.; KATO, T.; TABATA, S.; PARNISKE, M.; BACHMAIR, A.; KETELSEN, T.; STOUGAARD, J. A genetic linkage map of the model legume *Lotus japonicus* and strategies for fast mapping of new loci. **Genetics**, v. 161, p.1673-1683, 2002.

SANTOS, A. A., FREIRE FILHO, F. R.; CARDOSO, M. J. BR 10– Piauí: cultivar de feijão macassar (*Vigna unguiculata*) com resistência múltipla a vírus. **Fitopatologia Brasileira**, v. 12, p. 400-402, 1987.

SANTOS, J. F.; LEMOS, J. N. R.; NÓBREGA, J. Q.; GRANGEIRO, J. I. T.; BRITO, L. M. P.; OLIVEIRA, M. E. C. Produtividade de feijão caupi utilizando biofertilizante e uréia. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 1, n. 1, p. 25-29, 2007.

SANTOS, C. A. F.; SANTOS, I. C. N.; RODRIGUES, M. A. **Melhoramento genético do feijão-caupi na Embrapa Semi-Árido**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2007. 24p. (Embrapa Semi-Árido Documentos 204).

SANTRA, D. K.; TEKEOGLU, M.; RATNAPARKHE, M.; KAISER, W. J.; MUEHLBAUER, F. J. Identification and mapping of QTLs conferring resistance to *Ascochyta* blight in chickpea. **Crop Science**, v. 40, p. 1606-1612, 2000.

SHEN, R.; FAN, J-B.; CAMPBELL, D.; CHANG, W.; CHEN, J.; DOUCET, D.; YEAKLEY, J.; BIBIKOVA, M.; WICKHAM, G. E.; MCBRIDE, C.; STEEMERS, F.; GARCIA, F.; KERMANI, B. G.; GUNDERSON, K.; OLIPHANT, A. High-throughput SNP genotyping on universal bead arrays. **Mutation Research**, v. 573, p. 70-82, 2005.

SILVA, G. S. Nematóides. In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q. (Eds.). **Feijão-caupi: Avanços Tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. cap. 13. p.487-497.

SILVA, P. H. S.; CARNEIRO, J. S.; QUINDERÉ, M. A. W. Pragas. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V.Q. (Eds.). **Feijão-caupi: Avanços Tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológicas, 2005. cap. 10. p.369-402.

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.

SOBRINHO, C. A.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. Doenças fúngicas e bacterianas. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Eds.) **Feijão-caupi: Avanços Tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológicas, 2005. cap. 12, p. 463-497.

SOLEIMANI, V. D.; BAUM, B. R.; JOHNSON, D. A. Efficient validation of single nucleotide polymorphisms in plants by allele-specific PCR, with an example from barley. **Plant Molecular Biology Report**, v. 21, p. 281-288, 2003.

SOUFRAMANIEN, J.; GOPALAKRISHNA, T. A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, n. 8, p. 1687-1693, 2004.

SOUFRAMANIEN, J.; GOPALAKRISHNA, T. ISSR and SCAR markers linked to the mungbean yellow mosaic virus (MYMV) resistance gene in blackgram [*Vigna mungo* (L.) Hepper]. **Plant Breeding**, v. 125, n. 6, p. 619-622, 2006.

SOUZA, V. A. B.; SANTOS, C. A. F. Biotecnologia. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Eds.) **Feijão-caupi: Avanços Tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológicas, 2005. cap 2, p. 95-156.

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.

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

SUNYAEV, S.; HANKE, J.; AYDIN, A.; WIRKNER, U.; ZASTROW, I.; REICH, J.; BORK, P. Prediction of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in human disease-associated genes. **Journal Molecular Medicine**, v. 77, p. 754-760, 1999.

TANG, J.; LEUNISSEN, J. A. M.; VOORRIPS, R. E.; LINDEN, C. G. VAN DER; VOSMAN, B. HaploSNPer: a web-based allele and SNP detection tool. **BMC Genetics**, v. 23, n. 9, p. 1-7, 2008.

TANSKLEY, S. D.; GANAL, M. W.; PRINCE, J. P.; VICENTE, M. C.; BONIERBALE, M. W.; BROUN, P.; FULTON, T. M.; GIOVANNONI, J. J.; GRANDILLO, S.; MARTIN, G. B.; MESSEGUER, R.; MILLER, J. C.; MILLER, L.; PATERSON, A. H.; PINEDA, O.; ROEDER, M. S.; WING, R. A.; WU, W.; YOUNG, N. D. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics**, v. 132, p. 1141-1160, 1992.

TARVER, M. R.; SHADE, R. E.; SHUKLE, R. H.; MOAR, W. J.; MUIR, W. M.; MURDOCK, L. M.; PITTENDRIGH, B.R. Pyramiding of insecticidal compounds for control of the cowpea bruchid (*Callosobruchus maculatus* F.). **Pest Management Science**, v. 63, p. 440-446, 2007.

TAYLOR, J.; PROVART, N. J. CapsID: a web-based tool for developing parsimonious sets of CAPS molecular markers for genotyping. **BMC Genetics**, London, v. 7, p. 27-31, 2006.

THIEL, T., KOTA, R., GROSSE, I., STEIN, N.; GRANER, A. SNP2CAPS: a SNP and INDEL analysis tool for CAPS marker development. **Nucleic Acids Research**, v.32, p.1-5, 2004.

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

THOQUET, P.; GHERARDI, M.; JOURNET, E-P.; KERESZT, A.; ANE, J-M.; PROSPERI, J-M.; HUGUET, T. The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume genomics and the isolation of agronomically important genes. **BMC Plant Biology**, v. 2, p. 1-13, 2002.

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.

VALE, C. C.; LIMA, J. A. A. Herança da imunidade da cultivar Macaibo de *Vigna unguiculata* ao vírus do mosaico severo do caupi. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 30-32, 1995.

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.

VARSHNEY, R. K.; SIGMUND, R.; BORNER, A.; KORZUN, V.; STEIN, N.; SORRELLS, M.E.; LANGRIDGE, P.; GRANE, A. Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice. **Plant Science**, v. 168, p. 195-202, 2005.

WANG, X. W.; KAGA, A.; TOMOOKA, N.; AUGHAN, D. A. (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 & Ohashi]. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, p. 352-360, 2004.

WANG, X.; SATO, S.; TABATA, S.; KAWASAKI, S. A High-density Linkage Map of *Lotus japonicus* Based on AFLP and SSR Markers. **DNA Research**, v. 15, n. 5, p. 323-332, 2008.

WEILAND, J. J.; YU, M. H. Sequência Polimórfica Amplificada e Clivada (CAPS Marker) Associada com Resistência a Nematóide de Raiz em Beterraba. **Crop Science**, v. 43, p. 1814-1818, 2003.

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; KAHL, G. DNA fingerprinting in plants. **Boca Raton, USA**. 1995. 322 p.

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. A.; RIBEIRO, V. Q. (Eds.) **Feijão-caupi: Avanços Tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológicas, 2005. cap 3, p.159-190.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

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.

XAVIER, T. F.; ARAÚJO, A. S. F.; SANTOS, V. B.; CAMPOS, F. L. Influência da inoculação e adubação nitrogenada sobre a nodulação e produtividade de grãos de feijão-caupi. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 2037-2041, 2008.

YU, K.; PARK, S. J.; POYSA, V.; GEPTS, P. Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Heredity**, v. 91, n. 6, p. 429-434, 2000.

ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application N° 0534858 A1, 1993.

ZAMPROGNO, K. C. **Utilização de bulked segregant analysis na identificação de marcadores ligados a genes que controlam a resistência à ferrugem (*Puccinia psidii* WINTER) em *Eucalyptus* sp.** 2005. 62f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Universidade Estadual de São Paulo, Campus Botucatu.

ZHANG, X.; BLAIR, M. W.; WANG, S. Genetic diversity of Chinese common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces assessed with simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 117, p. 629-640, 2008.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification, **Genomics**, v. 20, p. 176-183, 1994.

APÊNDICES

Apêndice A - Manuscrito de Artigo Científico

**Selection of highly informative molecular markers genetic mapping of
selected cowpea accessions**

Manuscrito a ser encaminhado à revista

Pesquisa Agropecuária Brasileira

Selection of highly informative molecular markers genetic mapping of selected cowpea accessions

Lidiane Lindinalva Barbosa Amorim⁽¹⁾, Marise do Vale Simon⁽¹⁾, Luiz Ronaldo Nali⁽¹⁾,
Alberto Vinicius Casimiro Onofre⁽¹⁾ and Ana Maria Benko-Iseppon^(1,3)

⁽¹⁾Universidade Federal de Pernambuco, Genetics Department, Laboratory for Plant Genetics and Biotechnology. Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP 50.670-420, Recife, PE, Brasil. ⁽²⁾Universidade Federal Rural de Pernambuco, Biology Department, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois irmãos, CEP 52.171-900, Recife, PE, Brasil. ⁽³⁾Author for correspondence. E-mail: ana.benko.iseppon@pq.cnpq.br.

Abstract - Investigation of germplasm genetic diversity using various molecular markers is of great importance for the characterization of genetic resources and genetic mapping. However, few reports on this topic are available in the literature for *Vigna* and no previous evaluation is known using Brazilian cultivars with ISSR markers. In this work, we report primer selection and preliminary screening of genetic markers to evaluate diversity in *Vigna* using DAF and ISSR markers. Initially, 262 DAF primers were screened against genomic DNA from two local cultivars of *V. unguiculata* (IPA204 and CNC0434) and a single accession of each of the two species *V. angularis* and *V. umbellata*, resulting in the selection of 47 random primers. The DAF method was highly reproducible, generating polymorphic bands with an average of 13.1 polymorphic bands at the interspecific and 2.8 at the intraspecific level in *V. unguiculata*. A total of 71 DAF primers (including 47 selected previously) and 89 ISSR were used in four *V. unguiculata* parental genotypes (BR14-Mulato, IT85F-2687, IT86D-716-1, TVu-382). Using DAF analysis 662 fragments could be scored, of which 252 were polymorphic, with an average of 5.2 polymorphic fragments per primer. From 89 ISSR primers used in the study 57 produced 490 bands. From these 43 primers generated 118 polymorphic bands, with an average of 2.8 polymorphic fragments per primer, while 32 produced no clearcut polymorphism, or gave only faint bands. Such an intraspecific diversity implies that DAF and ISSR method are very suitable for research works, as e.g. germplasm characterization, parental selection, genetic mapping and marker assisted selection, collaborating to the successful improvement of a cowpea-breeding project in Brazil.

Index Terms: *Vigna unguiculata*, marker screening, DAF, ISSR.

Seleção de marcadores moleculares altamente informativos para mapeamento genético de acessos de feijão-caupi

Lidiane Lindinalva Barbosa Amorim⁽¹⁾, Luiz Ronaldo Nali⁽¹⁾, Marise do Vale Simon⁽¹⁾, Alberto Vinicius Casimiro Onofre⁽¹⁾, Reginaldo de Carvalho⁽²⁾ and Ana Maria Benko-Iseppon^(1,3)

⁽¹⁾Universidade Federal de Pernambuco, Genetics Department, Laboratory for Plant Genetics and Biotechnology. Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP 50.670-420, Recife, PE, Brasil. ⁽²⁾Universidade Federal Rural de Pernambuco, Biology Department, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois irmãos, CEP 52.171-900, Recife, PE, Brasil. ⁽³⁾Author for correspondence. E-mail: ana.benko.iseppon@pq.cnpq.br.

Resumo - A investigação da diversidade genética de germoplasma utilizando marcadores moleculares é de grande importância para caracterização de recursos genéticos e mapeamento. Contudo, poucos estudos sobre este tópico estão disponíveis na literatura para *Vigna* e nenhuma avaliação prévia é conhecida utilizando a maioria dos marcadores ISSR para cultivares brasileiros. Neste trabalho, nós apresentamos a seleção de *primers* e avaliação preliminar da diversidade genética de *Vigna* usando marcadores DAF e ISSR. Inicialmente, 262 DAF *primers* foram testados em dois cultivares regionais de feijão-caupi (IPA204 e CNC0434) e um único acesso de cada uma das duas espécies *V. angularis* and *V. umbellata*, resultando na seleção de 47 *primers*. O método DAF foi altamente reprodutível gerando uma média de 13.1 bandas polimórficas ao nível interespecífico e 2.8 ao nível intraespecífico em *V. unguiculata*. Um total de 71 DAF *primers*, 47 *primers* selecionados anteriormente e 89 ISSR foram usados nos quatro genótipos parentais de *V. unguiculata* (BR 14-Mulato, IT85F-2687, IT86D-716-1, TVu382). Utilizando a análise DAF, 662 fragmentos foram gerados, dos quais 252 foram polimórficos, com uma média de 5.2 fragmentos polimórficos por *primer*. De 89 *primers* ISSR usados no estudo, 57 produziram 490 bands. Desses 43 *primers* geraram 118 bandas polimórficas, com uma média de 2.8 fragmentos polimórficos por *primer*, enquanto que 32 não produziram nenhum fragmento, ou geraram apenas fragmentos fracos e não reprodutíveis. Os resultados de diversidade intraespecífica sugerem que as metodologias DAF e ISSR são adequadas para futuros estudos, como por exemplo na caracterização de germoplasma, seleção de parentais, mapeamento genético e seleção assistida por marcadores, colaborando para o sucesso dos projetos de melhoramento de feijão-caupi no Brasil..

Index Terms: *Vigna unguiculata*, seleção de *primer*, DAF, ISSR.

Introduction

Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] belongs to the Fabaceae family and is part of traditional cropping systems in the semi-arid regions of the tropics with multipurpose uses: as food for human beings, fodder for livestock and atmospheric nitrogen fixation. The estimated worldwide area under cowpea is about 14 million ha with an annual production of over 4.5 million tons (Singh et al., 2003). More than 70% of the world production is concentrated in three countries: Nigeria, Niger and Brazil. Northeast Brazil grows about 1.2 million ha of cowpea with about 491,558 tons providing food for about 25 million people (Singh et al., 2002).

Despite of existing breeding efforts to improve cowpea, the lack of stable production is still a major concern. Improvement in the current crop status requires resistance to biotic and abiotic stresses which are the fundamental causes for unstable production (Freire-Filho et al., 2005). An important aspect in cowpea breeding regarding tolerance against different stresses is the availability of sufficient genetic diversity in the germplasm collection, allowing the selection of favorable genes and alleles for incorporation into the breeding populations.

Substantial diversity exists among cultivated cowpea genotypes estimated for various morphological, physiological and agronomic traits, however limited research efforts have been made to understand its genome structure, genetic diversity and genetic mapping as compared to other legumes.

Recently, more attention has been focused on the use of different molecular markers to assess genetic diversity in cowpea such as simple sequence repeat (SSR; Li et al., 2001), random amplified polymorphic DNA (RAPD; Xavier et al., 2005) and amplified fragment length polymorphism (AFLP; Fang et al., 2007). These studies demonstrated that genetic diversity in cultivated cowpea is relatively low. Despite of that, Simon et al. (2007) found considerable diversity among cowpea cultivars using DAF markers.

The DAF method is comparable to RAPD (Williams et al., 1990) but employs less DNA (0.1 to 1 ng/ μ l) and much high primer concentration (Caetano-Anollés et al., 1991) turning this method to be more specific and reproducible. Additionally the DAF approach produces high informative polymorphism by the use of different primer lengths (8 to 18 bp) and also mini-hairpin primers, especially when designed with typical microsatellite sequence in the extremely 3' (Caetano-Anollés et al., 1991; Winter et al., 2000; Benko-Iseppon et al., 2003).

Inter simple sequence repeat (ISSR) technique is also similar to RAPD, since it does not require prior sequence knowledge, being considered more reproducible due to the use of longer primers (16–25 mers) designed to anneal to microsatellite sequences, permitting the subsequent use of higher annealing temperatures (45–60°C) leading to higher stringency (Reddy et al., 2002). Compared to AFLP, ISSR is considered to be simpler, quicker and less expensive. The polymorphism level observed in *V. mungo* and *V. umbellata* using ISSR technique was considerable (Souframanien and Gopalakrishna, 2004; Muthusamy et al., 2008), allowing the effective distinction within *Vigna* species by Ajibade et al. (2000). Despite of its use in cowpea for gene tagging and genome mapping (Reddy et al., 2002), no previous use in germplasm evaluation including Brazilian cultivars is available.

Linkage maps have been constructed for cowpea using RFLP, RAPD, AFLP, isozymes and phenotypic markers (Menéndez et al., 1997; Ouédraogo et al., 2002). However, a genetic map regarding a segregating population designed to map important features for the Brazilian breeding program is still lacking. A reference Brazilian genetic map for cowpea would allow the integration of all current and genetic maps accelerating the process of gene identification and isolation. The present work aimed to evaluate ISSR and DAF methodology and its applicability and efficiency for parental genotype distinction and for future construction of a Brazilian cowpea linkage map.

Material and methods

Firstly, screening for the DAF polymorphic markers was carried out using four *Vigna* accessions: *V. angularis* (Willd.) Ohwi et Ohashi (PHA 8023/79) e *V. umbellata* (Thumb.) Ohwi et Ohashi (PHA 8126/79), both from China and actually deposited at the germplasm bank of Gatersleben Institut of Cultivated Plants (IPK-Gatersleben, Germany), as well as two Brazilian cultivated accessions of *V. unguiculata* (IPA204, CNC0434) from the germplasm collection of IPA (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária), Brazil.

The genomic DNA was isolated using the CTAB (cetyl-trimethyl-amoniumbromide) protocol (Weising et al., 1995), with modifications described by Benko-Iseppon et al. (2003). Contaminating polysaccharides were selectively precipitated (Michaels et al. 1994) and DNA concentrations were determined electrophoretically in 1.2 % agarose gel using known amounts of phage λ DNA (MBI, Fermentas, Hanover, MD, USA) as standard.

A total of 262 different DAF primers were used, including 214 decamers, 10 octamers, 18 15-mers and 20 mini-hairpins. The DAF reactions occurred according to Winter et al. (2000), used 15 ng total DNA, 1.5 μ L 10x PCR buffer (Biotherm), 2.5 mM $MgCl_2$ (Biotherm), 2.5 mM dNTP-mix (Fermentas), 20 pmol primer (Eurogentec e Roth) e 0.4 U *Taq* DNA polymerase (Biotherm), adjusted the end volume of 15 μ L with bidestilated 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.

A total of 71 oligonucleotides with arbitrary sequence DAF (including previously selected primers) and 89 ISSR primers were applied in four parental lines (BR 14-Mulato, IT85F-2687, IT86D-716-1 and Tvu 382) used by EMBRAPA-CPAMN to develop recombinant inbred lines (RILs) for genetic mapping.

ISSR analysis included anchored and unanchored primers (UBC Primer Set no. 9, University of British Columbia, Canada). The ISSR reactions were performed following Bornet and Branchard (2001) protocol. In 20 µL reactions the volume contained: 25 ng of genomic DNA, 1x reaction buffer, 2.5 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP, 50 pmol primer and 0.7 U *Taq* DNA polymerase. The PCR cycling conditions were: denaturation at 94°C for 4 min and 35 cycles at 94°C for 30 s, 49.7 to 58.0°C depending on the primer for 45 s, 72°C for 2 min with a final extension for 7 min at 72°C. Both DAF and ISSR reaction products were separated electrophoretically on ethidium bromide-stained 1.8% agarose gels in 0.5 X TBE buffer at 70 V for 4 hours and visualized under UV-light.

After polymorphism analysis two matrixes were constructed, based on polymorphisms for each band/individual regarding the evaluation for the presence (a or 1) or absence (c or 0) of each band or amplicon. Doubtful data or weak bands were excluded of the analysis. The generate matrixes were submitted to the UPGMA analysis using the PHYLIP package and the MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) program, version 4.0.2 for Windows (Tamura et al., 2007).

Results and Discussion

After evaluation of the accessions PHA 8023/79, PHA 8126/79, IPA204 e CNC0434 with 262 random primers a total of 2.779 polymorphic bands were obtained. From these bands, 2.512 were polymorphic at interspecific level and 233 at intraspecific level in cowpea. Table 1 presents the 47 most informative random primers selected from 262 tested, generating a total of 762 polymorphic bands, with 631 at interspecific level and 131 at intraspecific level. The selected primers showed higher amplicon numbers (8-20 bands) with 1-19

polymorphisms. In average the selected primers showed 14.1 polymorphic bands with 13.3 at interspecific level and 2.8 at intraspecific level in *V. unguiculata*. Figure 1 shows representative pictures of electrophoretical patterns generated after DAF.

Polymorphisms were analyzed using the UPGMA method of the PHYLIP package, revealing a dendrogram with both species *V. angularis* and *V. umbellata* joining a clade, and distinguished them from the analysed accessions of *V. unguiculata* (Figure 2). Although the present work did not aimed to evaluate the taxonomic relationships among genotypes studied, it is noteworthy that the preliminary results brought *V. angularis* and *V. umbellata* closely together than both *V. unguiculata* cultivars (Figure 3). The diversity within both cowpea cultivated accessions is remarkable, especially considering that legumes are normally self pollinated and present narrow genetic basis. This was the case of chickpea (*Cicer arietinum*). After analysis with molecular markers including RAPD, AFLP, RGA, RFLP e STMS (Hüttel et al., 1999; Winter et al., 1999), the researchers decided to develop an interspecific cross for mapping purposes, despite of the resulting distortion segregation in such approaches (Winter et al., 2000).

The selection of genetically contrasting parental lines that exhibit sufficient polymorphisms is important and are therefore the starting point for the construction of a map with higher marker density (Borém & Caixeta, 2006). The low availability of polymorphic markers has been a problem for the majority of the cowpea intraspecific maps (Menancio-Hautea, 1993; Menéndez et al., 1997). On the other hand, the use of interspecific crosses (Kaga et al., 1996) can lead to distortions of the expected Mendelian ratios for the alleles of some loci. Despite of supposed narrow genetic base of domesticated cowpea, our results showed that DAF technique was efficient for the generation informative molecular bands.

In a second round, 71 primers including the 47 primers selected previously was applied on the parental accesses of *Vigna unguiculata*, (BR 14-Mulato, IT85F-2687, IT86D-716-1 and

TVu 382), generating a total of 327 polymorphic bands. The 48 most informative primers showed the largest amplicon number (7-22 bands), with 2-14 polymorphisms with an average of 2.6 polymorphic bands in cowpea and 2.7 bands considering the main cross (Table 1).

The results after evaluation using the 89 ISSR primers are shown in Table 3. Thirty two primers did not produce fragments, or gave only faint, non-reproducible bands. Fifteen of these primers had an AT/TA core motif (including one that had a TAT motif), seven had a CT/TC motif, three GT repeat and eight had tri, four and five-nucleotide repeat. Souframanien and Gopalakrishna (2004) reported a similar problem in the case of *V. mungo*. In general, primers with AG, GA, AC and CA repeats show higher polymorphism than primers with other di, tri or tetra nucleotide repeats. AT repeats are the most abundant dinucleotides in plants but the primers based on AT repeats would self anneal and may not amplify (Reddy et al. 2002).

Of the 57 ISSR primers that resulted in successful amplification (1–16 products), 14 did not reveal polymorphisms among the cowpea parental lines analyzed, while 43 uncovered one to four polymorphic products each. The total number of scored bands was 490, with an average of 8.5 bands per primer. Previous studies generated 4 to 12 markers in *Vigna* (Ajibade et al., 2000) and 3 to 26 in *Vigna umbellata* (Muthusamy et al., 2008) using ISSR primers. The potential generation of ISSR marker depends on the variety and frequency of SSRs, a feature that changes among species (Depeiges et al., 1995).

After ISSR primer screening, five primer combinations, UBC811/807, UBC807/841, UBC811/857, UBC810/857, UBC808/857 were selected for use, based on the number of amplified fragments per primer pair. Regarding the primer 811, the use of a single primer generated a single monomorphic band in all tested accessions, while its combination with primer 807 generated four polymorphic bands, revealing the potential of ISSR primer combination, when a single primer is not informative.

Results obtained after data matrix analysis using DAF and ISSR markers with program MEGA version 4.0.2 (bootstrap analysis, 1000 replicates) are presented in Figure 5, generating a basal clade represented by a single Brazilian accession (cultivar BR14-Mulato) obtained from a cross between CNC-0434 and BR1-Poty. From this group two other groups with African accessions from IITA (International Tropical Institute Agriculture) emerged.

Recently, Xavier et al. (2005) accessed genetic similarity among 45 cowpea genotypes (*V. unguiculata* L. Walp.) from Brazil, EUA e Nigeria. Clustering was mainly influenced by the genotype origin. Most accesses from Brazilian landraces belonged to just one cluster, suggesting a limited genetic basis. Only eight primers were polymorphic from 20 tested, with an average 3.75 bands. In our approach, the 48 selected polymorphic primers showed a average of 5.2 bands. The success of our study in identifying polymorphism is due to the use of a number of randomly selected prescreened highly informative primers.

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). In mapping analysis of this crop, segregation distortion was observed using RAPD markers, what did not occurred with the polymorphisms generated by the DAF methodology or with other marker types used [as RGAs (Resistance Gene Analogs), AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms), RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) and SCARs (Sequence Characterized Polymorphisms of DNA)], all considered more reliable for genetic mapping (Winter et al., 2000).

Several studies have reported that 5'-anchored ISSR primers normally generate informative bands (Charters et al., 1996; Matthews et al., 1999). In the present study, 5'-anchored degenerated primers were more successful in amplifying polymorphic bands than primers with 3'-anchors. Wang et al. (1994) commented that the most abundant di-nucleotide

repeat sequence in plant nuclear DNA is (AT)_n, followed by (A)_n/(T)_n and (AG)_n/(CT)_n. Common tri- and tetra nucleotide repeat motifs include (AAT)_n/(ATT)_n, (AAC)_n/(GTT)_n, (AGC)_n/(GTC)_n, (AAG)_n/(CTT)_n, (AATT)_n/(TTAA)_n and (AAAT)_n/(ATTT)_n. However, in the present study it could be observed that none of the (AT)_n primers could amplify the genomic DNA. Similar results were obtained in sesame (Kim et al., 2002), rice (Blair et al., 1999) and in grapevine (Moreno et al. 1998). A possible explanation of these results is that ISSR primers based on AT motifs may be self-annealing, due to sequence complementarities, and would form dimmers during PCR amplification (Blair et al., 1999). However, excellent result was obtained using primers bearing (AG)_n, (GA)_n (GT)_n repeats. The success in amplifying specific bands also depends on the anchoring motif. For example, while primers (AG)₈C and (AG)₈G and AG repeat primers anchored with YT or YA produced clear products, (AG)₈T and (AG)₈YC produced smeared profiles.

The failure of several primers to give clear banding patterns may be due to special requirements regarding amplification conditions, such as alternative chemical stabilizers or improved annealing temperatures. The type of gel electrophoresis and staining method used can also influence the number of scorable bands and the level of polymorphism observed (Pharmawati et al., 2005). Using ISSR primers Godwin et al. (1997) obtained 26 bands after fragment separation using agarose gel electrophoresis, but 77 bands using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) for the same material. Application of high resolution ISSR analysis using PAGE (Zietkiewicz et al., 1994; Blair et al., 1999) might increase the resolving power of the primers used in this study.

To evaluate this concept in cotton (Bao and Wendel, 2001) tested effects of primer mixing on the number of bands generated. In most cases combining two primers did not increase band number beyond that detected with single primers, when using agarose gels, but

when sequencing gels and fluorescently labeled primers were combined, far more bands were observed than when individual primers were use.

A key limitation lies in the relatively small number of ISSR primers that generate useful polymorphisms. For example, Muthusamy et al. (2008) screened 100 designed primers, but found polymorphisms for only 37 combinations. Of these, 70% were comprised of primers targeting CA/AC, GA/AG, TC/CT, TG/GT motifs. Other workers have also found that primers targeting these types of motif account for almost all of the variation revealed (e.g. Raina et al. 2001). The other dinucleotide motif types (AT/TA, GC/CG) have usually yielded no or only small amounts of variation. A further source of additional amplicons in the combined profile may arise whenever binding sites for the two different ISSR primers are sufficiently close to permit their amplification by PCR. These new products are distributed randomly throughout the genome, and so it is extremely unlikely to derive from the same locus (Cekic et al., 2001). The generation of extra variability using ISSR combination primers may therefore enhance the ability of the technique to distinguish between closely related genotypes and, at the same time, reduce the need to screen large numbers of primers. Furthermore, the ability to produce additional amplicons deriving from different loci would greatly enhance the value of the technique for mapping purposes.

Conclusions

The investigation of genetic diversity in cowpea using DAF and ISSR markers are encouraging, notably due to their discrimination power and high reproducibility, revealing the potential of such markers to identify interesting accessions in breeding programs. The results of the present evaluation can be recognized as a starting point for future research aiming to

define the level of intra- and inter-specific genetic diversity within this crop and also to detect hybrids among *Vigna* species.

Acknowledgements

The authors thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, Brazil), the UNESCO (Short-term Biotechnology Program, Paris, France), DAAD (German Academic Interchange Service, Bonn, Germany) for the concession of fellowship. To FACEPE (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Pernambuco, Recife, Brazil) we thank for financial resources. For the concession of seeds from their germplasm bank we thank to IPK-Gatersleben (Institut of Cultivated Plants, Gatersleben, Germany), EMBRAPA-CPMN (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte, Brazil) and IPA (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife, Brazil).

References

- 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.
- 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.
- BAO, L.; WENDEL, J.F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. *Molecular Ecology Notes*, v. 1, p. 205 – 208, 2001.

BLAIR, M.W.; PANAUD, O.; MCCOUCH, S.R. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, p.780-792, 1999.

BOREM, A., CAIXETA, E. **Marcadores Moleculares**. Viçosa, UFV. 2006. 374p.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat ISSR Markers; reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 209-215, 2001.

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

CEKIC, C.; BATTEY, N.H.; WILKINSON, M.J. The potential of ISSR-PCR primer-pair combinations for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.1003, n. 540-546, 2001.

CHARTERS, Y.M.; ROBERTSON, A.; WILKINSON, M.J.; RAMSAY, G. PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5'-anchored simple sequence repeat (SSR) primers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, p. 442-447, 1996.

DEPEIGES, A.; GOLBELY, C.; LENOIR, A.; COCHEREL, S.; PICARD, G.; RAYNAL, M.; GRELLET, F.; DELSENY, M. Identification of the most represented repeated motif in *Arabidopsis thaliana* microsatellite loci. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, p.160-168, 1995.

FANG, J.; CHAO, C.T.; ROBERTS, P.A. and EHLERS, J.D. Genetic diversity of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] in four West African and USA breeding programs as determined by AFLP analysis. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, n. 6, p. 1119-1209, 2007.

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.

GODWIN, I.D.; AITKEN, E.; SMITH, L.W. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. **Electrophoresis**, v. 18, n. 9, p.1524-1528, 1997.

HÜTTEL, B.; WINTER, P.; WEISING, K.; CHOUMAN, E. W.; WEIGAND, F.; KAHL, G. Sequence-tagged microsatellite site markers for chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Genome**, v. 4, p. 210–217, 1999.

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., 1996.

KIM, D.; ZUR, G.; DANIN-POLEG, Y.; LEE, S.; SHIM, K.; KANG, C.; KASHI, Y. Genetic relationships of sesame germplasm collection as revealed by inter-simple sequence repeats. **Plant Breeding**, v.121, p. 259–262, 2002.

MATTHEWS, D.; MCNICOLL, J.; HARDING, K.; MILLAM, S. 5'-Anchored simple-sequence repeat primers are useful for analysing potato somatic hybrids. **Plant Cell Report**, v. 19, p. 210-212, 1999.

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**, v. 95, n. 8, p.1210-1217, 1997.

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

MICHAELS, S. D.; AMASINO, R. M. Removal of polysaccharies from plant DNA by ethanol precipitation. **Biotechniques**, v.17, p. 274-276, 1994.

MORENO, S.; MARTÍN, J.P.; ORTIZ, J.M. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. **Euphytica**, v. 101, p. 117–125, 1998.

MUTHUSAMY, S.; KANAGARAJAN, S.; PONNUSAMY, S. Efficiency of RAPD and ISSR markers system in accessing genetic variation of rice bean (*Vigna umbellata*) landraces. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 11 n. 3, p.1-10, 2008.

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.

PHARMAWATI, M.; YAN, G.; FINNEGAN, P. Molecular variation and fingerprinting of *Leucadendron* cultivars (Proteaceae) by ISSR markers. **Annals of Botany**, v. 95, n.1163-1170, 2005.

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

REDDY, M.P.; SARLA, N. & REDDY, E. A. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and application plant breeding. **Euphytica**, 2002, n. 128, p. 9-17.

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

TARAWALI, S. A., SINGH, B. B.; KORMAWA, P.M.; TAMO, M. (editors). **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production**. Ibadan: IITA, 2002. p.287-300.

SOUFRAMANIEN, J. and GOPALAKRISHNA, T. A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, n. 8, p.1687-1693, 2004.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR,S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p.1596-1599, 2007.

WANG, Z.; WEBER, J. L.; ZHONG, G.; TANKSLEY, S. D.; Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, p.1–6, 1994

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; MEYER, W. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Boca Raton. 1995. 322 p.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, A.J.A and TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WINTER, P.; PFAFF, T.; UDUPA, S.M.; HÜTTEL, B.; SHARMA, P.C.; SAHI, S.; ARREGUIN-ESPINOZA, R.; WEIGAND, F.; MUEHLBAUER, F.J.; KAH, G. Characterization and mapping of sequence-tagged microsatellite sites in the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome. **Molecular and General Genetics**, v. 262, p. 90–101, 1999.

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.

XAVIER, G.R; MARTINS, L.M.V.; RUMJANEK, N.M.; FREIRE-FILHO, F.R. Variabilidade genética em acessos de caupi analisada por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 353-359, 2005.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A. and LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, v. 20, n. 2, p. 176-183, 1994.

Table 1. The 47 most informative primers used in the DAF (DNA Amplification Fingerprinting), including the total number of polymorphic bands and the number of polymorphic bands at intra and interspecific level. Primers ordering by polymorphism level.

Primer			Polymorphic Bands		
Ord.	Name	Sequence 5'→3'	Intraspecific	Interspecific	Total
1.	B-07	GGTGACGCAG	2	15	20
2.	K-8	GAACACTGGG	3	19	19
3.	L-14	GTGACAGGCT	3	16	19
4.	G-06	GTGCCTAACC	3	18	18
5.	K-14	CCCGCTACAC	2	18	18
6.	G-05	CTGAGACGGA	2	17	17
7.	G-10	AGGGCCGTCT	2	17	17
8.	I-1	ACCTGGACAC	2	17	17
9.	R460-2	GCAGGATACG	6	17	17
10.	C-09	CTCACCGTCC	2	16	16
11.	G-12	CAGCTCACGA	3	16	16
12.	E-12	TTATCGCCCC	2	16	16
13.	I-16	TCTCCGCCCT	4	16	16
14.	J-13	CCACACTACC	2	16	16
15.	R470-10	CGCAGACCTC	2	16	16
16.	8-12	CTACCGAC	2	16	16
17.	H-5	AGTCGTCCCC	4	13	15
18.	L-5	ACGCAGGCAC	3	15	15
19.	L-17	AGCCTGAGCC	3	12	15
20.	R160-5	GTCCTCAACG	3	15	15
21.	R260-10	GACCGACACG	3	14	15
22.	R370-9	CGCACTCGTC	2	15	15
23.	A-04	AATCGGGCTG	3	12	14
24.	D-III	GCGATAGCAGA	3	14	14
25.	D-7	TTGGCACGGG	5	14	14
26.	M-6X	CTGGGCAACT	2	11	14
27.	N-6	GAGACGCACA	2	12	14
28.	8-15	CTGATGAC	4	14	14
29.	E-6	AAGACCCCTC	3	13	13
30.	J-12	GTCCCGTGGT	3	13	13
31.	N-5	ACTGAACGCC	3	13	13
32.	C-03	GGGGGTCTTT	3	12	12
33.	A-14	TCTGTGCTGG	3	7	12
34.	H-1	GGTCGGAGAA	3	12	12
35.	I-5	TGTTCCACGG	2	12	12
36.	J-16	CTGCTTAGGG	3	12	12
37.	J-19	GGACACCACT	2	12	12
38.	K-2	GTCTCCGCAA	2	12	12
39.	K-4	CCGCCCCAAC	2	12	12
40.	M-2X	ACAACGCCTC	2	7	12
41.	15-12	AGGICTTGGGTAGGC	5	12	12
42.	D-5	TGAGCGGACA	4	11	11
43.	M-14X	AGGGTCGTTC	3	8	11
44.	R160-8	GTCCTCAGTG	3	11	11
45.	A-IV	GCGAAAGCCAA	1	8	9
46.	N-11	TCGCCGCAAA	3	9	9
47.	R160-9	CGTCGTTACC	2	8	8

Table 2. The 48 most informative primers used in the DAF (DNA Amplification Fingerprinting), including the total number of polymorphic bands in cowpea (*Vigna unguiculata* L.), for the accessions of the main cross (BR 14-Mulato and IT85F-2687) and the test cross (IT86D-716-1 and TVu 382).

Primer		Polymorphic markers			Total	
Nº	Name	Sequence 5'→3'	Main cross	Test cross	Total	number of fragments
1.	B-07	GGT GAC GCA G	4	3	7	11
2.	G-10	AGG GCC GTC T	4	3	7	17
3.	G-06	GTG CCT AAC C	4	3	6	18
4.	B-09	TGG GGG ACT C	4	1	5	15
5.	F-10	GGAAGCTTGG	3	1	5	11
6.	D13	GGGGTGACGA	3	4	7	18
7.	15_7a	GAACCTACGGTGAAG	3	4	7	16
8.	J-16	CCA CAC TAC C	3	1	4	8
9.	R160-9	CGT CGT TAC C	3	4	7	18
10.	G-12	CAG CTC ACG A	3	3	6	16
11.	15_19	CTATGCCGACCCGAC	3	4	7	19
12.	D-7	TTG GCA CGG G	3	4	7	13
13.	J-12	GTC CCG TGG T	3	3	6	14
14.	N-7	CAG CCC AGA G	3	2	5	11
15.	R260-10	GAC CGA CAC G	3	2	5	8
16.	A-14	TCT GTG CTG G	3	1	4	10
17.	15_3	TGCGTGCTTGAGAGA	3	1	4	14
18.	D-13	GGGGTGACGA	3	5	8	18
19.	D-5	TGA GCG GAC A	3	5	8	17
20.	I-16	TCT CCG CCC T	3	4	7	12
21.	N-5	ACT GAA CGC C	3	4	7	19
22.	E-12	TTA TCG CCC C	3	4	7	15
23.	U03-1	CTA TGC CGA C	3	4	7	14
24.	A-04	AAT CGG GCT G	3	3	6	20
25.	15-1	GGA AGC CAA C	3	3	6	15
26.	G-05	CTG AGA CGG A	3	3	6	15
27.	J-13	CCA CAC TAC C	3	3	6	14
28.	OPE-6	AAGACCCCTC	3	3	6	14
29.	G-08	TCACGTCCAC	3	3	6	14
30.	C02	GTGAGGCGTC	3	3	6	15
31.	M-14X	AGG GTC GTT C	3	3	6	14
32.	L-5	ACG CAG GCA C	2	3	5	15
33.	K-14	CCC GCT ACA C	2	3	5	13
34.	D12	CACCGTATCC	2	3	5	22
35.	G-04	AGC GTG TCT G	2	2	4	11
36.	K-4	CCG CCC AAA C	2	1	3	12
37.	L-03	CCA GCA GCT T	2	0	2	13
38.	AIV	GCG AAA GCC AA	2	0	2	15
39.	L-17	AGC CTG AGC C	2	4	6	15
40.	H-5	AGT CGT CCC C	2	2	4	11
41.	B-17	AGGGAACGAG	2	2	4	13
42.	W16	CAGCCTACCA	2	1	3	14
43.	OPH-1	GGTCGGAGAA	2	2	4	7
44.	15-12	AGGTCTTGGGTAGGC	1	3	4	12
45.	I-5	TGT TCC ACG G	1	3	4	10
46.	HPB III	GCGACAGCAGA	1	1	2	12
47.	R460-2	GCA GGA TAC G	1	1	2	7
48.	Z10	CCGACAAACC	1	1	2	7

Table 3. Primers used for inter-simple sequence repeat analysis and their nucleotide sequences, the number of polymorphic fragments and number of amplified fragments as detected in cowpea (*V. unguiculata*), for the accessions of the main cross (BR 14-Mulato and IT85F-2687) and test cross (IT86D-716-1 and TVu 382).

Primer						Primer					
Polymorphisms - Total Fragments						Polymorphisms - Total Fragments					
UBC	Repeat	Ta (°C)	Main Cross	Test Cross	Total	UBC	Repeat	Ta (°C)	Main Cross	Test Cross	Total
807	(AG) ₈ T	50.4	00	02	08	852	(TC) ₈ RA	52.0	00	00	01
808	(AG) ₈ C	52.8	03	02	09	853	(TC) ₈ RT	52.0	00	00	02
809	(AG) ₈ G	52.8	02	01	11	855	(AC) ₈ YT	52.0	00	01	10
810	(GA) ₈ T	50.4	02	00	09	856	(AC) ₈ YA	52.0	01	01	13
811	(GA) ₈ C	52.8	00	00	01	857	(AC) ₈ YG	54.0	00	02	13
812	(GA) ₈ A	50.4	01	00	09	858	(TG) ₈ RT	52.0	01	02	09
816	(CA) ₈ T	50.4	04	01	09	859	(TG) ₈ RC	54.0	03	00	10
817	(CA) ₈ A	50.4	00	01	08	860	(TG) ₈ RA	52.0	00	00	04
818	(CA) ₈ G	52.8	01	02	08	861	(ACC) ₆	58.0	00	00	08
819	(GT) ₈ A	50.4	00	00	05	862	(AGC) ₆	58.0	01	00	08
824	(TC) ₈ G	51.9	01	00	03	864	(ATG) ₆	51.9	03	00	10
825	(AC) ₈ T	50.4	00	03	07	866	(CTC) ₆	58.0	00	00	09
826	(AC) ₈ C	52.8	01	00	09	868	(GAA) ₆	49.7	00	00	03
827	(AC) ₈ G	52.8	00	00	01	869	(GTT) ₆	50.4	01	00	02
828	(TG) ₈ A	52.8	01	00	10	873	(GACA) ₄	52.0	01	01	09
829	(TG) ₈ C	52.8	00	00	02	876	(GATA) ₄	49.7	00	02	16
830	(TG) ₈ G	52.8	01	01	06	878	(GGAT) ₄	52.0	01	01	09
834	(AG) ₈ YT	52.8	02	02	10	879	(CTTCA) ₃	49.7	01	02	16
835	(AG) ₈ YC	52.8	00	01	06	880	(GGAGA) ₃	49.7	02	02	14
836	(AG) ₈ YA	54.0	02	00	05	884	HBH(AG) ₇	52.0	00	00	12
840	(GA) ₈ YT	52.8	00	00	08	886	VDV(CT) ₇	52.0	02	02	15
841	(GA) ₈ YC	52.8	01	01	12	887	DVD(TC) ₇	52.0	02	02	13
842	(GA) ₈ YG	54.0	04	04	12	888	BDB(CA) ₇	52.0	03	02	12
844	(CT) ₈ RC	52.8	01	00	06	889	DBD(AC) ₇	52.0	03	02	19
845	(CT) ₈ RG	54.0	00	03	03	890	VHV(GT) ₇	52.0	00	00	12
846	(CA) ₈ RT	52.8	00	00	06	891	HVH(GT) ₇	52.0	03	01	12
847	(CA) ₈ RC	54.0	01	00	06	811x807	(GA) ₈ C x (AG) ₈ T	52.0	02	03	16
848	(CA) ₈ RG	54.0	00	02	08	807x841	(AG) ₈ T x (GA) ₈ YC	52.0	02	02	14
849	(GT) ₈ YA	52.8	02	04	12	811x857	(GA) ₈ C x (AC) ₈ YG	52.0	02	02	13
850	(GT) ₈ YC	54.0	03	02	11	808x857	(AG) ₈ C x (AC) ₈ YG	52.0	03	04	12
851	(GT) ₈ YG	54.0	02	00	09	810x857	(GA) ₈ T x (AC) ₈ YG	52.0	02	02	16

Single-letter abbreviations for mixed base positions: 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. notG), V = (A,C,G) (i.e. notT).

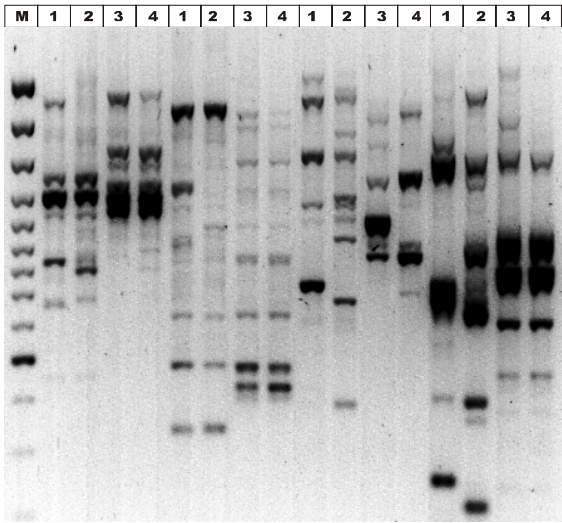


Figure 1. Fragments obtained of DAF reaction with the primers OPK-6, OPK-7, OPK-8 and OPK-9, after electrophoresis in agarose gel. The length of fragments in bp (base pairs) can be estimated for DNA pattern (M, 100 bp). Accessions (1) *V. angularis*, (2) *V. umbellata*, (3-4) *V. unguiculata*.

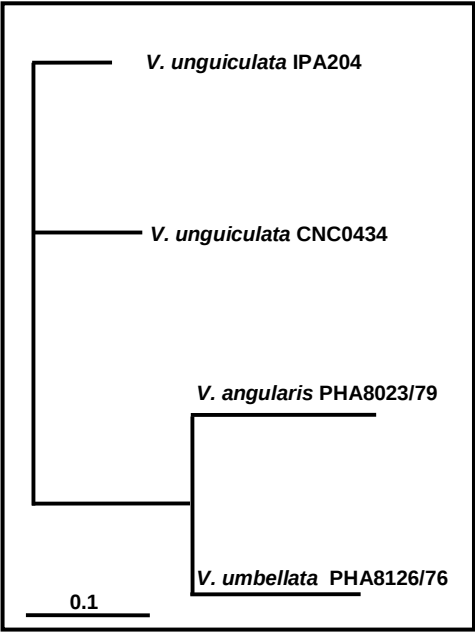


Figure 2. Dendrogram generated after data analysis of DAF reactions using the UPGMA methodology. Scale show the genetic similarity.

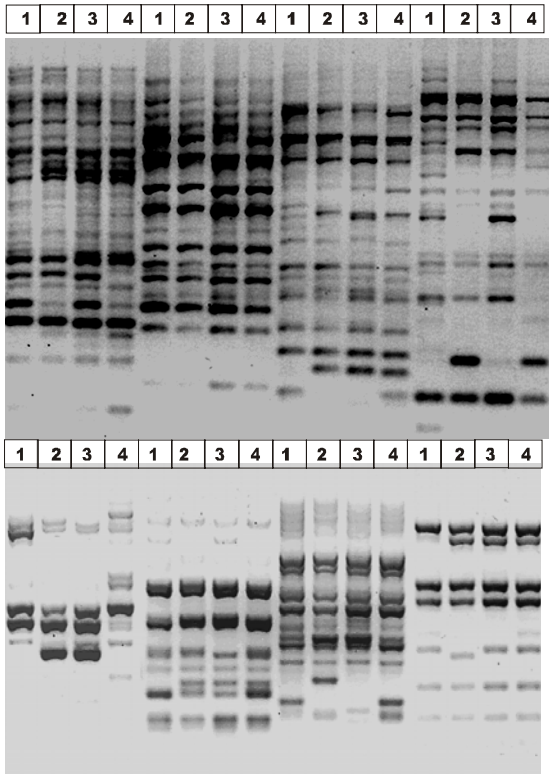


Figure 3 and 4. Fragments obtained of DAF reaction with the primers HPBV, C19, D13, F5, after electrophoresis in agarose gel. Accessions (1) BR 14-Mulato, (2) IT85F-2687, (3) IT86D-716-1, (4) TVu-382. Fragments obtained of ISSR reaction with the primer 825, 886, 888 and 864 after electrophoresis in agarose gel.

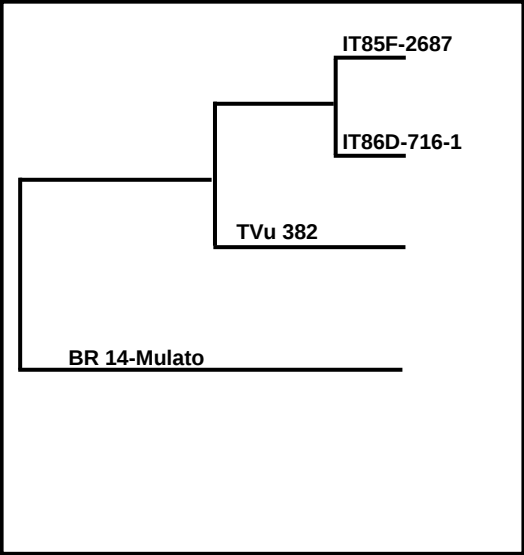


Figure 5. Dendrogram generated after data analysis of DAF and ISSR reactions using the UPGMA methodology.

ANEXOS

Anexo A - Instruções para autores para submissão de trabalhos na revista Pesquisa Agropecuária Brasileira

Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos e não podem ter sido encaminhados a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho. Comissão Editorial faz a análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como escopo, apresentação do artigo segundo as normas da revista, formulação do objetivo de forma clara, clareza da redação, fundamentação teórica, atualização da revisão da literatura, coerência e precisão da metodologia, resultados com contribuição significativa, discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura, qualidade das tabelas e figuras, originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério é aplicado somente aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas, Novas Cultivares e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor. Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia. Não há cobrança de taxa de publicação. Os trabalhos aceitos não podem ser reproduzidos, mesmo parcialmente, sem o consentimento expresso do editor da PAB. Contatos com a secretaria da revista podem ser feitos por telefone: (61)34484231 e 3273-9616, fax: (61)3340-5483, via e-mail: pab@sct.embrapa.br ou pelos correios: Embrapa Informação Tecnológica Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB Caixa Postal 040315 CEP 70770 901 Brasília, DF.

Forma e preparação de manuscritos

- Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos e não podem ter sido encaminhados a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

- São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas, Novas Cultivares e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor.
- Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.
- O texto deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, com margens de 2,5 cm e com páginas e linhas numeradas.

Organização do Artigo Científico

- A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:
- Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.
- Artigos em inglês - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.
- Artigos em espanhol - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.
- O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.
- O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

a) Título

- Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.
- Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como “efeito” ou “influência”.
- Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário. - Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.
- As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

b) Nomes dos autores

- Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção “e”, “y” ou “and”, no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.
- O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.

c) Endereço dos autores

- São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.
- Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.
- Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

d) Resumo

- O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.
- Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.
- Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados e a conclusão.
- Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.
- O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

e) Termos para indexação

- A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.
- Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.
- Não devem conter palavras que componham o título.
- Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.
- Devem, preferencialmente, ser termos contidos no AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus ou no Índice de Assuntos da base SciELO.

f) Introdução

- A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve ocupar, no máximo, duas páginas.
- Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.
- O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

g) Material e Métodos

- A expressão Material e Métodos deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.
- Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.
- Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.
- Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.
- Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas. - Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.
- Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
- Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.
- Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

h) Resultados e Discussão

- A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Deve ocupar quatro páginas, no máximo.
- Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.
- As tabelas e figuras são citadas sequencialmente.
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores.
- Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados.
- Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.
- As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
- As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

i) Conclusões

- O termo Conclusões deve ser centralizado e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo.
- Devem ser elaboradas com base no objetivo do trabalho.
- Não podem consistir no resumo dos resultados.
- Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.
- Devem ser numeradas e no máximo cinco.

j) Agradecimentos

- A palavra Agradecimentos deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser breves e diretos, iniciando-se com “Ao, Aos, À ou Às” (pessoas ou instituições).
- Devem conter o motivo do agradecimento.

k) Referências

- A palavra *Referências* deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.
- Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
- Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
- Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
- Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.
- Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

- Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.

- Artigos de periódicos

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.67-75, 2006.

- Capítulos de livros

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160. – Livros

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. **Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

- Teses

HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR**. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Fontes eletrônicas

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste**: relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em:. Acesso em: 18 abr. 2006.

l) Citações

- Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados.

- A autocitação deve ser evitada.

- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 10520 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.

- Redação das citações dentro de parênteses

- Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação.

- Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.

- Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.

- Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.

- Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.

- Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão “citado por” e da citação da obra consultada.
- Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.
- Redação das citações fora de parênteses
- Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

m) Fórmulas, expressões e equações matemáticas

- Devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.
- Não devem apresentar letras em itálico ou negrito, à exceção de símbolos escritos convencionalmente em itálico.

n) Tabelas

- As tabelas devem ser numeradas sequencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as referências.
- Devem ser auto-explicativas.
- Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.
- Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.
- O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.
- No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.
- Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.
- Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo.
- Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.
- Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.
- Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares. Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.
- As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.
- Notas de rodapé das tabelas
- Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.
- Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.

- Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não-significativo); * e ** (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

o) Figuras

- São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.
- Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.
- O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.
- Devem ser auto-explicativas.
- A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.
- Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.
- Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.
- O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração.
- As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.
- Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).
- Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.
- As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.
- Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.
- Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em possíveis correções.
- Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.
- No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).
- Não usar negrito nas figuras.
- As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.
- Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.