



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

KARLA PEREIRA DA SILVA

**UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NA CARACTERIZAÇÃO DA
DIVERSIDADE GENÉTICA DO BANCO DE GERMOPLASMA DE FEIJÃO-CAUPI
DO INSTITUTO AGRONÔMICO DE PERNAMBUCO - IPA**

Recife
2019

KARLA PEREIRA DA SILVA

**UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NA CARACTERIZAÇÃO DA
DIVERSIDADE GENÉTICA DO BANCO DE GERMOPLASMA DE FEIJÃO-CAUPI
DO INSTITUTO AGRONÔMICO DE PERNAMBUCO - IPA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr^a. Valesca Pandolfi

Coorientador: Dr. Antônio Félix da Costa

Recife
2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Silva, Karla Pereira da

Utilização de marcadores moleculares na caracterização da diversidade genética do banco de germoplasma de feijão-caupi do Instituto Agrônomo de Pernambuco- IPA / Karla Pereira da Silva. – 2019.

66 f. : fig., tab.

Orientador: Valesca Pandolfi

Coorientador: Antônio Félix da Costa

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Recife, 2019.

Inclui referências e anexo.

1. Genética vegetal 2. Feijão-caupi 3. ISSR I. Pandolfi, Valesca (orient.)
II. Costa, Antônio Félix da (coorient.) III. Título.

581.15

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020-054

KARLA PEREIRA DA SILVA

**UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NA CARACTERIZAÇÃO DA
DIVERSIDADE GENÉTICA DO BANCO DE GERMOPLASMA DE FEIJÃO-CAUPI
DO INSTITUTO AGRONÔMICO DE PERNAMBUCO - IPA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas..

Aprovado em: 15 /04/2019.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Valesca Pandolfi (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr. Amaro de Castro Lira Neto (Examinador Externo)
Instituto Agronômico de Pernambuco - IPA

Drª. Mariele Porto Carneiro Leão (Examinador Externo)
Instituto Agronômico de Pernambuco - IPA

A meu querido Pai Carlos Antônio da Silva, a minha querida mãezinha Maria Elizete
Pereira e minha querida mãezinha do coração Diana Freitas

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido fôlego de vida, por ter guiado meus passos, demonstrando sua presença constante no meu viver, dando-me forças e coragem para ultrapassar todos os obstáculos.

Aos meus pais Carlos e Maria, que sempre me criaram com amor, carinho e dedicação.

A Diana Freitas, minha querida mãezinha de coração, com a qual tenho aprendido bastante nestes últimos meses.

A minha família, em especial a minha irmã Herica.

À Prof^a Dr^a Valesca Pandolfi, pela orientação, paciência, compreensão, pelos ensinamentos e pela oportunidade concebida de vencer mais um desafio.

Ao Dr. Antônio Félix da Costa, pela orientação e confiança, assim como pela abundante paciência.

Ao Dr. Amaro de Castro Lira Neto, pela orientação e confiança exercida desde a Graduação, assim como pela paciência e por todos os conselhos.

À coordenação da Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, assim como a todos os professores deste curso pelos seus esforços.

A todos os amigos que fiz ao longo da minha vida. Em especial Kirna, Diego, Walter, Kel, Day, Faby e Déa.

A todos do laboratório de Genoma, em especial Larissa e Edwardo.

A todos do Instituto Agrônomo de Pernambuco, com os quais eu pude aprender muito.

À FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco), pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos aqueles que porventura eu tenha esquecido de mencionar, mas que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho. Obrigada de coração!

*“Há biologia em tudo, mesmo quando
você está se sentindo **espiritual**.”*
(FISHER; HELEN, 2018, p. 3).

RESUMO

No Brasil o feijão-caupi é produzido principalmente no Norte, Nordeste e Centro – oeste, onde desempenha importância socioeconômica. Os Bancos Ativos de Germoplasmas (BAG) constituem uma excelente fonte de material genético para programas de melhoramento. Portanto, para que todo o seu potencial seja explorado é necessário que se conheça a diversidade genética presente no BAG. Neste contexto, os marcadores moleculares representam uma das ferramentas mais adequadas para avaliar a diversidade genética. O presente estudo foi realizado com o objetivo de auxiliar na caracterização da diversidade genética do BAG de feijão-caupi do Instituto Agronômico de Pernambuco por meio de marcadores DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), visando contribuir com o programa de melhoramento dessa Instituição. Foram realizadas extrações de DNA genômico de 80 acessos, mediante a aplicação do protocolo de CTAB 2%. Para as amplificações foram utilizados 12 *primers*, sendo nove de ISSR e três de DAF. A eficácia dos iniciadores na estimativa da diversidade genética foi avaliada por meio dos índices de informatividade (Conteúdo de Informação Polimórfica-PIC, Índice do Marcador-MI e o Poder de Resolução-RP). Também foram levados em consideração o número e a distribuição dos *loci*. A análise de dissimilaridade entre os acessos estudados foi obtida por meio do programa DARwin, mediante o coeficiente de Jaccard. A matriz gerada foi utilizada pelo programa para a construção de um fenograma empregando-se o método *Weighted Neighbor-Joining* como método (*bootstrap* de 30.000 replicações). O número total de *loci* foi de 132 (média de 11 por *primer*), dos quais 78 % foram polimórficos. Foram observados moderados a elevados valores de diversidade genética, com variação moderada de 30 % (827) a 100 % (885). O maior valor de PIC, MI e RP foi obtido para o *primer* OP-G06. Já a maior diversidade genética (Dg) foi obtida pelo marcador ISSR-886. Para os índices de informatividade Dg, PIC e MI, o *primer* com o menor valor foi o ISSR-827. Com relação aos acessos de feijão-caupi, observou-se a formação de três grupos (I, II e III). Desses, o grupo III compreendeu apenas quatro acessos (Canapu verdadeiro, Canapu PE, Canapu BSF e Canapu Araripina), os quais apresentaram alta similaridade entre si. Ainda que seja observada uma

variedade de caracteres entre os acessos dos agrupamentos II e III, pode-se observar semelhança entre eles. Os marcadores DAF e ISSR mostraram-se eficientes para a detecção da diversidade genética dos acessos, sendo também promissores para uso em trabalhos de melhoramento da cultura.

Palavras-chave: ISSR. DAF. PIC. MI. RP.

ABSTRACT

In Brazil, cowpea is produced mainly in the North, Northeast and Midwest, where it plays a socioeconomic importance. Active Germplasm Banks (BGA) constitute an excellent source of genetic material for breeding programs. Therefore, in order to fully exploit their potential, it is necessary to know the genetic diversity present in the BAG. In this context, molecular marker represents one of most adequate tools for the assessment of genetic diversity. The present study was carried out to assist in the characterization of the genetic diversity of the cowpea BGA of the Pernambuco Agronomic Institute using DNA Amplification Fingerprinting (DAF) and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers to contribute to the breeding program. To identify cowpea genetic diversity, genomic DNA was extracted from 80 accessions by applying the 2 % CTAB protocol. For the amplifications, 12 primers were used, being nine ISSR and three DAF. The effectiveness of the primers in the estimation of genetic diversity was evaluated by the informativeness indices (Polymorphic Information Content-PIC; Marker Index-MI and Resolution Power-RP). The number and distribution of loci were also taken into account. In the dissimilarity analysis between the accessions studied was obtained by the DARwin program, using the Jaccard coefficient. The generated matrix was used by the program to construct a phenogram using the Weighted Neighbor-Joining method as the method (bootstrap of 30,000 replications). The total number of loci was 132 (average 11 per primer), of which 78 % were polymorphic. Moderate to high genetic diversity values were observed, with moderate variation from 30% (827) to 100 % (885). The highest value of PIC, MI and RP was obtained for primer OP-G06. The highest genetic diversity (Dg) was obtained by the marker ISSR-886. For the informative indices Dg, PIC and MI, the primer with the lowest value was ISSR-827. Regarding cowpea accessions, three groups (I, II and III) were formed. Of these, group III comprised only four accessions (true Canapu, Canapu PE, Canapu BSF and Canapu Araripina), which showed high similarity to each other. Although a variety of characters is observed between the group II and III lights, we can observe similarity between them. The markers DAF and ISSR proved to be efficient for detecting the genetic diversity of accessions, and are also promising for use in crop improvement works.

Key-words: ISSR. DAF. PIC. MI. RP.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figura 1-** Dendrograma gerado pela análise de dissimilaridade entre os 80 acessos de feijão-caupi estimada pelo coeficiente de *Jaccard*, por meio do programa *DARwin* 6.0.20 empregando-se o método *Weighted Neighbo-Joining* (*bootstrap* de 1.000 replicações).
..... 51

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 -	Acessos de feijão-caupi do BAG do Instituto Agronômico de Pernambuco – IPA utilizados na caracterização genética por meio de marcadores ISSR e DAF	48
Tabela 2 -	Características dos marcadores ISSR e DAF selecionados no estudo da diversidade genética de 80 acessos do BAG de feijão-caupi do IPA, Recife, PE	49
Tabela 3 -	Valores de correlação de Pearson (ρ) entre os índices utilizados	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmento amplificado; <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
BAG	Banco Ativo de Germoplasma
CB	Centro de Biociências
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CTAB	<i>Cetyl trimethyl ammonium bromide</i> ,
Cv	Cultivar
DAF	Impressão do DNA amplificado; <i>DNA Amplification Fingerprinting</i> ;
DG	Diversidade Genética Global
DNA	Ácido Desoxirribonucleico; <i>Deoxyribonucleic Acid</i> ;
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPA	Instituto Agrônomo de Pernambuco
ISSR	Repetições entre sequências simples; <i>Inter Simple Sequence Repeats</i> ;
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MI	Índice do marcador; <i>Marker index</i> ;
NTL	Número total de <i>loci</i> amplificados
NJ	Agrupamento de Vizinhaça; <i>Neighbor-Joining</i> ;
NLM	Número de <i>loci</i> monomórficos
NLP	Número de <i>loci</i> polimórficos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase; <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PIC	Conteúdo de informação polimórfica (<i>Polymorphic Information Content</i>)
RAPD	Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso; <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	Polimorfismo de comprimento por fragmentos de restrição; <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RP	<i>Resolving Power</i> (Poder de resolução)
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único; <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSR	Repetições de Sequência Simples; <i>Simple Sequence Repeat</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	OBJETIVOS.....	15
1.1.1	Objetivo Geral.....	15
1.1. 2	Objetivos Específicos.....	15
2	REVISAO DE LITERATURA.....	17
2.1	CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA E ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO FEIJÃO-CAUPI.....	17
2.2	ORIGEM E CENTRO DE DOMESTICAÇÃO DO FEIJÃO-CAUPI.....	18
2.3	INTRODUÇÃO DO FEIJÃO-CAUPI NO BRASIL E ASPECTOS SOCIOECONÔMICOS.....	19
2.4	DIVERSIDADE GENÉTICA	21
2.5	MARCADORES MOLECULARES.....	22
2.5.1	Marcadores ISSR (<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>)	25
2.5.2	Marcadores DAF (<i>DNA Amplification Fingerprinting</i>).....	26
2.6	MAPEAMENTO GENÉTICO.....	26
2.7	BANCOS ATIVOS DE GERMOPLASMA DE CAUPI	27
2.8	MELHORAMENTO GENÉTICO DO FEIJÃO-CAUPI	29
2.8.1	Objetivos do Programa de Melhoramento Genético do feijão no Brasil.....	31
3	ARTIGO 1 - Utilização de marcadores moleculares do tipo ISSR e DAF na caracterização da diversidade genética do feijão-caupi.....	34
4	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	52
	ANEXO A: NORMAS DA REVISTA.....	60

1 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma leguminosa anual herbácea, autógama, de origem africana (NUNES et al., 2017). As sementes do feijão-caupi são utilizadas na alimentação humana e na ração animal, mas as suas folhas e flor também podem ser utilizadas para essa finalidade (ELMASRY et al., 2019; JAYATHILAKE et al., 2018).

A produção anual de feijão-caupi é de cerca de 4,5 milhões de toneladas, sendo cultivado em todo o sudeste da Ásia, África, Sul dos Estados Unidos, América Latina e alguns países da Europa (JAYATHILAKE et al., 2018). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de feijão-caupi, o qual é cultivado principalmente no Norte (55,8 mil ha), Nordeste (1,2 milhão ha) e no Centro – Oeste (20,1 mil ha) do país, cujo cultivo vem se expandindo desde 2006 (CONAB, 2019). O seu cultivo possui grande relevância socioeconômica, pois, além de gerar emprego e renda, supre a necessidade nutricional da população mais pobre, especialmente no semiárido nordestino (COSTA et al., 2013).

Devido à baixa qualidade das sementes utilizadas pelos pequenos e médios agricultores do Nordeste, dentre outros fatores, o cultivo de feijão-caupi tem tido uma baixa produtividade. Esse fato pode estar relacionado ao pequeno número de cultivares melhoradas quando comparado com outras culturas, tornando necessário o fortalecimento de programas de melhoramento genético para esta região, possibilitando ao pequeno agricultor o acesso a cultivares registradas, produtivas, adaptáveis e estáveis para o cultivo.

O aumento da procura deste alimento desencadeou a busca de genótipos que atendam a características desejáveis, como alta produtividade (SANTOS et al., 2016), a seca (RODRIGUES et al., 2016) e a fatores pragas (CARVALHO; LIMA, e ALVES (2011). Consequentemente, a busca por cultivares com característica de interesse comercial tende a ocasionar a redução da diversidade genética, gerando baixa adaptabilidade ou até mesmo a extinção da espécie. Este fato reforça a importância da manutenção da variabilidade genética mediante a construção de Bancos Ativos de Germoplasma - BAG (CARLINI-GARCIA, PINTO e LANDELL, 2013), os quais representam ferramentas importantes na seleção de genótipos que melhor se adaptam aos sistemas de cultivo desejados (BERTINI, TEÓFILO e DIAS,

2009), constituindo excelentes fontes de diversidade genética. Neste sentido, os marcadores moleculares podem contribuir para acelerar os estudos de diversidade genética e na obtenção de novas cultivares, funcionando como ferramenta indispensável ao melhoramento genético vegetal.

Marcadores moleculares baseados em DNA são frequentemente utilizados para investigar o genoma de plantas com diversas abordagens, tais como caracterização da variabilidade genética, mapeamento do genoma, localização de genes, análise de evolução do genoma, genética populacional, taxonomia, melhoramento e diagnósticos (SHARMA, NAMDEO e MAHADIK, 2008). Dessa forma, a caracterização da diversidade genética do BAG do IPA pode ser refinada mediante aplicação dos marcadores de DNA (WEISING et al., 2005).

Dentre as técnicas disponíveis, as análises da impressão genômica do DNA (*DNA fingerprinting*) produzem, ao nível de diferenciação de cultivares, uma série de informações relevantes (TANYA et al., 2010). Neste contexto, marcadores DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) estão entre os mais utilizados nas análises de *fingerprinting* de DNA e caracterização molecular (NYBOM, 2004).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Caracterizar, através de marcadores moleculares, a diversidade genética de diferentes acessos de feijão-caupi do BAG/IPA, com vistas à seleção de acessos potenciais a serem incorporados a programas de melhoramento dessa cultura.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Conduzir experimento de germinação de acessos de feijão-caupi pertencentes ao BAG/IPA, bem como realizar a caracterização fenotípica dos mesmos;
- Acessar, por meio dos marcadores moleculares DAF e ISSR, a diversidade genética do banco e estimar com *softwares* apropriados a distância genética entre os acessos.
- Construir um banco de DNA para uso futuro em melhoramento e estudos genéticos.

- Contribuir para a conservação dos recursos genéticos do BAG/IPA, prevenindo e evitando a perda desse importante recurso genético

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA E ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO FEIJÃO-CAUPI

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], também conhecido como feijão-macassar, feijão-fradinho ou feijão-de-corda (CORREA et al., 2012), é uma planta Dicotyledoneae, pertencente à ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolineae, gênero *Vigna*, subgênero *Vigna*, secção *Catjang*, espécie *V. unguiculata* (L.) Walp. e subespécie *unguiculata* (PADULOSI e NG, 1997; FREIRE FILHO et al., 2005; VIJAYKUMAR; SAINI e JAWALI, 2010). A subsp. *unguiculata* foi dividida em quatro cultigrupos: *Unguiculata*, *Sesquipedalis*, *Biflora* e *Textilis* (JAYATHILAKE et al., 2018; BOUKAR et al., 2018). No Brasil, somente são cultivados os cultigrupos *Unguiculata* (constituindo quase a totalidade das cultivares locais e melhoradas) e *Sesquipedalis*, comumente cultivados para produção de vagem (FREIRE FILHO et al., 2005). Além do feijão-caupi, diversas espécies do gênero *Vigna* apresentam importância socioeconômica a exemplo do amendoim bambara, (*V. subterrânea*), feijão-mungo (*V. radiata*), feijão-rajado (*V. mungo*), feijão traça feijão *azuki* (*V. angularis*) e feijão-arroz (*V. umbellata*. e *V. aconitifolia*) (AJIBADE; WEEDEN; CHITE, 2000).

O feijão-caupi é uma planta herbácea, anual, que apresenta variação de porte (ereto a prostrado) e hábito de crescimento determinado e indeterminado. Normalmente o tipo de ramificação encontrado no Brasil é do tipo indeterminado, sendo caracterizada pelo crescimento contínuo do caule e emitindo novas ramas secundárias e gemas florais (MACHADO et al., 2007). As folhas podem ser classificadas em quatro categorias, sendo: subglobosa, sub-hasteada, globosa e haste/ lanceolada (CARVALHO et al., 2017). As flores apresentam os órgãos reprodutivos protegidos por cinco pétalas brancas, amarelas ou roxas (TEÓFILO et al., 2001). Segundo Carvalho et al. (2017), as vagens diferem em tamanho, forma,

cor e textura. As sementes também apresentam variação de cor (branca, bege, verde, cor de couro, vermelha, marrom ou preta), com forma arredondada, ovalada, romboide, reniforme, comprimida, elíptica, quadrangular e losangular. É uma planta autógama, embora apresente uma taxa reduzida de reprodução cruzada (1 - 9,5 %), constituindo, desta forma, um genoma estável, o que impede a introgressão de caracteres não desejados (SOUSA et al., 2006).

2.2 ORIGEM E CENTRO DE DOMESTICAÇÃO DO FEIJÃO-CAUPI

Entre as formas silvestres do feijão-caupi, a var. *spontanea* (Schweinf.) (referida por *V. unguiculata* subesp. *dekindtiana*), apresenta-se como parental mais próximo. Apesar da sua ampla distribuição no continente africano, estudos moleculares sugerem um único evento de domesticação (PASQUET, 2000).

Várias hipóteses foram formuladas para explicar não só sua origem, mas a origem da domesticação do feijão-caupi. Com base em achados arqueológicos, uma corrente de pesquisadores sustenta a hipótese de origem na Ásia ou América do Sul, com ampla distribuição na Ásia (FREIRE FILHO, 1988; MAGLOIRE, 2005; SIMON et al. 2007). Entretanto, a ausência de espécies silvestres (como possíveis genitores) no continente asiático gerou questionamentos sobre tal afirmação (TIMKO and SINGH, 2008) sendo, então, sugerido uma possível origem Africana (XIONG et al. 2016), tendo em vista que as formas silvestres são endêmicas deste continente (COULIBALY et al., 2002). O continente africano é considerado o centro de domesticação do feijão-caupi. No entanto, a localização exata é incerta, tanto as teorias de domesticação ocidental quanto a leste são atualmente aceitas (XIONG et al., 2016). A África Ocidental como centro de domesticação foi proposto com base no maior nível de diversidade morfológica, na existência de intermediários de ervas daninhas entre o feijão-caupi silvestre e cultivado, e nas evidências arqueológicas mais antigas para o feijão em Gana (África) (COULIBALY et al., 2002).

A ocorrência de intermediário de feijão-caupi doméstico encontrado no Oeste e na África central também é utilizada como evidência de domesticação nesta região (XIONG et al., 2016). No entanto, a ausência da espécie silvestre e o alto nível de diversidade morfológica na Etiópia e África do Sul levantam dúvidas com relação a essa hipótese (COULIBALY et al., 2002). Já a teoria de domesticação no Leste é apoiada por Xiong et al. (2016) que também sugerem a Índia como sendo o centro

de domesticação secundário. Por outro lado, Coulibaly et al. (2002) afirmam ser improvável a domesticação nesta região.

A dificuldade na inferência do centro de domesticação do feijão-caupi está relacionada com a existência de um fluxo gênico, o qual dificulta a distinção entre o estado ancestral e a evolução pós-domesticação. Segundo Huynh et al. (2013), os processos de divergência foram importantes para a domesticação e formação de fluxo gênico.

2.3 INTRODUÇÃO DO FEIJÃO-CAUPI NO BRASIL E ASPECTOS SOCIOECONÔMICOS

Tendo em vista o forte comércio entre o Oeste da África, de Guiné à Angola, e o Brasil (BARRACLOUGH, 1995), acredita-se o feijão-caupi tenha sido introduzido pelos colonizadores portugueses, por volta do século XVI, através da Bahia (a capital administrativa do Brasil) (OLIVEIRA et al., 2015). A partir daí houve uma intensa disseminação da cultura por todo o país, sobretudo nas regiões Norte e Nordeste (FREIRE FILHO et al., 2011).

Atualmente a maior parte da produção do caupi encontra-se nas regiões Norte e Nordeste (particularmente Ceará, Piauí e Bahia), com grande expansão na região Centro-Oeste, a qual destaca-se com o maior rendimento produtivo (CONAB, 2018). Essa leguminosa apresenta boa adaptação às condições semiáridas de calor e seca (COLLADO et al., 2018). Devido a sua fixação eficiente de nitrogênio durante o rodízio de culturas, essa planta também permite o aumento da fertilidade do solo e redução de consumo de nitrogênio (CHEN et al., 2017), a qual, segundo Malviya et al. (2011) chega a 80 %. A eficiência de fixação de nitrogênio está relacionada com a simbiose existente entre o feijão-caupi e algumas bactérias (CHIDEBE; JAISWAL; DAKORA, 2017).

Dentre as propriedades nutricionais, destaca-se o alto conteúdo proteico (aproximados 20 – 30 % do peso da semente), de carboidratos, minerais e vitaminas (HALL et al., 2003). Com um dos maiores índices de ácido fólico, o feijão-caupi apresenta um papel fundamental na alimentação humana, principalmente para a população de baixa renda, em países subdesenvolvidos, onde a desnutrição é fator de risco de mortalidade infantil (JAYATHILAKE et al., 2018). O consumo na

alimentação humana se dá, principalmente, em forma de grão seco, embora suas folhas, sementes e vagens imaturas também são utilizadas para essa finalidade (COLLADO et al., 2018). Além da alimentação humana, esta planta desempenha um papel fundamental na alimentação de animais em período de seca em diversos países (CHEN et al., 2017).

O cultivo do feijão-caupi se estende por todo o sudoeste da Ásia, África, sul dos Estados Unidos e na América Latina, além de alguns países do mediterrâneo, tais como a Croácia, Hungria, Sérvia e a Eslovênia (JAYATHILAKE et al., 2018). Em 2016, o Brasil figurou como o quarto maior produtor de feijão-caupi no mundo, ficando atrás apenas da Nigéria, Níger e Burkina Faso (BONFIM-SILVA et al., 2018). Segundo Oliveira et al. (2018), o Brasil tornou-se o terceiro maior produtor do mundo, demonstrando que o cultivo de feijão caupi está se expandindo no país.

Embora sejam cultivadas várias espécies de feijão no Brasil, somente as espécies *Phaseolus vulgaris* (L.) e *Vigna unguiculata* (L.) Walp. são referidas como “feijão” pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, BRASIL, 2008) e, portanto, as mais importantes social e economicamente no País. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), nas safras 2018/ 2019 foram produzidas 755,2 mil toneladas de feijão-caupi no país, correspondendo a mais de 10 % da produção mundial no ano de 2017.

O cultivo no semiárido nordestino e pequenas áreas da Amazônia é caracterizado como agricultura familiar, onde pouca ou nenhuma tecnologia é utilizada, resultando em baixo rendimento. Nessas regiões, o feijão-caupi também constitui alimentação básica da população de baixa renda, sendo uma das principais fontes de renda e emprego dessa região (COSTA et al., 2013). Nos últimos anos, tal cenário tem sido modificado, tendo em vista o aumento da produção de feijão-caupi no Centro-Oeste do Brasil, principalmente pelo aumento de área de cultivo, emprego de tecnologias e desenvolvimento de cultivares mais adaptadas para essa região (FREIRE FILHO et al., 2011).

As regiões Norte e Nordeste apresentam a maior área de produção e a região Centro-Sul com a maior produtividade (safras 2018/ 2019), com exceção da terceira safra, onde não teve produção deste grão. Durante a segunda safra 2018/ 2019 esta região produziu o corresponde a 45,6 % da produção brasileira, com apenas 22,3 % da área plantada no país (CONAB, 2019).

2.4. DIVERSIDADE GENÉTICA

A diversidade genética (DG) refere-se à variabilidade fenotípica de um grupo de indivíduos, sendo fundamental na habilidade adaptativa das espécies (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017). Apresenta implicações na evolução e conservação das espécies, sendo uma condição para a manutenção da biodiversidade (ELLEGREN e GALTIER, 2016). Portanto, a DG é a base dos programas de melhoramento genético, uma vez que representa a fonte de genes a ser utilizada no desenvolvimento/ melhoria de cultivares (SANTANA et al., 2011).

Os estudos da variabilidade genética permitem a determinação da relação entre caracteres, na sugestão de cruzamento entre acessos, auxiliam na elaboração de uma coleção nuclear (MARIM et al., 2009), como também são úteis na elaboração de estratégias de conservação de recursos genéticos (SILVA et al., 2018).

Tendo em vista os constantes desafios em seus ambientes naturais, ao longo de milhares de anos, as espécies silvestres apresentam diversidade genética maior em relação às espécies domesticadas (melhoradas), representando um recurso genético potencial para uso em programas de melhoramento genético de plantas cultivadas (ZHANG et al., 2016; MUÑOZ et al., 2017). Entretanto, para muitas espécies, essa “riqueza” genética é ainda pouco conhecida e, portanto, pouco representada em bancos de germoplasma (CASTAÑEDA-ÁLVAREZ, et al., 2016).

A variabilidade genética do feijão-caupi está associada aos processos de segregação e eventos de mutação disseminados ao longo do tempo, desde sua primeira introdução no Brasil (CORREA et al. 2012). Durante sua introdução em diferentes regiões brasileiras, os escravos africanos trouxeram com eles muito de sua cultura, inclusive sementes de plantas (e com elas o feijão-caupi) que eram utilizadas em pratos típicos ou em rituais (SIMON et al., 2007). Assim, sob efeito da seleção natural para adaptabilidade e/ou seleção artificial para características de interesse agrônomo, as variedades tradicionais (cultivares crioulas ou locais) tornaram-se uma valiosa fonte de variabilidade genética (FREIRE FILHO et al., 1981; FREIRE FILHO et al., 2005).

Portanto, tão importante quanto a utilização dos recursos genéticos em programas de melhoramento genético (visando obter cultivares cada vez mais adaptadas e com elevado potencial produtivo) é a conservação destes para que o processo de erosão genética não venha causar a perda da capacidade adaptativa, tornando as espécies de importância socioeconômica susceptíveis aos fatores de estresse tanto abiótico como biótico (MILOŠEVIĆ et al., 2010).

Dentre as inúmeras formas de mensurar a diversidade genética de um germoplasma, os métodos baseados em marcadores moleculares apresentam seu lugar de destaque (AVISE, 2004).

2.5. MARCADORES MOLECULARES

O melhoramento genético tem sido um dos grandes responsáveis pelos avanços na agricultura, com o desenvolvimento de cultivares superiores, quer pela maior produtividade, quer pela melhor adaptação aos ambientes adversos. Consequentemente, o sucesso de um programa de melhoramento genético vegetal depende, fundamentalmente, da escolha dos genitores e da seleção de genótipos superiores (GUIMARÃES et al., 2009). Segundo Fang et al. (2016), marcadores moleculares auxiliam na identificação e na análise de cultivares, na pureza de sementes; fornece suporte técnico para avaliação, preservação e inovação de recursos do germoplasma vegetal; na previsão de heterose; construção de mapa genético; no mapeamento genético, clonagem e na reprodução assistida por marcadores.

Um marcador genético pode ser definido por qualquer característica que evidencie diferença entre indivíduos (variação ou polimorfismo), que em uma população segregante se comporte de acordo com as leis mendelianas, e que possa ser associado a outras características de interesse (BORÉM, 1997; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Basicamente, os marcadores genéticos utilizados em plantas são classificados em: morfológicos, bioquímicos e moleculares (TOPPA e JADOSKI, 2013).

Até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos/ fenótipos de fácil identificação visual (FERREIRA e GRATTAPAGLIA,

1998). Apesar de ainda serem a base do melhoramento genético convencional (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017), há algumas limitações como o número reduzido de marcas fenotípicas e a influência ambiental, os marcadores morfológicos têm sido gradativamente substituídos por outros marcadores (GUIMARÃES e MOREIRA, 1999). Ainda na década de 60, o uso de isoenzimas (diferentes formas moleculares de uma mesma enzima, codificadas por diferentes alelos) como marcadores bioquímicos permitiram a construção de mapas genéticos em diversas espécies de plantas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

A partir da década de 80, com o advento das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível a manipulação do DNA, culminando com o surgimento dos marcadores moleculares. Marcadores moleculares permitem a avaliação, em curto prazo, de um número elevado de genótipos, além de não sofrerem influência ambiental como ocorre com marcadores morfológicos (GUIMARÃES et al., 2009). No entanto, os marcadores morfológicos ainda são utilizados no melhoramento convencional de plantas, no qual as características desejáveis são selecionadas nos genitores para os cruzamentos (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Marcadores moleculares podem ser definidos como *loci* gênico, facilmente detectados e quantificados em uma população, podendo ou não estar associados a um determinado gene ou traço de interesse. Os polimorfismos surgem de vários tipos de mutações (a base da identificação dos marcadores), principalmente substituições/ deleções/ inserções. Devido a sua herança mendeliana, é possível acompanhar sua transmissão de geração a geração. Como é muito grande a variação no número e no tipo de mutações estáveis do DNA, é possível identificar um indivíduo com base no seu padrão de polimorfismo (KUMAR et al., 2009, HAYWARD et al., 2015).

O uso de marcadores eficientes permite uma maior eficácia na organização do germoplasma, na escolha do genótipo adequado e dos métodos de seleção a serem utilizados. Portanto, a escolha do melhor marcador irá depender dos recursos disponíveis e da distância genética entre os genótipos a serem recombinados (CARVALHO et al., 2011).

Os marcadores moleculares diferem em relação a propriedades importantes, tais como: abundância genômica, nível de polimorfismo detectado, especificidade de *locus*, reprodutibilidade, além de necessidades técnicas e de recursos. Com base

nisso, os principais tipos de marcadores moleculares baseados em DNA podem ser classificados em duas grandes categorias (de acordo com a metodologia utilizada para identificá-los): (1) Os marcadores baseados em hibridação do DNA (ex. RFLP- *Restriction Fragment Length Polymorphism*); e (2) Os marcadores baseados na PCR (ex. DAF - *DNA amplification fingerprinting*; ISSR - *Inter Simple Sequence Repeat* e SSR - *Simple Sequence Repeat*) (KUMAR et al., 2009). Além desses, um terceiro grupo de marcadores: (3) os marcadores baseados na variação entre sequências e na utilização de *chips* de DNA (ex. marcadores *indel* e os SNPs - *Single Nucleotide Polymorphism*) (GUPTA; ROY e PRASAD, 2001)

Segundo Guimarães et al. (2009), os marcadores mais utilizados nas décadas 80 e 90 foram do tipo RFLP, RAPD (*Radom Amplified Polymorphic DNA*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymotphism*), embora ainda continuam sendo aplicados para alguns estudos genéticos. Estes marcadores permitiram a construção dos primeiros mapas genéticos de muitas espécies cultivadas, a descoberta de genes importantes e inúmeros estudos de diversidade genética.

Os marcadores AFLP apresentam números significativos de bandas polimórficas, são reprodutíveis e permitem a identificação de indivíduos com base na diferença de apenas um nucleotídeo. Este tipo de marcador continua sendo utilizado por vários grupos de pesquisa, principalmente quando a quantidade de indivíduos analisados não é grande e a disponibilidade de recursos financeiros é limitada (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Os microssatélites foram rapidamente implementados em diversas espécies vegetais, sendo utilizados ainda hoje na construção de mapas genéticos, nos estudos de diversidade e no melhoramento assistido (GUIMARÃES et al., 2009). Representam uma das classes mais polimórficas de marcadores moleculares presentes nos genomas (MISHRA e TOMAR, 2014).

Os Marcadores do tipo ISSR surgiram com a dificuldade de gerar *primers* específicos para amplificação com SSR, sendo também muito usados na caracterização de plantas e fungos (GUIMARÃES et al., 2009) e em análises de diversidade genética (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Tendo em vista a alta produtividade, velocidade e qualidade dos dados gerados, o uso dos marcadores moleculares tem sido cada vez mais frequente no

melhoramento genético de plantas como uma ferramenta na avaliação e caracterização de germoplasmas (FREIRE FILHO et al., 2011).

Diversos marcadores como RFLP (FATOKUN et al., 1993), AFLP (FANG et al. 2007), DAF (SIMON et al., 2007), e RAPD (ZANNOUOU et al., 2008; KHAN, T, et al., 2015)) foram amplamente usados para estudos de diversidade genética e para construção de mapas de ligação do feijão-caupi. A utilização de marcadores moleculares tem sido ampliada, principalmente em função dos avanços nas tecnologias de sequenciamento de alto rendimento (NGS, *Next Generation Sequencing*), onde um genoma inteiro pode ser sequenciado em curto espaço de tempo, a custos cada vez mais baixos (VAN EMON, 2015). Após a primeira tentativa de sequenciamento do genoma do feijão-caupi (TIMKO et al., 2008), marcadores como SNP (XU et al., 2011; MUCHERO et al., 2009) e SSR (KONGJAIMUM et al., 2012) foram usados no enriquecimento de mapas moleculares do gênero *Vigna*.

2.5.1. Marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*)

Os marcadores ISSR foram desenvolvidos a partir dos microssatélites (SSR), cujas amplificações são realizadas com um único *primer* sintetizado com base em várias repetições (motivos de SSR) e ancorado com 2 a 4 nucleotídeos arbitrários (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017). É um método simples e rápido, que combina a maioria das vantagens dos SSRs, do AFLP e a universalidade do RAPD (GUIMARÃES et al., 2009). No entanto, esse marcador apresenta algumas desvantagens, principalmente com relação à análise das informações geradas, devido ao seu caráter dominante.

Portanto, o ISSR é utilizado em estudo de diversidade genética que requer um grau de confiança superior aos resultados fornecidos pelo RAPD, mas que tenha um custo inferior aos trabalhos desenvolvidos com SSR (SEMAGN; BJØRNSTAD e NDJIONDJOP, 2006).

Dentre suas aplicações destacam-se: estudos de identidade genética, de parentesco, identificação e clonagem da estirpe, estudos taxonômicos de espécies estreitamente relacionadas, estudos de mapeamento genético, entre outros (KUMMAR et. al., 2009).

Descrita por Meyer et al. (1993) e, devido ao fato de não necessitar informação prévia da sequência, além do baixo custo associado à técnica (SILVA et al., 2016), ISSR continua sendo um dos marcadores moleculares mais utilizados em estudos de diversidade e variabilidade genética, em diversas espécies, a exemplo de milho (MUHAMMAD et al., 2017), banana (SILVA et al., 2017), *Campomanesia phaea*, espécie nativa da floresta Atlântica (SANTOS et al., 2016) e em feijão-caupi (NOVA et al., 2014; DIAS et al., 2015, IGWE et al., 2017), contribuindo, assim, para conservação do recurso genético da espécie.

2.5.2. Marcadores DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*)

O marcador molecular DAF é uma variação da técnica de RAPD, o qual consiste na utilização de *primers* arbitrários para amplificação mediada pela DNA polimerase na PCR (AP-PCR). Esta técnica se diferencia do RAPD por utilizar iniciadores com fragmentos maiores para gerar um número superior de polimorfismo com alta reprodutibilidade (KUMAR et al., 2009).

O polimorfismo genético ocorre devido a diferenças no DNA (deleções/inserções de nucleotídeos), nos sítios de anelamento, ou entre eles. Por sua natureza binária (presença ou ausência do segmento amplificado), marcadores DAF não distinguem indivíduo homozigoto dominante de heterozigoto para um determinado locus. Apresenta baixo custo e não exige conhecimento prévio do genoma, assim, um mesmo conjunto de *primers* pode ser usado para amplificar o DNA dos mais diversos tipos de plantas.

A técnica de DAF tem sido utilizada com eficiência em trabalhos envolvendo estudo de diversidade genética de feijão-caupi, a exemplo de Simon et al. (2007), Spiaggia; Carvalho e Benko-iseppon (2009), Onofre (2012) e Amorim (2013), demonstrando ser adequado na avaliação de variabilidade genética desta cultura.

2.6 MAPEAMENTO GENÉTICO

Um mapa genético (ou mapa de ligação) é um mapa das frequências de recombinação entre os marcadores testados nos cromossomos homólogos durante a meiose. A frequência de recombinação entre dois marcadores é proporcional à

distância que os separa, portanto, quanto maior a frequência de recombinação, maior a distância entre os dois marcadores genéticos. Assim, um mapa genético é uma representação de eventos e frequências de recombinação (SAHU; DHOLE; MONDAL, 2019). O princípio do mapeamento genético molecular está baseado na premissa de que marcadores (semelhantemente aos genes), podem ser mapeados nos cromossomos usando a segunda lei de Mendel e análise da frequência dos fenótipos recombinantes (KUMAR; PRATAP; SOLANKI, 2009).

De forma geral, a construção de um mapa de ligação se inicia com a escolha dos genitores a serem cruzados e com o desenvolvimento de uma progênie segregante, de forma que maximize o polimorfismo genético (GRATAPAGLIA e SEDEROFF, 1994; VERHAEGEN et al., 1997). A próxima etapa envolve a obtenção de marcas contrastantes entre os genitores (que apresentem segregação mendeliana) na população de mapeamento. A abordagem na localização das marcas polimórficas vai depender do tipo de marcadores utilizados e da diversidade genética da espécie estudada. É nesta etapa que a utilização de marcadores moleculares auxilia na construção dos mapas genéticos. Em seguida é realizada a análise do padrão de amplificação dos indivíduos do restante da população de mapeamento e a obtenção das estimativas de recombinação (ROCHA et al., 2003; SAHU; DHOLE; MONDAL, 2019).

2.7 BANCOS ATIVOS DE GERMOPLASMA DE CAUPI

Bancos de germoplasma são coleções onde ficam armazenados germoplasmas de uma ou de várias espécies, podendo estar localizados em centros de pesquisa ou instituições públicas e privadas (FERREIRA, 2011). Estes bancos contribuem para a conservação das espécies e na preservação da sua diversidade genética, constituindo fontes de alelos raros úteis para o melhoramento genético (REYES-VALDÉS et al., 2018). Desta forma, pode-se dizer que os bancos de germoplasma são ferramentas úteis tanto para conservação de uma espécie como para o melhoramento de culturas de interesse agrônomo (MACHADO et al., 2016).

O germoplasma vegetal pode ser conservado tanto *in situ* como *ex situ*. A conservação *in situ* é caracterizada pela conservação de espécies viáveis nos seus habitats naturais como, por exemplo, a conservação de reservas naturais. Já a

conservação *ex situ* trata-se da proteção dos componentes da diversidade biológica fora do ambiente natural, como é o caso do banco de genes (FAO, 2018).

A conservação de germoplasma de plantas em banco de sementes sobre condições que maximizem sua expectativa de vida pós-colheita é a forma mais conveniente de conservação *ex situ*, por se tratar da unidade de propagação comum para a maioria das plantas superiores (BERJAK E PAMMENTER, 2014). No entanto, este método é inadequado para os vegetais que produzem sementes recalcitrantes e intermediárias, como é o caso da maioria das espécies frutíferas (FERREIRA, 2011). Um exemplo de banco de sementes é o banco de germoplasma de alface da Universidade Federal de Lavras (UFLA) (GUIMARÃES; MANDELLI e SILVA, 2011). Outra forma de conservação do germoplasma é por meio dos bancos de campo. Este tipo de banco permite a manutenção do germoplasma de vegetais que possuem sementes recalcitrantes, intermediária e os que se reproduzem por propagação vegetativa (FERREIRA, 2011).

Segundo Freire Filho et al. (2009), os recursos genéticos de feijão-caupi disponíveis para programas de melhoramento genético estão disponíveis em quatro tipos de coleção de germoplasma: a coleção de base internacional, coleção de base nacional, a coleção ativa e a coleção de trabalho.

A coleção de base internacional está localizada em um instituto internacional de pesquisa, e possui a finalidade de assegurar o material genético para as demandas atuais e futuras de diversos programas de melhoramento genético de todos os países interessados. A principal coleção de germoplasma internacional de feijão-caupi está localizada na Nigéria, no Instituto Internacional de Agricultura Tropical (*International Institute of Tropical Agriculture - IITA*), fundada em 1975 para liderar o desenvolvimento de estratégias de conservação global dos recursos genéticos do feijão-caupi e dos seus parentes silvestres, principalmente no continente africano. Atualmente, esta coleção conta com 15.933 cultivares de caupi, coletados em mais de 88 países (IITA, 2019). Outra coleção encontra-se localizada na Estação Regional da Geórgia de Introdução de Plantas, com cerca de 7.400 acessos, da Universidade da Califórnia, em Riverside, com 5.275 cultivares e 50 acessos selvagens (EHLERS e HALL, 1997).

Com relação às coleções nacionais, elas estão localizadas em um lugar estratégico, pertencente a instituições nacionais, como é o caso da coleção de

feijão-caupi, no Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN, em Brasília, o qual conta com, cerca de 4.845 acessos de *Vigna* (WETZEL et al., 2005).

Já as coleções ativas são destinadas a atender às necessidades de germoplasma da instituição que a detém. No Brasil pode-se citar duas coleções: a da Embrapa Meio-Norte (em Terezina, PI), com cerca de 3.500 acessos, e a do Centro de Ciências Agrárias (da Universidade Federal do Ceará), com quase 1.000 acessos (WETZEL et al., 2005). As coleções de trabalho compõem o material genético manuseado pelo melhorista e, portanto, apresentam uma variabilidade restrita. São o caso da coleção de feijão-caupi da Embrapa Meio-Norte, do Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA (em Recife, PE) e da Embrapa Semiárido (em Petrolina, PE) (FREIRE FILHO et al., 2009).

O Banco de Germoplasma de feijão-caupi do IPA é constituído, em sua maior parte, por cultivares oriundas de comunidades locais e de centros de pesquisa, nacionais e internacionais. O programa de melhoramento do IPA é responsável pela criação de cultivares mundialmente conhecidos, a exemplo do cultivar “Miranda IPA 207”.

No entanto, muitos acessos pertencentes a essa coleção ainda precisam ser estudados, principalmente quanto a sua diversidade genética. Atualmente, a Embrapa Meio-Norte é a principal instituição responsável pelo melhoramento genético do feijão-caupi no país, a qual tem sua coleção de trabalho proveniente de coletas nacionais, acessos internacionais introduzidos pelo IITA e dos Estados Unidos (WETZEL et al., 2005).

2.8 MELHORAMENTO GENÉTICO DO FEIJÃO-CAUPI

No Brasil, os programas de melhoramento genético do feijão-caupi foram iniciados em 1925, quando Henrique Lôbbe publicou um estudo avaliando 12 cultivares. Neste período os trabalhos eram realizados de forma independente e descontínuos.

Na década de 70 a criação da Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) assumiu as funções do Departamento Nacional de Pesquisa e Experimentação Agropecuária (DNPEA), cujas unidades descentralizadas

absorveram as funções de institutos regionais. Neste período, as pesquisas de melhoramento nacional de feijão funcionavam da seguinte forma: o Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAF) ficava responsável pelos trabalhos de seleção de parentais, cruzamentos, avanços de geração e ensaios preliminares. Os ensaios preliminares também eram realizados na então Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – (IPA), na Empresa de Pesquisa Agropecuária do Ceará (EPACE) e na Unidade de Execução de Pesquisa de Teresina (UEPAE). Os ensaios avançados eram executados por todas as instituições componentes da rede de pesquisa. Em 1977 foi iniciado o convenio entre a Embrapa e o IITA, localizado em Ibadan, Nigéria, que vigorou até 1986. De 1991 até os dias atuais a coordenação do Programa Nacional de feijão-caupi passou para Embrapa Meio-Norte (FREIRE FILHO et al., 2011). No Norte e Nordeste do Brasil várias cultivares de feijão-caupi têm sido desenvolvidas (FREIRE FILHO, 1988). A cultivar Seridó (Ceará, Universidade Federal do Ceará - UFC) e a cultivar IPEAN-V-69 (Pará, Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuárias do Norte - IPEAN) foram as primeiras cultivares melhoradas de feijão-caupi produzidas nestas regiões. No entanto, a cultivar Seridó mostrou suscetibilidade a vírus e a Universidade do Ceará (UFC) passou a recomendar a cultivar “Pitiúba” (MEDINA, 1972).

Da década de 70 até a metade da década de 90, o IPA trabalhou ativamente no melhoramento de feijão-caupi independente da Embrapa. Foi nesse período que a instituição coordenou o lançamento das cultivares: IPA – 201 (1981), IPA – 202 (1981), IPA – 203 (1981), IPA – 204 (1987), IPA – 205 (1988) e IPA – 206 (1989) (FREIRE FILHO et al., 2011).

Com a ampliação das áreas de produção (principalmente com a incorporação de lavouras mecanizadas nas regiões Centro-Oeste e Sudeste), associada às novas exigências do mercado, novas demandas têm surgido junto aos programas de melhoramento do feijão-caupi. Dentre os principais desafios está a necessidade de ampliar a rede de melhoramento desta cultura para todas as regiões, de modo que os outros produtores possam ter cultivares disponíveis para o cultivo. Além disso, existe a necessidade de desenvolvimento de grãos de ampla aceitação comercial inter-regional e internacional. Neste sentido, as ferramentas moleculares apresentam-se como um grande potencial a ser incorporado nos programas de melhoramento convencional (FREIRE FILHO et al., 2011).

2.8.1 Objetivos do Programa de Melhoramento Genético do feijão no Brasil

De acordo com Públio Júnior et al. (2017), no Brasil, o potencial genético do feijão-caupi foi pouco explorado, refletindo, desta forma, numa baixa produtividade média (366 kg ha⁻¹), em função do baixo nível tecnológico empregado no cultivo (AGEITEC, 2019). Por exemplo, a produtividade média na região Centro-Oeste chega a aproximados 1.000 kg ha⁻¹, enquanto a na região Nordeste não ultrapassa os 276 kg ha⁻¹ (PÚBLIO JÚNIOR et al., 2017). No entanto, o uso de semente certificada no Norte e Nordeste do país corresponde a apenas 10 % da área plantada (FREIRE FILHO, ROCHA; SILVA, 2017), não refletindo o potencial produtivo do feijão-caupi.

Apesar do potencial para o aumento da produtividade desta cultura, a sua produção enfrenta vários problemas, tanto biótico (ataques por insetos, doenças e parasita) como estresse abiótico (calor e seca) (KAMARA et al., 2011). No entanto, o IITA fez progressos na criação de uma variedade de cultivares de feijão-caupi de alto rendimento, com resistência combinada às principais doenças, pragas de insetos e ervas daninhas parasitas e tolerância à seca (KAMARA et al. (2011).

O feijão-caupi tem a capacidade de crescer em solo de baixa fertilidade e possui adaptações a altas temperaturas e à seca (CARVALHO et al., 2017). Para o bom desenvolvimento desta cultura é necessário um mínimo de 300 mm de chuva e uma temperatura de 18 a 34°C (AGEITEC, 2019). Segundo Paiva et al. (2018), os estresses abióticos são um dos principais fatores limitantes de sua produção, sobretudo o déficit hídrico, o qual induz o fechamento estomático (SOUZA et al., 2017), causando redução da transpiração e fotossíntese e, na produção de matéria seca (SOUZA et al., 2019).

Os danos causados pela deficiência hídrica no feijão-caupi dependem do estado do desenvolvimento da cultura. A falta da água no período inicial do desenvolvimento pode reduzir o crescimento vegetativo, e no estágio final de desenvolvimento reduzir a produtividade em até 80 % (AGEITEC, 2019). Cabe ressaltar que a resposta do feijão-caupi às condições de déficit hídrico varia conforme a cultivar, o tempo de exposição e a região de estudo (NASCIMENTO et al., 2011).

Outro fator que contribui para a redução da sua produção são os ataques de insetos e doenças (KAMARA et al., 2011). Os ataques por insetos ocorrem de acordo com a fenologia da planta. As pragas desta cultura também podem ser classificadas de acordo com o local de ataque da planta, podendo ser agrupadas, em três grupos: pragas subterrâneas, pragas da parte aéreas e pragas dos grãos armazenados (EMBRAPA, 2019). O Caruncho-do-feijão-caupi é uma das principais pragas de armazenamento. Entre as principais doenças desta cultura são: Tombamento (*Damping off*), Podridão-das-raízes, Podridão-do-colo, Podridão-cinzenta-do-caule, Murcha-de-fusarium, Murcha/podridão-de-esclerócio, Carvão, Mancha-café, Mancha de cercóspora, Oídio ou cinza, Mosaico-severo-do-caupi, Mosaico-dourado-do-caupi, Mosaico do feijão-caupi transmitido por pulgão (EMBRAPA, 2019),

O programa de melhoramento genético brasileiro para feijão-caupi tem como seus principais objetivos de mediato: a criação de cultivares de porte semiprostado, adequada para agricultura familiar; criação de portes ereto e semiereto com arquitetura moderna, adequado para indústria empresarial; aumentar a produtividade, a adaptabilidade e a estabilidade da produção; aumentar a resistência a pragas e doenças; aumentar a resistência a altas temperaturas e estresses hídricos; aumentar o valor nutritivo; melhorar a qualidade visual e culinária dos grãos; desenvolver cultivares adaptadas a todas as regiões do País (FREIRE FILHO et al., 2011). Segundo Públio Júnior et al. (2017), característica arquitetura de planta, precocidade e qualidade de grãos têm grande importância nos programas de melhoramento, primeiro por conta da necessidade de plantas mais eretas, devido ao crescimento da mecanização; segundo por conta do aumento do cultivo em áreas irrigadas e, ainda, pela exigência do mercado consumidor, que prefere grãos com melhor aparência. Vagens menores e com menor número de grãos, (consequentemente mais leves) são também apreciadas pelo mercado mecanizado, e também reduz a possibilidade de apodrecimento por encostamento em solos irrigados (SILVA e NEVES, 2011). No entanto, para a colheita manual são apreciadas vagens maiores e com um número maior de grãos, aumentando o rendimento deste tipo de produção (PÚBLIO JÚNIOR et al., 2017)

A tendência do mercado é o desenvolvimento de cultivares com alto potencial de produção de grãos e boa arquitetura de plantas, adaptando culturas

mais densas, facilitando a colheita mecanizada, atendendo aos requisitos do cultivo tenrificado, e viabilizando grandes áreas no Centro-Oeste, Norte e Nordeste, que vêm aumentando a cada ano (COSTA et al., 2017).

O mercado do feijão-caupi ainda é restrito a grãos secos, grãos verdes (hidratados) e sementes. No entanto, são observadas algumas iniciativas para o processamento industrial de feijão-caupi para produção de farinha e produtos pré-cozidos e congelados (FREIRE FILHO et al., 2017). Outro objetivo do programa de melhoramento genético é o desenvolvimento de cultivares com características para miniprocessamento, como resfriamento e congelamento, e para processamento industrial, como produção de farinha, produtos pré-cozidos e enlatamento (FREIRE FILHO et al., 2011).

A médio prazo, os programas de melhoramento de feijão-caupi brasileiro objetivam o desenvolvimento de cultivares com grãos que atenda a características morfológicas dos mercados asiáticos, europeus e africanos (FREIRE FILHO et al., 2011). Em 2007, o Brasil começou a exportação desse grão, inicialmente para o Canadá, Portugal, Israel, Turquia e Índia, embora exista um mercado muito maior para este feijão. Entretanto, sabe-se quase nada sobre a preferência comercial deste mercado, principalmente em relação os países asiáticos (EMBRAPA, 2019).

O aumento da disponibilidade de nitrogênio do solo está relacionado com aumento da produtividade. Este aumento de produtividade pode ser alcançado mediante o uso de sementes de feijão-caupi com capacidade de realizar simbiose com bactérias fixadoras e pelo o uso de inoculação de rizóbios eficientes, suprimindo as necessidades de nitrogênio da planta (GUIMARÃES et al. 2019). Estima-se que o feijão-caupi pode obter ganhos de produtividade na ordem de 30 % quando em associação com o rizóbio, baixando os custos de produção e elevando a renda do produtor (MARTINS et al., 2003). Segundo Freire Filho et al. (2011), aumentar o potencial simbiótico com bactérias fixadoras de nitrogênio também é uma das metas do programa de melhoramento.

ARTIGO 1

Artigo a ser submetido à Brazilian Journal of Agricultural Research (PAB)

Utilização de marcadores moleculares do tipo ISSR e DAF na caracterização da diversidade genética do feijão-caupi

Karla Pereira da Silva ⁽¹⁾; Antônio Felix da Costa ⁽¹⁾, Amaro de Castro Lira Neto ⁽¹⁾, Ana Maria Benko-Iseppon ⁽²⁾ and Valesca Pandolfi ⁽²⁾ *

¹ Instituto Agronômico de Pernambuco, Recife-PE 50761000, Brasil

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Genética, Recife-PE 50732970, Brasil *E-mail: valescapandolfi@gmail.com

Resumo - O conhecimento da diversidade genética é fundamental para exploração e manutenção do germoplasma e para a criação de novas cultivares. O presente estudo buscou avaliar a diversidade genética de 80 acessos de feijão-caupi do banco ativo de germoplasma do Instituto Agronômico de Pernambuco, por meio de marcadores moleculares DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). O conjunto de 12 *primers* (mais informativos) gerou um total de 132 loci (média de 11 por *primer*), com aproximadamente 80 % de polimorfismo. Os 80 acessos foram agrupados (método *Weighted Neighbor-Joining*) em três grupos. O grupo I (44 acessos), representado pelos acessos Casa Amarela, Cavaleiro, Arcoverde, além dos acessos Canapu e Canapuzinho. O grupo II (34 acessos), representado pelos acessos Manteiga, Cabeçudo, Coruja, Paulistinha, além dos acessos de Juazeiro, Tucurui, Taipu e Sempre Verde. O Grupo III foi representado pelos acessos BR-14 Mulato e BR-17 Gurguéia. Os acessos Cavaleiro 8 e 10 foram os mais similares, sendo Encruzilhada 1 e IT82D-106G os acessos mais dissimilares. Os índices de

informatividade utilizados (PIC, MI e RP) e a diversidade genética global revelaram correlação positiva, considerados eficientes na avaliação dos iniciadores. Com relação aos acessos de feijão-caupi, observou-se a formação de três grupos (I, II e III). Ainda que seja observada uma variedade de caracteres entre os acessos dos agrupamentos II e III, verifica-se semelhanças entre eles. Os marcadores DAF e ISSR foram eficientes na detecção da diversidade genética dos acessos do banco de germoplasma de feijão-caupi, sendo promissores para uso em trabalhos de melhoramento da cultura.

Index terms: Feijão-caupi, melhoramento, PIC, MI, RP.

Introdução

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) apresenta grande relevância socioeconômica pois, além de gerar emprego e renda, supre a necessidade nutricional da população mais pobre, especialmente no semiárido do Brasil (Marinho et al., 2017). Possivelmente pela sua produção concentrada em áreas de constantes períodos de baixa pluviosidade, a produtividade associada à adaptabilidade e à estabilidade de rendimento tem recebido muita atenção por parte dos melhoristas. Entretanto, a busca por cultivares com característica de interesse comercial tende a redução da diversidade genética, gerando baixa adaptabilidade ou até mesmo a extinção das espécies. Neste sentido, a construção de Bancos Ativos de Germoplasma-BAG representa uma importante fonte de diversidade genética (Carlini-Garcia, Pinto e Landell, 2013) a ser disponibilizada nos programas de melhoramento genético, para o desenvolvimento e/ou melhoria de cultivares (Bertini; Teófilo e Dias, 2009).

Estudos da diversidade genética também são importantes na elaboração de estratégias de conservação de recursos genéticos (Silva et al., 2018). Diversas técnicas moleculares permitem a detecção do polimorfismo de DNA, podendo gerar um número ilimitado de marcas moleculares ao longo de todo o genoma de um organismo (Ferreira e Grattapaglia,

1998). Marcadores moleculares auxiliam na identificação e na análise de cultivares, na pureza de sementes; fornecem suporte técnico para avaliação, preservação e inovação de recursos do germoplasma vegetal; na previsão de heterose; na construção de mapa genético, clonagem e reprodução assistida por marcadores (Fang et al. 2016). Marcadores baseados na amplificação do DNA estão entre os métodos mais adequados na caracterização molecular, uma vez que o DNA não sofre influência ambiental em curto períodos, proporcionado, assim, maior confiabilidade dos resultados. Análises da impressão genômica do DNA (conhecido por *DNA fingerprinting*) apresentam uma série de informações relevantes ao nível de diferenciação de cultivares (Tanya et al., 2010). Nesse contexto, marcadores DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) estão entre os mais utilizados nas análises de *fingerprinting* de DNA e caracterização molecular (Nybom, 2004). Devido à reprodutibilidade dos padrões de bandas (polimorfismo) e simplicidade da técnica, marcadores do tipo ISSR destaca-se entre os mais aplicados em estudos de diversidade genética, *fingerprinting* e seleção assistida (Costa, 2010).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a variabilidade genética entre acessos de feijão-caupi provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), por meio de marcadores moleculares ISSR e DAF, com vistas à seleção de candidatos a serem incorporados ao programa de melhoramento dessa cultura.

Material e Métodos

Material vegetal e extração do DNA

Sementes de 80 acessos de feijão-caupi (Tabela 1) foram fornecidas pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Recife, PE. As plantas foram mantidas em telado, por aproximadamente 30 dias.

O DNA total foi isolado de folhas frescas, segundo metodologia descrita por Doyle & Doyle (1990), com pequenas modificações. Foram utilizadas dez folhas jovens de indivíduos diferentes, para cada acesso, constituindo um *bulk*. As amostras de DNA foram purificadas de acordo com o protocolo para precipitação de polissacarídeos, descrito por Michaels et al. (1994), com posterior tratamento com RNase (10 mg/mL) por 2 h a 37°C.

A quantificação das amostras de DNA foi realizada pelo método comparativo, em gel de agarose a 0,8 %, utilizando-se diferentes concentrações do DNA Fago-λ como referência. Após a quantificação, uma alíquota do DNA de cada amostra foi preparada a uma concentração de 5 ng/ µL, para uso nas reações de amplificações por PCR.

Reações de amplificação dos marcadores ISSR e DAF

Inicialmente, uma reação de amplificação foi realizada com 29 *primers* (24 ISSR e cinco DAF) em 10 acessos de feijão-caupi (Arcoverde 1, Arcoverde 2, Arcoverde 4, Arcoverde 5, Arcoverde 6, Arcoverde 7, Arcoverde 8, Canapu Verdadeiro, Canapu PE, Canapuzinho). Destes, os 12 *primers* mais informativos (nove primers ISSR e três DAF) foram utilizados para as amplificações nas amostras de DNA dos 80 acessos de feijão-caupi (Tabela 2).

As reações ISSR foram conduzidas conforme protocolo descrito por Bornet e Branchard (2001). As reações foram preparadas em um volume final de 10 µL, contendo 1,5 U de Taq polimerase (invitrogen), tampão da enzima (1X), 5 mM de MgCl₂; 1 mM de dNTPs, 50 mM de *primer* e 5 ng de DNA. A programação da PCR foi programada para uma desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida por 35 ciclos de: 94°C por 30 s (desnaturação), 50 - 54°C por 45 s (anelamento, conforme o *primer* utilizado), 72°C por 2 min (extensão), acrescido de uma extensão final de 72°C por 7 min.

As reações de DAF foram conduzidas seguindo-se a metodologia de Simon et al. (2007), sendo preparadas com 1 ng de DNA, tampão buffer 1X, 2,5 mM de MgCl₂, 2,5 mM de dNTP, 50 pmol de primer e 0,7 U de Taq polymerase (Invitrogen), num volume final de 15 µL. A ciclagem da PCR foi estabelecida para uma desnaturação inicial de 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos de: 95°C por 15 s (desnaturação), 35°C por 2 min (anelamento) e 72°C por 2 min (extensão), com uma extensão final de 72°C por 2 min.

Todas as amplificações de PCR (ISSR e DAF) foram realizadas no termociclador (*Applied Biosystems*). Os produtos das reações foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2,0 %, corados com SYBER Green (1,2 µL/ amostra) e visualizados sob luz ultravioleta e fotografados com fotodocumentador L-Pix (Loccus Biotecnologia).

Análise dos dados

O tamanho dos fragmentos amplificados de DNA foi estimado pela comparação com o marcador molecular *Ladder* 1kb (Invitrogen). A partir dos resultados de ISSR e DAF foram realizadas comparações entre as amostras, com base no critério visual de ausência (0) ou presença (1) dos fragmentos (bandas) gerando uma matriz de dados.

A capacidade informativa dos *primers* ISSR foi medida utilizando-se três parâmetros polimórficos: i) PIC - *Polymorphic Information Content* (conteúdo da informação de polimorfismo), calculado conforme Gravitol et al. (2010); ii) MI - *Marker Index* (índice do marcador), segundo Varshney et al. (2007) e iii) RP - *Resolving Power* (poder de resolução), de acordo com Prevost and Wilkinson (1999).

A análise de dissimilaridade entre os indivíduos e populações (distância genética) foi estimada de acordo com o coeficiente de Jaccard (Perrier et al., 2003) por meio do programa DARwin 6.0.20 (Perrier and Jacquemoud-Collet, 2010). A matriz gerada foi utilizada pelo

programa para a construção de um fenograma, empregando-se o método *Weighted Neighbor-Joining* (*bootstrap* de 30.000 replicações).

Resultados e Discussão

Indivíduos de uma dada espécie não são geneticamente idênticos, uma vez que suas sequências de DNA apresentam diferenças, caracterizando a diversidade genética (polimorfismo) de um indivíduo ou população. Essa diversidade genética pode ser mensurada por meio de diferentes tipos de marcadores moleculares, os quais são escolhidos com base na quantidade de polimorfismo que pode ser detectado de forma confiável (Roldan-Ruiz et al., 2000; Graviton et al., 2010).

No presente trabalho foi avaliada a eficiência de marcadores ISSR e DAF na detecção da diversidade genética de 80 acessos do Banco de Germoplasma de feijão-caupi do IPA. O sistema representado pelos 12 *primers* mais informativos (nove ISSR e três DAF) gerou um total de 5.155 fragmentos, com uma média de 64,44 fragmentos por acesso (Tabela 2).

O número total de *loci* (NTL) foi de 132 (média de 11 por *primer*), valor este, superior ao obtido com marcador ISSR realizados por Araújo et al. (2019) (80 NTL, média de 5,71 por *primer*), Dias et al. (2015) (62 NTL, média de 7,75 por *primer*) e Anatala et al. (2014) (103 NTL, média de 5,72 por *primer*) com ISSR. No entanto, os *primers* utilizados nesses trabalhos foram selecionados através do estudo de seleção de *primers* (Tabela 2)

Apesar das plantas cultivadas geralmente apresentarem baixa diversidade, tanto os *primers* de ISSR quanto os *primers* de DAF utilizados neste estudo revelaram altos valores de diversidade genética. A diversidade genética global (Dg) obtida foi de 78,03 % (Tabela 2), sendo também superior ao observado por Spiaggia; Carvalho & Benko-iseppon (2009) (72,34 %), Anatala et al. (2014) (49,63 %), Dias et al. (2015) (74,85 %), Igwe et al. (2017) (69,90 %)

e Araújo et al. (2019) (75,94%), também em feijão-caupi. Quando comparado o desempenho dos primers DAF e ISSR, separadamente, observam-se resultados semelhantes de Dg.

No presente estudo foram obtidos altos valores de RP (Poder de Resolução), com destaque para o *primer* OP-G06 (DAF) (RP=16,00) e o *primer* SSR-841 (ISSR) (8,00) (Tabela 2). O RP indica o potencial discriminatório dos *primers* escolhidos e apresenta maior capacidade informativa, sendo, portanto, o indicado na avaliação da eficiência de marcadores (Tatikonda et al., 2009). No entanto, este parâmetro sofre influência direta do número de indivíduos, reduzindo sua importância na etapa de seleção de *primers*.

O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC, *Polymorphism Information Content*) e Índice do Marcador (MI, *Marker Index*) são reconhecidamente mais eficientes na etapa de seleção de *primers*, por apresentarem relação direta com a diversidade genética (Dg) (Prevost & Wilkinson, 1999). Entretanto esse fato não diminui a sua importância na análise do poder discriminatório dos marcadores. Segundo Graviton et al. (2010), o uso do PIC na avaliação no potencial informativo de marcadores ISSR tem sido cada vez mais frequente.

O intervalo de valores de PIC dos *primers* ISSR variou de 0.1292 (ISSR-827) a 0.3476 (ISSR-826), com uma média de 0.2626 (Tabela 2). Os *primers* SSR-826, SSR-817, SSR-885 e SSR-841 revelaram os maiores valores de PIC com 0,3476; 0,3241; 0,3188 e 0,3181, respectivamente. Esses valores de PIC foram menores que os previamente relatados por Anatalla et al. (2014); Dias et al. (2015) e Igwe et al. (2017) e semelhantes aos observados por Muthusamy et al. (2008), Tantasawat et al. (2010) e Araújo et al. (2019), os quais também utilizaram marcadores de ISSR em feijão-caupi. Valores de PIC baixos estão associados às relações entre os acessos, como observado por Tantasawat et al. (2010), em *Vigna radiata* (L.) e *Vigna mungo* (L.), refletindo também uma base genética estreita.

A correlação dos valores de PIC dos *primers* DAF foi de 0,2738 (OP- J20), 0,3684 (OP-B07) e 0,4447 (OP-G06), com uma média de 0,3623 (Tabela 2), ou seja, superior ao

observado com os marcadores ISSR. Também utilizando marcadores DAF, Onofre (2012) obteve valores de PIC no gênero *Vigna* variando de 0,00 a 0,295, com uma média de 0,121, sendo inferior ao encontrado no presente estudo. Os valores de MI dos *primers* de ISSR oscilaram de 0,4374 (ISSR-827) a 3,2924 (ISSR - 817 e ISSR - 885), e para os de DAF variaram de 0,6880 (OP- J20) a 5,6477 (OP - G06) (Tabela 2), sendo menores do que os encontrados por Graviton et al. (2010) para *Jatropha curcas* L., quando utilizados marcadores ISSR. De forma geral, os valores de RP encontrados nesse trabalho também foram inferiores aos encontrados por Graviton et al. (2010), com exceção ao primer OP - G06 (DAF), cujo valor coincidiu com os valores de *J. curcas*.

Na Tabela 3 encontram-se os valores apresentados pelo teste de correlação de Pearson (ρ) dos *primers* avaliados, ordenados de forma decrescente tomando por base a Dg. Esse teste é utilizado para medir as relações lineares entre as variáveis, cujos valores variam de -1 a 1 (Figueiredo Filho & Silva Júnior, 2009).

Para Dancey & Reidy (2005) valores entre 0,10 e 0,30 são considerados baixos, entre 0,40 e 0,6 valores moderados e de 0,70 a 1, valores altos. Por sua vez, o teste de correlação de Pearson (ρ) apresentou forte correlação entre os valores de Dg e PIC, de Dg e MI, de PIC e MI, e MI e RP. Os valores de RP tiveram uma correlação média com os valores de DG e PIC. De certa forma, correlação alta entre PIC e MI é esperada, levando-se em conta a utilização dos valores de PIC para o cálculo do MI.

A correlação positiva entre PIC e MI com RP foi também observada em estudos de diversidade genética com outras espécies, a exemplo de mamona e pinhão manso, como relatado por Vasconcelos (2011) e Tatikonda et al., (2009), respectivamente. Vale ressaltar que a ausência de correlação entre os três índices supracitados também já foi registrada na literatura (Prevost & Wilkinson, 1999; Fernández et al., 2002; Laurentin & Karlovsky, 2007; Graviton et al., 2010).

O dendrograma gerado pela análise de dissimilaridade entre os 80 acessos, de feijão-caupi resultou na formação de três grupos: grupo I, com 44 acessos, grupo II, com 34 acessos e grupo III, com apenas 2 acessos (Figura 1). Destes, o grupo III compreendeu apenas quatro acessos, com alta similaridade entre si. Todos apresentam folhas com intensidade de cor verde escura, botão floral de coloração esverdeada, cor primária do cálice verde, e coloração roxa para o estandarte primário e a cor primária da asa. Os tamanhos das folhas também são similares, no entanto, o porte dessas cultivares variou de prostrado a semiereto. O grupo I foi o maior, representado pelo agrupamento de todos os acessos com porte semiprostrado ou prostrado e sementes, flores e folhas com característica bem variadas. Por sua vez, o grupo II foi representado por 33 acessos. Embora esse grupo seja o mais diversificado, nele está presente a maioria das cultivares que se destacaram em Belém de São Francisco, Itapirema e Caruaru, em ensaios de competição de cultivares.

A associação de acessos com tolerância à salinidade (Pitiúba e Epace 10) no mesmo cluster foi apoiada pelos escores de *bootstrap* (64 %), semelhante ao observado por Onofre (2012). No entanto, o acesso sensível à salinidade (IPA 206) também faz parte desse cluster. Esses resultados podem ser suportados pelo fato de a tolerância tende a ser relativa, visto que a expressão genética pode variar de acordo com a situação, ou seja, uma planta pode manifestar tolerância a determinada espécie de inseto, em certas condições, ao mesmo tempo que pode manter ou não esse caráter quando sob outras condições (Lara, 1991)

Considerando os acessos sensíveis à salinidade, foram formados dois grupos, o primeiro contendo três acessos (IPA 204, IPA 205 e IPA 206) e o segundo com dois acessos. Outros estudos relatam que as variações genéticas identificadas pelos marcadores de microssatélites são úteis na avaliação de acessos de terras altas para morfologia relacionada à tolerância à seca (Zeng et al. 2004; Manavalan et al. 2009; Vanniarajan et al. 2012).

Ainda que seja observada uma variedade de caracteres entre os acessos dos agrupamentos II e III, é evidente a semelhança entre eles. De maneira geral, também se observa altos níveis de polimorfismo e valores de escore de *bootstrap* médios (41 %) a altos (100 %) para os clusters formados. Dessa forma, os marcadores DAF e ISSR mostraram-se significativamente informativos para analisar a diversidade genética dos acessos, o que os caracteriza como potencialmente úteis para a geração de populações segregantes adequadas ao mapeamento, sendo também promissores para uso em trabalhos de melhoramento da cultura.

Conclusões

1) Cavaleiro 8 e Cavaleiro 10 são os acessos de maior similaridade, ao passo que os acessos Encruzilhada 1 e IT82D-106G são os mais dissimilares; 2) Os índices de informatividade utilizados (PIC, MI e RP) e a diversidade genética global apresentaram correlação positiva, sendo eficientes na avaliação dos iniciadores na população estudada; 3) os marcadores utilizados neste estudo mostraram-se eficientes para a detecção da diversidade genética dos acessos de feijão-caupi, o que os caracteriza como marcas potencialmente úteis na geração de populações segregantes adequadas ao mapeamento, sendo também promissores para uso em trabalhos de melhoramento da cultura, 4) o marcador Op-G06 apresenta-se como um excelente candidato na caracterização e de acessos de feijão-caupi, visando o enriquecimento do mapeamento genético desta cultura.

Referências

- AMORIM, L. L. B. **Análise Estrutural e Funcional do Genoma do feijão-caupi: mapa genético e elemento transponíveis**. 2013. 72 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
- ANATALA, T.J. et al. (2014) Molecular Diversity Analysis of Cowpea (*Vigna unguiculata*L.) Genotypes Determined by ISSR and RAPD Markers. **International Journal Of Agriculture, Environment And Biotechnology**, v.7, n.2, p.269-276. <http://dx.doi.org/10.5958/2230-732x.2014.00244.7>.
- ARAUJO, L.B.R. et al. (2019) Research Article Genetic diversity in cowpea landraces analyzed by ISSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v.18, n.1, p.1-9. <http://dx.doi.org/10.4238/gmr18082>.
- BERTINI, C.H.C.M.; TEÓFILO, E.M.; DIAS, F.T.C. (2009) Divergência genética entre acessos de feijão-caupi do banco de germoplasma da UFC1. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 1, p.99-105
- BORNET B.; BRANCHARD, M. (2001) Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat ISSR yMarkers; reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular: Biology Reporter** v.19, p. 209-215.
- CARLINI-GARCI, L. A.; PINTO, L. R.; LANDELL, M. G. (2013) A Importância da manutenção de variabilidade genética para os produtores rurais. **Pesquisa & Tecnologia**, v.10, n.2.
- COSTA, S.R. de A.G. da **Técnicas de estudo micromorfológico e molecular aplicadas ao gênero Hypericum**. 2010. 76 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Proteção de Plantas, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.
- DANCEY, C. & REIDY, J. Estatística Sem Matemática para Psicologia: Usando SPSS para Windows. Porto Alegre, **Artmed**. 2006
- DIAS, F. T. C. et al. (2015) Variabilidade genética de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce analisada por marcadores RAPD e ISSR. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 46, n. 3, p.563-572.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.1315.
- FANG, J. et al. (2026) Applications of DNA Technologies in Agriculture. **Current Genomics**, v.17, n.4, p.379-386. <http://dx.doi.org/10.2174/1389202917666160331203224>.
- FERNÁNDEZ M. E., FIGUEIRAS A. M.; BENITO C. (2002) The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. **Theoretical and Applied Genetics** v.104, p. 845-851.

- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília: Embrapa/Cenargen, 1998. 220p
- FIGUEIREDO-FILHO, D.B.; SILVA-JÚNIOR, J.A. (2009) Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**, v.18, n.1, p.115-146.
- GRATIVOL, C. et al (2010) Efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. **Molecular Biology Rep**, vol.10, p. 547-557.
- IGWE, D. O. et al. (2017) Assessment of genetic diversity in *Vigna unguiculata* L. (Walp) accessions using inter-simple sequence. **BMC Genetics**, v. 18, n. 1, p.1-13. <http://dx.doi.org/10.1186/s12863-017-0567-6>.
- LAURENTIN, H; KARLOVSKY, P. (2007) AFLP fingerprinting of sesame (*Sesamum indicum* L.) cultivars: identification, genetic relationship and comparison of AFLP informativeness parameters. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, p.1437-1446.
- MANAVALAN, L. P. et al. (2009) Physiological and Molecular Approaches to Improve Drought Resistance in Soybean. **Plant And Cell Physiology**, v. 50, n.7, p.1260-1276. <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcp08>
- MARINHO, R.C.N. et al. (2017) Symbiotic and agronomic efficiency of new cowpea rhizobia from Brazilian Semi-Arid. *Bragantia*, v.76, n.2, p. 273-281. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.003>
- MICHAELS S. D., JOHN M. C.; AMASINO R.M. (1994) Removal of polysaccharies from plant DNA by ethanol precipitation. **Biotechniques**, v.17, p.274-276.
- MUTHUSAMY, S.; KANAGARAJAN, S.; PONNUSAMY, S. (2008) 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,. <http://dx.doi.org/10.2225/vol11-issue3-fulltext-8>.
- NYBOM, H. (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, v.13, n.5, p.1143-1155,. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294x.2004.02141.x>.
- ONOFRE, A. V. C. **Desenvolvimento de marcadores de DNA para mapeamento genético e caracterização da diversidade em feijão-caupi**. 2012. 144 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012
- PERRIER, X.; JACQUEMOUD-COLLET, J. P. (2010) DARwin Software. Disponível em & lt; <http://darwin.cirad.fr/darwin>>
- PERRIER.; FLORI, A.; BONNOT, F. Data analysis methods. In: Hamon P, Seguin M, Perrier X and Glaszmann JC (eds) Genetic diversity of cultivated tropical plants. **Enfield, Science Publishers**, Montpellier, 2003, p. 43-76.

- PREVOST, A.; M.J, WILKINSON. (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. **Theor Appl Genet** v. 98, p. 107–112.
- SILVA, T. S. S. et al. (2018) Caracterização e seleção de marcadores moleculares em *Croton linearifolius* Mull. Arg. como subsídio para estudos genéticos. **Multi-science Journal.**, p. 4-8.
- SIMON MV, BENKO-ISEPPON AM, RESENDE LV, WINTER P, KAHL G. (2007) Genetic diversity and phylogenetic relationships in *Vigna Savi* germplasm revealed by DNA amplification fingerprinting (DAF). **Genome.** v. 50, p. 538-547.
- SPIAGGIA, F.; CARVALHO, R.; BENKO-ISEPPON, A. M. (2009) Preliminary molecular characterization of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Accessions by DAF (DNA Amplification Fingerprinting). **Gene Conserve**, v.8, n.34, p.818-828.
- TANTASAWAT P. et al. (2010) Variety identification and genetic relationships of mungbean and blackgram in Thailand based on morphological characters and ISSR analysis. **Afr J Biotechnol**, n.9, v.27, p. 4452 – 4464.
- TANYA, P. et al. (2010) Genetic diversity among *Jatropha* and *Jatropha*-related species based on ISSR markers. **Plant Molecular Biology Reporter**, p. 1-13.
- TATIKONDA L. et al. (2009) AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L., a biofuel plant. **Plant Science**, v.176, p. 505–513.
- VANNIARAJAN, C.; VINOD, K. K.; PEREIRA, A. (2012) Molecular evaluation of genetic diversity and association studies in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Genetics**, v. 91, n. 1, p. 9-19. <http://dx.doi.org/10.1007/s12041-012-0146-6>.
- VARSHNEY, R. K. et al. (2007) Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. **Plant Science. Hyderabad**, p. 638-649, 2007.
- VASCONCELOS, S. Análise da diversidade genética entre genótipos de Mamona (*Ricinus communis* – Euphorbiaceae) através de Fingerprinting de DNA com marcadores AFLP e ISSR. 61f. Dissertação de Mestrado, PPGG/UFPE, Recife-PE, 2011.
- WEISING, K. et al. DNA fingerprinting in plants: Principles, Methods, and Applications. (Ed), CRC Press, **Boca Raton**, p. 444, 2005.
- ZENG, L. et al. (2004) Genetic diversity analyzed by microsatellite markers among rice (*Oryza sativa* L.) genotypes with different adaptations to saline soils. **Plant Science**, v. 166, n. 5, p.1275-1285. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.01.005>.

Tabela 1 - Acessos de feijão-caupi do BAG do Instituto Agronômico de Pernambuco – IPA utilizados na caracterização genética por meio de marcadores ISSR e DAF.

Nº do acesso	Identificação	No. do acesso	Identificação
1	BR 9 – Longá	41	Rabo de Tatu
2	IT 81 D - 104 5	42	Canapu Mossoró
3	IT 81 D - 105 3	43	Canapu BSF
4	IT 82 D - 106 9	44	Canapu Verdadeiro
5	IPA 206	45	Canapuzinho
6	Macaíbo	46	BR 14 Mulato
7	Rasga Letra	47	BR 17 Gurgueia
8	BR10 – Piauí	48	Sempre Verde Baiano
9	Pitiúba	49	Sempre Verde Ibimirim
10	EPACE 10	50	Sempre Verde Salgueiro
11	Sopinha	51	Sempre Verde Petrolina
12	Maravilha	52	Sempre Verde L. E.M.
13	Cavaleiro 3	53	Salgueiro
14	Cavaleiro 4	54	Paulistinha
15	Cavaleiro 5	55	Coruja
16	Cavaleiro 7	56	Cabeçudo
17	Cavaleiro 8	57	Manteiga
18	Cavaleiro 9	58	Taipu 1
19	Cavaleiro 10	59	Taipu 2
20	Cavaleiro 11	60	Taipu 3
21	Cavaleiro 13	61	Taipu 4
22	Cavaleiro 18	62	Juazeiro 1
23	Cavaleiro 21	63	Juazeiro 3
24	Cavaleiro 1	64	Juazeiro 4
25	Cavaleiro 2	65	Juazeiro 6
26	Casa Amarela 2	66	Juazeiro 10
27	Casa Amarela 3	67	Juazeiro 11
28	Casa Amarela 5	68	Juazeiro 2
29	Casa Amarela 6	69	Juazeiro 7
30	Casa Amarela 7	70	Juazeiro 8
31	Arcoverde 1	71	Juazeiro 1
32	Arcoverde 2	72	Tucurui 4
33	Arcoverde 4	73	Tucurui 1
34	Arcoverde 5	74	Tucurui 2
35	Arcoverde 6	75	Tucurui 3
36	Arcoverde 7	76	Encruzilhada 1
37	Arcoverde 8	77	Encruzilhada 2
38	Costela de Vaca	78	Encruzilhada 3
39	Canapu Pe	79	Encruzilhada 4
40	Canapu PF	80	Ibimirim Moxotó

Tabela 2 - Características dos marcadores ISSR e DAF selecionados no estudo da diversidade genética de 80 acessos do BAG de feijão-caupi do IPA, Recife, PE.

Tipo primer	Sequência do primer (5' - 3')	Ta (°C)	NTL	NLM	NLP	Dg (%)	PIC	MI	RP
ISSR-886	5' BDB CAC ACA CAC ACA CA	52.0	13	5	8	61,54	0,2560	0,9163	4,2000
ISSR-827	-	52.8	10	7	3	30	0,1292	0,4374	1,7306
ISSR-887	5' DVD TCT CTC TCT CTC TC	52.0	10	1	9	90	0,2881	2,9267	3,9636
ISSR-826	5' ACA CAC ACA CAC ACA CC	52.0	9	2	7	77,78	0,3476	3,0510	4,7907
ISSR-817	-	50.4	10	1	9	90	0,3241	3,2924	3,5556
ISSR-885	5' BHB GAG AGA GAG AGA GA	52.0	9	0	9	100	0,3188	3,2924	0,4824
ISSR-841	5' GAG AGA GAG AGA GAG AYC	52.8	17	2	15	88,24	0,3181	3,1681	8,0000
ISSR-889	-	52.0	12	5	7	58,33	0,2250	1,4811	4,1207
ISSR-851	-	54.0	6	3	3	50	0,1569	0,8851	1,4915
DAF- OP - G06	5' GTG CCT AAC C	35.0	23	1	22	95,83	0,4447	5,6477	16,000
DAF- OP - B07	5' GGT GAC GCA G	35.0	8	1	7	88,89	0,3684	2,6790	4,2750
DAF-OP- J20	-	35.0	5	1	4	83,33	0,2738	0,6880	2,7100
Total		*	132	29	103	78.03	*	*	*

NTL: Número total de *loci* amplificados; NLM: Número de *loci* monomórficos; NLP: Número de *loci* polimórficos; Dg: Diversidade genética global; PIC: *Polymorphism Information Content* (Conteúdo de Informação Polimórfica); MI: *Marker Index* (Índice do Marcador); RP: *Resolution Power* (Poder de Resolução).

Tabela 3 - Valores de correlação de Pearson (ρ) entre os índices utilizados.

	DG	PIC	MI	RP
DG	1,000			
PIC	0,870	1,000		
MI	0,764	0,874	1,000	
RP	0,370	0,671	0,722	1,000

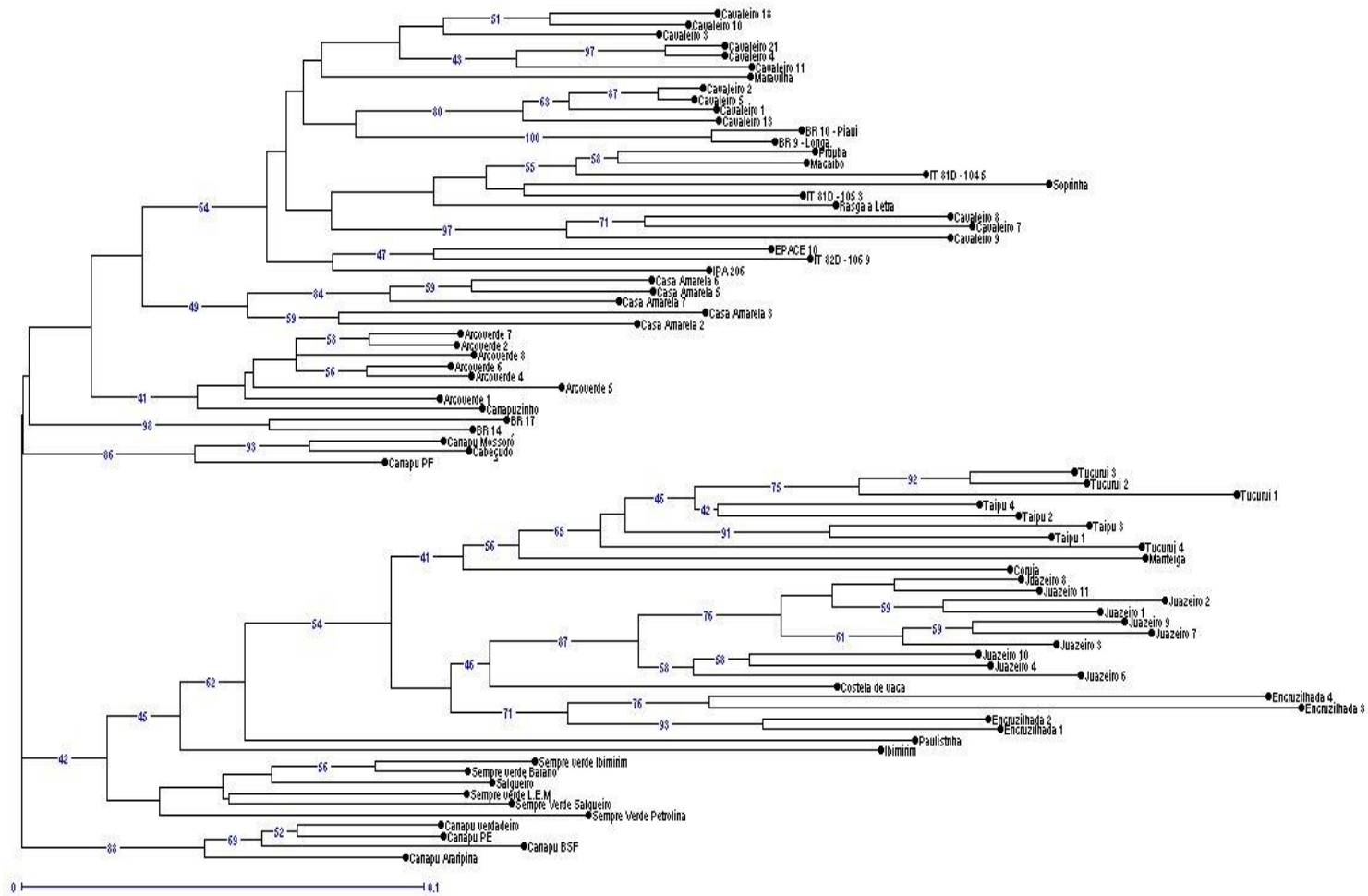


Figura 1 - Dendrograma gerado pela análise de dissimilaridade entre os 80 acessos de feijão-caupi, estimada pelo coeficiente de Jaccard, por meio do programa DARwin 6.0.20 empregando-se o método *Weighted Neighbor-Joining* (bootstrap 30.000 replicações)

4 CONCLUSÕES

Cavaleiro 8 e Cavaleiro 10 são os acessos de maior similaridade, ao passo que Encruzilhada 1 e IT82D-106G são os acessos mais dissimilares;

Os índices de informatividade utilizados (PIC, MI e RP) e a diversidade genética global demonstram correlação positiva, sendo eficientes na avaliação dos iniciadores na população estudada;

De forma geral, os marcadores utilizados neste estudo mostraram-se eficientes para a detecção da diversidade genética dos acessos de feijão-caupi, o que os caracteriza como marcas potencialmente úteis na geração de populações segregantes adequadas ao mapeamento, sendo também promissores para uso em trabalhos de melhoramento da cultura.

Tendo em vista o melhor resultado para a maioria dos parâmetros analisados, o marcador Op-G06 destacou-se como um excelente candidato na caracterização e seleção de acessos de feijão-caupi, para enriquecimento do mapeamento genético desta cultura.

REFERÊNCIAS

- AGEITEC – Agência Embrapa de Informação Tecnológica. **ÁRVORE DO CONHECIMENTO Feijão-Caupi**: Estatísticas da produção. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/feijaocaupi/arvore/CONTAG01_16_510200683536.html>. Acesso em: 02 fev. 2019.
- AJIBADE, S.R.; WEEDEN, N.F.; CHITE, S.M. (2000) Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. **Euphytica**, v.111, p.47-55.
- AMORIM, L.L.B. **Análise Estrutural e Funcional do Genoma do feijão-caupi: mapa genético e elemento transponíveis**. 2013. 72 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
- AVISE J.C. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York, Chapman and Hall. 684 p. 2004.
- BARRACLOUGH, G. (Ed.). *Atlas da história do mundo da Folha de São Paulo/Times*. 4. ed. rev. São Paulo: Folha da Manhã, p. 154-157, 1995.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. (2014) Cryostorage of Germplasm of Tropical Recalcitrant-Seeded Species: Approaches and Problems. **International Journal of Plant Sciences**, v.175, n.1, p.29-39.
- BERTINI, C.H.C.M.; TEÓFILO, E.A.; DIAS, F.T.C. (2009) Divergência genética entre acessos de feijão-caupi do banco de germoplasma da UFC1. **Revista Ciência Agrônômica**, v.40, n.1, p.99-105.
- BONFIM-SILVA, E. M. et al. (2018) Initial Development of Cowpea Bean Fertilized with Natural Phosphate in the Brazilian Cerrado Soil. **American Journal of Plant Sciences**, v.09, n.07, p.1381-1390.
- BORÉM, A. *Melhoramento de plantas*. Viçosa: UFV, 1997. 547p.
- BOUKAR, O. et al. (2018) Cowpea (*Vigna unguiculata*): Genetics, genomics and breeding. **Plant Breeding**, v.138, n.4, p.415-424
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 12 de 28 mar. 2008. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 31 mar. 2008. Seção 1, p. 11-14.
- CARVALHO, R.O.; LIMA, A.C.S.; ALVES, J.M.A. (2011) Resistência de genótipos de feijão-caupi ao *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera: Bruchidae). **Revista Agroambiente**, v.5, n.1, p.50-56.
- CASTAÑEDA-ÁLVAREZ, N.P. et al. (2016) Global conservation priorities for crop wild relatives. **Nature Plants**, v.2, n.4, p.1-6, 21.

- CHEN, H. et al. (2017) De novo transcriptomic analysis of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) for genic SSR marker development. **BMC Genetics**, v.18, n.65, p.1-12.
- CHIDEBE, I.N., JAISWAL, S.K.; DAKORA, F.D. (2018). Distribution and phylogeny of microsymbionts associated with cowpea (*Vigna unguiculata*) nodulation in three agroecological regions of Mozambique. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, p.1–25
- COLLADO, E. et al. (2018) Quality Changes in Nutritional Traits of Fresh-Cut and Then Microwaved Cowpea Seeds and Pods. **Food and Bioprocess Technology**, v.12, n. 2, p.338-346.
- CONAB (2018) - Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 5, safra 2017/18, n. 5. Quinto levantamento, Brasília, p. 69-89. Companhia Nacional de Abastecimento.
- CONAB (2019) - Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 6, safra 2018/19, n. 5. Quinto levantamento, Brasília, p. 1-125. Companhia Nacional de Abastecimento.
- CORREA, A.M. et al. (2012) Estimativas de parâmetros genéticos e correlações entre caracteres fenológicos e morfoagronômicos em feijão-caupi. **Revista Ceres**, v.59, n.1, p.88-94.
- COSTA, A.F. da, et al (2017): Selectivity of pre-and post-emergent herbicides for cowpea (*Vigna unguiculata*). **African Journal of Agricultural Research**, v.12, n.11, p.881-887.
- COSTA, A.F. (2013) MIRANDA IPA 207, Nova Cultivar de Feijão-Caupi para o Nordeste Brasileiro: **Pesquisa Agropecuária Pernambucana.**, Recife, v.18, n.1, p.39-43, 2013.
- COULIBALY, S. et al. (2002) 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, n. 2-3, p.358-366.
- DIAS, F.T.C. et al. (2015) Variabilidade genética de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce analisada por marcadores RAPD e ISSR. **Revista Ciência Agrônômica**, v.46, n.3, p.563-572.
- EHLERS, J.D.; Hall, A.E. (1997) Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). **Field Crops Research**, v.53, p.187-204.
- ELLEGREN, H.; GALTIER, N. (2016) Determinants of genetic diversity. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 7, p.422-433.
- ELMASRY, G. et al. 2019 Utilization of computer vision and multispectral imaging techniques for classification of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Plant Methods**, v.15, n.1, p.1-16

FANG, J. et al. (2016) Applications of DNA Technologies in Agriculture. **Current Genomics**, v.17, n.4, p.379-386.

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

FAO- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **AGP - Conservation of Plant Genetic Resources**: Conservation of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/seeds-pgr/conservation/en/>>. Acesso em: 01 out. 2018.

FREIRE FILHO, F.R. et al. **Feijão-Caupi no Brasil: Produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina: Embrapa Meio-norte, 2011.

FREIRE FILHO, F.R. et al. Características botânicas e agronômicas de cultivares de feijão macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Teresina: EMBRAPA-UEPAE de Teresina, 1981. 45 p.

FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q.; BARRETO, P.D.; SANTOS, A.A. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; VIANA, F. M. P.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão caupi: avanços tecnológicos**. Embrapa Meio-Norte. 640p. 2005.

FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q.; RODRIGUES, J.E.L.F.; VIEIRA, P.F. de M.J. A Cultura: Aspectos Socioeconômicos. In: VALE, J.C do.; BERTINI, C.; BORÉM, A. (Eds.) **Feijão-Caupi do plantio à colheita**. Viçosa, MG; UFV, cap.1, p.9-34. 2017.

CARLINI-GARCIA, L.A.; PINTO, L.R.; LANDELL, M.G.A. (2013) Importância da manutenção de variabilidade genética para os produtores rurais. **Pesquisa e Tecnologia**, v.10, p.1-5.

GRATTAPAGLIA D.; SEDEROFF, R. (1994) Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Euclyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy. Genetics. v.137, n.4, p.1121-1137.

GUIMARÃES, C.T.; MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p.715-740.

GUIMARÃES, C.T. et al. (2009) Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informa Agropecuário**, v.30, n.253, p.24-33.

GUIMARÃES, M.A.; MANDELLI, M.S.; SILVA, D.J.H. (2011) Seleção de genótipos de *Lactuca sativa* L. para a produção com adubação orgânica. **Revista Ceres**, v.58, n.2, p. 202-207.

GUIMARÃES, S.L. et al. (2019) Desenvolvimento inicial de feijão caupi inoculado com rizóbio em Latossolo de Cerrado. **Acta**, v.8, n.3, p.30-41.

- GUPTA P K, ROY J K, PRASAD M. (2001) Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. **Current Science**. 2001, v.80, p. 524-35.
- HALL, A.E. et al. (2003) Development of cowpea cultivars and germplasm by the Bean/Cowpea CRSP. **Field Crops Research**, v.82, n.2-3, p.103-134.
- HAYWARD, A.C. et al. (2015) Molecular Marker Applications in Plants. **Plant Genotyping**, v.1245, p.13-27.
- HUYNH, B.L. et al. (2013) Gene Pools and the Genetic Architecture of Domesticated Cowpea. **The Plant Genome**, v.6, n.2, p.1-2.
- IGWE, D.O. et al. (2017) Assessment of genetic diversity in *Vigna unguiculata* L. (Walp) accessions using inter-simple sequence repeat (ISSR) and start codon targeted (SCoT) polymorphic markers. **BMC Genetics**, v.18, n.1, p.1-13.
- IITA - INTERNATIONAL INSTITUTE OF TROPICAL AGRICULTURE - IITA (Nigéria). **IITA Accessions 2: Cowpea collection**. 2018. Disponível em: <<http://my.iita.org/accession2/index.aspx>>. Acesso em: 22 ago. 2018.
- IITA - INTERNATIONAL INSTITUTE OF TROPICAL AGRICULTURE - IITA (Nigéria). **To conserve or not to conserve?** 2010. Disponível em: <<https://translate.google.com.br/#view=home&op=translate&sl=en&tl=pt&text=http%3A%2F%2Freview.iita.org%2Findex.php%2Ftag%2Fcowpea-diversity%2F>>. Acesso em: 22 ago. 2018.
- IITA - INTERNATIONAL INSTITUTE OF TROPICAL AGRICULTURE - IITA. **About**. Disponível em: <<http://www.iita.org/about/>>. Acesso em: 10 out. 2018.
- JAYATHILAKE, C. et al. (2018) COWPEA: AN OVERVIEW ON ITS NUTRITIONAL FACTS AND HEALTH BENEFITS: an overview on its nutritional facts and health
- KAMARA, A.Y. et al. (2011) Genetic Gain in Yield and Agronomic Characteristics of Cowpea Cultivars Developed in the Sudan Savannas of Nigeria over the Past Three Decades. **Crop Science**, v.51, n.5, p.1877-1886.
- KHAN, T, et al (2015) Genetic Diversity Analysis of Cowpea by RAPD Markers. **International Journal of Innovation and Applied Studies**, v.10, p.459-465.
- KONGJAIMUN, A. et al. (2012) An SSR-based linkage map of yardlong bean (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. subsp. *unguiculata sesquipedalis* group) and QTL analysis of pod length. **Genome** 55:81–92.
- KUMAR, P. et al (2009) Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. **Plant Omics Journal**, v.2, p.141-162.
- KUMAR, J.; PRATAP, A.; SOLANKI, R. K. **Basics in molecular genetic mapping and QTL analysis in plants**. In: P. Bhowmik, S. K. Basu, and A. Goyal (eds), *Advances in Biotechnology*, 35- 52. Bentham Sciences Publishers, IL, USA 2009.

- MACHADO, C.F. et al. (2007) Herança da inflorescência composta da cultivar de feijão-caupi cacheado. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.5, p.1347-1350.
- MACHADO, L.C. et al. (2016) Maintenance of Brazilian Biodiversity by germplasm bank. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, n.1, p.62-66.
- 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.
- MALVIYA, N. et al. (2011) Analysis of genetic diversity in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cultivars with random amplified polymorphic DNA markers. **Plant Systematics and Evolution**, v.298, n.2, p.523-526.
- MARIM, B.G. et al. (2009) Variabilidade genética e importância relativa de caracteres em acessos de germoplasma de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.10, p.1283-1290.
- MARTINS, L.M.V. et al. (2003) Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v.38, N.6, p.333-339.
- MEYER, W. et al. (1993) Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as singles primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.9, p.2274-80.
- MILOŠEVIĆ, M. et al (2010) The importance and implication of genetic resources in agriculture. **Genetika**, v.42, n.3, p.585-598.
- MUCHERO, W. et al (2009) A consensus genetic map of cowpea [*Vigna unguiculata* (L) Walp.] and synteny based on EST-derived SNPs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.106, n. 43, p. 18159–18164.
- MUHAMMAD, R.W. et al. (2017) Characterization of maize genotypes for genetic diversity on the basis of inter simple sequences repeats. **Genetic and Molecular Resources**, v.16, n.1., gmr16019438.
- NASCIMENTO, S.P. et al (2011) Tolerância ao déficit hídrico em genótipos de feijão-caupi. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, p.853-860.
- NOVA, M.X.V. et al. (2014) Genetic variability and resistance of cultivars of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus* Fabr.). **Genetics and Molecular Research**, v.13, n.1, p.2323-2332.
- NUNES, R.T.C. et al. (2017) Produção e qualidade de sementes de feijão-caupi: Production and quality of cowpea seeds as a function of molybdenum doses. **Revista de Ciências Agrárias**, v.40, n.3, p.533-542.

- NYBOM, H. (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, v.13, p.1143-1155.
- OLIVEIRA, L.A. et al. (2018) Performance of Cowpea Genotypes in the Brazilian Midwest Using the Bayesian Additive Main Effects and Multiplicative Interaction Model. **Agronomy Journal**, v.110, n.1, p.147-154.
- ONOFRE, A.V.C. **Desenvolvimento de marcadores de DNA para mapeamento genético e caracterização da diversidade em feijão-caupi**. 2012. 144 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.
- PADULOSI, S.; NG, N.Q. Origin, taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SINGH, B. B. et al. **Advances in cowpea research**. Tsukuba: IITA/JIRCAS, p.1-12. 1997.
- PAIVA, E.P. et al. (2018) Germination and tolerance of cowpea (*Vigna unguiculata*) cultivars to water stress. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.22, n.6, p.407-411.
- PASQUET, R.S. (2000) Allozyme diversity of cultivated cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Theoretical And Applied Genetics**, v.101, n.1-2, p.211-219.
- PÚBLIO JÚNIOR, E. et al. (2017) Características agronômicas de genótipos de feijão-caupi cultivados no sudoeste da Bahia. **Científica**, v.45, n.3, p.223-230.
- PÚBLIO JUNIOR, E. et al. (2018) Estimativas de parâmetros genéticos em genótipos de feijão-frade. **Revista de Ciências Agrárias**, v.41, n.3, p.806-814.
- REYES-VALDÉS, M.H. et al. (2018) An informational view of accession rarity and allele specificity in germplasm banks for management and conservation. **Plos One**, v.13, n.2, p.1-15.
- ROCHA, R. B. et al. (2003) O mapeamento genético no melhoramento de plantas - Teoria e aplicações inseridas em um programa de melhoramento de plantas. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.30, n.1, p.27-32.
- SAHU, P.K., DHOLE, V.J., MONDAL, S. (2019). **Molecular Breeding for Resistance to Economically Important Diseases of Pulses**. In: WANI S. (eds) *Disease Resistance in Crop Plants*. Springer, Cham. p.157–198.
- SANTANA, I.B.B. et al. (2011) Variabilidade genética entre acessos de Umbu-Cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n.3, p.868-876.
- SANTOS, D. N. et al. (2016) Genetic structure from the oldest *Jatropha* germplasm bank of Brazil and contribution for the genetic improvement. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.88, n.4, p.2363-2374.

- SEMAGN, K.; BJØRNSTAD, Å.; NDJIONDJOP, M. N. (2006) An overview of molecular marker methods for plants. **African Journal of Biotechnology: Academic Journals**, v.5, n. 25, p. 2540-2568.
- SHARMA, A; NAMDEO, A. G; MAHADIK, K.R. (2008) Molecular Markers: New Prospects in Plant Genome Analysis. **Pharmacognosy Reviews**, v. 2, n. 3, p.99-105.
- SILVA, T.S.S. et al. (2018) Caracterização e seleção de marcadores moleculares em *Croton linearifolius* Mull. Arg. como subsídio para estudos genéticos. **Multi-science Journal**, v.1, n.10, p. 4-8.
- SILVA, A.L.J; NEVES, J. (2011) Produção de feijão - caupi Semi - prostrado em cultivos de sequeiro e irrigado. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias** v.6, n.1, p. 29 -36.
- SILVA, A.V. et. al. (2017) Diversity and genetic stability in banana genotypes in a breeding program using inter simple sequence repeats (ISSR) markers. **Genetic and Molecular Research**, v.16, n.1, gmr16019402
- SILVA, B.M. et al. (2016) Diversidade genética estimada com marcadores entre sequências simples repetidas em cultivos comerciais de Cupuaçuzeiro. **Ciência Rural**, v.46, n.1, p.108-113.
- SIMON, M.V. et al (2007) Genetic diversity and phylogenetic relationships in *Vigna Saví* germplasm revealed by DNA amplification fingerprinting (DAF), **Genome**, v.50, p. 538-547.
- SOUSA, I.S.; FREIRE FILHO, F.R.; LOPES, A.C. de A.; ROCHA, M.M.; RIBEIRO, V.Q.; GOMES, R.L.F.; RÉGO, M.S.C. **Determinação da taxa de fecundação cruzada em feijão-caupi [*Vigna unguiculata* L. (Walp)]**. In: Congresso Nacional de feijão-caupi e VI Reunião Nacional de Feijão-caupi, 2006. Anais. [CD-ROM]. Teresina: Embrapa Meio-Norte.
- SOUZA, P.J.O.P. et al (2017) Biomass and leaf area production and yield of cowpea under water regimes in Castanhal, Pará. **Revista Caatinga**, v.30, p.748-759.
- SOUZA, P.J.O.P. et al. (2019) Yield and water use efficiency of cowpea under water deficit. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.23, n.2, p.119-125.
- SPIAGGIA, F.; CARVALHO, R.; BENKO-ISEPPON, A. M. (2009) Preliminary molecular characterization of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Accessions by DAF (DNA Amplification Fingerprinting). **Gene Conserve**, v.8, n.34, p.818-828.
- TANYA, P. et al (2010) Genetic diversity among *Jatropha* and *Jatropha*-related species based on ISSR markers. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.29, p.252-264.

- TEÓFILO, E.M.; PAIVA, J.B.; MEDEIROS-FILHO, S. (2001). Artificial pollination in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.1, 220–223.
- TIMKO, M.P. et al (2008) Sequencing and analysis of the gene-rich space of cowpea. **BMC Genomics** 9:103
- TIMKO, M.P., SINGH, B.B. (2008) Cowpea, a multifunctional legume. In: Moore PH and Ming R (eds), **Genomics of Tropical Crop Plants**, Springer Science Business Media, LLC, New York, NY. p. 227-258.
- TOPPA, E.V.B.; JADOSKI, C.J. (2013) O Uso dos Marcadores Moleculares no Melhoramento Genético de Plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.12, n.1, p.1-5.
- TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. 181 p.
- VAN EMON, J.M. (2015) The Omics Revolution in Agricultural Research. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 1, p.36-44.
- VERHAEGEN, D. et al (1997) Quantitative trait dissection analysis in Eucalyptus using RAPD markers: I. Detection of QTL in Interspecific hybrid progeny, stability of QTL, expression across different ages. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p. 597- 608.
- VIJAYKUMAR, A.; SAINI, A.; JAWALI, N. (2010) Phylogenetic analysis of subgenus *Vigna* species using nuclear ribosomal RNA ITS: Evidence of hybridization among *Vigna unguiculata* subspecies. **Journal of Heredity**, v.101, n.2, p.177-188.
- 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, cap 3, p.159-190. 2005.
- XIONG, H. et al. (2016) Genetic Diversity and Population Structure of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Plos One**, v.11, n.8, p.1-15.
- XU, P. et al (2011) A SNP and SSR based genetic map of Asparagus bean (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) and comparison with the broader species. **PLoS One**, v.6, n.1, e15952
- ZANNOUOU, A, et al. (2008) Genetic variability of cultivated cowpea in Benin assessed by random amplified polymorphic DNA. **African Journal of Biotechnology**. V. 7, n. 24, p.4407-4414.
- ZHANG, H. et al. (2016) Back into the wild-Apply untapped genetic diversity of wild relatives for crop improvement. **Evolutionary Applications**, v.10, p. 5–24.

ANEXO A - NORMAS DA REVISTA

Brazilian Journal of Agricultural Research (PAB) i

Analysis of the manuscripts

The Editorial Board performs an analysis, before submitting the manuscripts to the referees. This analysis considers aspects such as scope, preparation of articles according to the journal's instructions, originality of the objectives, style of the composition, theoretical basis, an updated literature review, consistent and accurate methodology, results containing useful contributions, discussion of the observed facts in relation to the facts described in the literature, quality of tables and figures, and originality and consistency of the conclusions. After using these criteria, rejected papers will be returned to authors, and accepted ones will be submitted to the technical referees' analysis.

Form and preparation of manuscripts

Papers submitted to PAB must be original, not simultaneously submitted to or previously published in any other scientific or technical journal. Data previously published in abstracts containing more than 250 words must not be included in the paper.

Scientific Articles, Scientific Notes, and Review Articles (this last one only by the Editor's invitation) are the formats accepted by PAB.

Papers published are grouped in technical areas according to their main subject. The major technical areas are Entomology, Plant Physiology, Plant Pathology, Crop Science, Pomology, Genetics, Microbiology, Mineral Nutrition, Soil Science, and Animal Science.

Originals - The text should be typed in the Microsoft Word, double spaced, using Times New Roman font 12, paper A4 format, and with 2.5 cm margins, and have numbered pages and lines.

Cover letter

Upload your cover letter, which must be written in English, in a separate file in the designated area in the submission page. The cover letter should be used to certify that your manuscript is original and that it has not been submitted, accepted for publication, nor published in another journal or elsewhere in its final form, in printed or in electronic format.

Please indicate the relevance/importance of your work and how your manuscript is within the scope of the journal.

Organization of the paper

The article organization should be as follows:

Title, authorship, institutional and electronic address; Abstract; Index terms, in English; title, abstract, index terms in Portuguese; Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables and figures, in English.

The scientific paper should have at most 20 pages, including illustrations (tables and figures), which should be limited to six.

Title

It should portray the work content and objective, and should comprise 15 words at most, including articles, prepositions and conjunctions.

It should be written in bold lowercase, except the initial letter.

It should begin with key words, avoiding words such as "effect of" or "influence of".

It must not contain scientific names, except that of little known species; in that case, use only the binomial nomenclature (genus and species).

It must not contain subtitles, abbreviations, formulas, and symbols.

Words should facilitate the retrieving of indices developed by data bases which catalogue literature.

Authors' name

The names of the authors must be written using the initial letter in uppercase, in full, divided by commas; the two last ones are separated by the conjunction "and".

The last surname of each author should be followed by Arabic numerals, superscripted, in brackets, relating to the indication of the author's address.

Authors' address

The name and the full postal address of the institution as well as the electronic mail of the authors are presented below the author's name and indicated by Arabic numerals, in brackets, superscripted. They must be grouped by the address of the institution. Commas must separate electronic mails of authors from the same institution.

Abstract

The word Abstract must be spelt in lowercase, except for the initial letter, on the left margin, and separated from the text by a dash.

It must comprise 200 words, at most, including numbers, prepositions, conjunctions and articles.

It should be presented in short sentences, containing the objective, the materials and methods, as well as the results and conclusions.

It must not include bibliographical citations or abbreviations.

The end of the text must present the chief conclusion, and the verb to be used in the simple present tense.

Index terms

The expression Index Terms, followed by a colon, must be spelt in lowercase, except the initial letter, which must be capitalized.

Terms must be separated by commas and in lowercase, including the first one.

There must be at least three and at most six index terms, considering that a term may contain two or more words.

They must not be the same as words used in the title.

They must contain the scientific name (only the binomial nomenclature) of the studied species.

Preferably, they should be terms included in AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus (http://www.fao.org/aims/ag_intro.htm) or in SciELO Subject Index (<http://www.scielo.br>).

Introduction

The word Introduction must be centered, in bold, lowercase, except the initial letter, which must be capitalized.

The introduction must not exceed two pages.

It must clearly provide a reason for the work, emphasizing the scientific problem to be solved and presenting its relation with other published works on the subject.

The last paragraph must express the objective according to the described in the Abstract.

Materials and Methods

The names Materials and Methods must be centered, in bold, lowercase, except the initial letter, which must be capitalized.

It should be arranged chronologically.

It must present the description of the locale, the date, and the delineation of the experiment, as well as indicate treatments, number of repetitions and size of the experimental units.

It should describe the treatments and variables.

The discussion of the treatments and variables should avoid abbreviations and acronyms.

Materials and Methods should be described in such a way that another researcher may reproduce the experiment.

Long descriptions of ordinary techniques as well as needless details should be avoided.

The author must describe the statistical analyses used and any data transformations used.

Subtitles should be avoided; in the case that they are essential, write them in bold lowercase, except the initial letter, which should be capitalized, on the left margin of the page.

Results and Discussion

The expression Results and Discussion should be centered and written in bold, in lowercase, except the initial letters, which must be capitalized.

The results and discussion must not exceed four pages.

All data presented should be discussed based on the mention of each table and figure.

Tables and figures are mentioned consecutively, in numerical order.

The text should not only present the data on the figures and tables, but discuss them, i.e., compare them to the data presented by other authors.

Treatment and variable abbreviations should be avoided.

Data not presented should not be discussed.

The results and discussion cannot contain assertions that can not be supported by the data obtained in the actual work or by other mentioned works.

The references to tables and to figures must be done at the end of the first sentence of the text; if the other sentences of the paragraph refer to the same table or figure, a new indication is not necessary.

Do not present the same data, simultaneously, in tables and figures.

The discussion should be limited to the obtained data.

New findings should be compared with knowledge previously obtained.

Conclusions

The word Conclusions must be centered, written in bold, in lowercase, except the initial letter, which should be capitalized.

Sentences should be short, without further comments; the verb must be in the simple present tense.

They should be organized according to the objective of the work.

They can not be a summary of the results; they must present new findings of the research.

They must be numbered and cannot exceed five at most.

Acknowledgements

The word Acknowledgements must be centered, written in bold, in lowercase, except the initial letter, which must be capitalized.

They must be brief, beginning with "To the" (persons or institutions).

It must explain the reason of the acknowledgement.

References

The word References must be centered, written in bold, in lowercase, except the initial letter, which must be capitalized.

They must be up-to-date sources. At least 70% of references must be from the last 10 years and 70% of them must be periodical articles.

As an exception references can comprise older classical works related to the subject studied.

They must be normalized according to the ABNT current guidelines.

They must be presented in alphabetical order of authors' names, divided by semicolon, and unnumbered.

All authors of each work must be listed in the references.

Titles of periodicals must be written in bold.

All references must record a publication date, even if not precise.

There should not be more than thirty references.

Examples:

Events (only complete works are accepted)

SOUSA, A.B.O. de; SOUZA NETO, O.N. de; SOUZA, A.C.M. de; SAMPAIO, P.R.F.; DUARTE, S.N. Trocas gasosas e desenvolvimento inicial de mini melancia sob estresse salino. In: INOVAGRI INTERNATIONAL MEETING, 2., Fortaleza, 2014. **Anais**. Fortaleza: Inovagri, 2014. p.3813-3819. DOI: 10.12702/ii.inovagri.2014-a510.

Periodical articles

SILVA, T. P. da; VIDAL NETO, F. das C.; DOVALE, J.C. Prediction of genetic gains with selection between and within S2 progenies of papaya using the REML/Blup analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.52, p.1167-1177, 2017. DOI: 10.1590/s0100-204x2017001200005

Book chapters

SHAHZAD, A.; PARVEEN, S.; SHARMA, S.; SHAHEEN, A.; SAEED, T.; YADAV, V.; AKHTAR, R.; AHMAD, Z.; UPADHYAY, A. Plant tissue culture: applications in plant improvement and conservation. In: ABDIN, M.Z.; KIRAN, U.; KAMALUDDIN, ALI, A. (Ed.). **Plant Biotechnology: principles and applications**. Singapore: Springer, 2017. p.37-72. DOI: 10.1007/978-981-10-2961-5_2.

Books

SANTOS, H.G. dos; JACOMINE, P.K.T.; ANJOS, L.H.C. dos; OLIVEIRA, V.A. de; LUMBRERAS, J.F.; COELHO, M.R.; ALMEIDA, J.A. de; CUNHA, T.J.F.; OLIVEIRA, J.B. de. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3.ed. rev. e ampl. Brasília: Embrapa, 2013. 353p.

Thesis

SAMUEL-ROSA, A. **Análise de fontes de incerteza na modelagem espacial do solo**. 2016. 278p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

Electronic Sources

EMBRAPA. **Zoneamento agroecológico**. Available at: <<https://www.embrapa.br/tema-zoneamento-agroecologico>>. Accessed on: Apr. 10 2018.

Citations

References of summaries, documents in the press, or of any other source, whose data have not been published yet will not be accepted.

Self-quotations should be avoided.

They must be normalized according to the ABNT current guidelines.

Citations written in brackets

With just one author: surname written with the first letter capitalized, followed by a comma and the year of publication.

Two authors: surnames written with the first letter capitalized, divided by an ampersand (&), followed by comma and year of publication.

More than two authors: surname of the first author written in upper and lowercase, followed by the expression et al., in a normal font, comma and year of publication.

More than one work: they must follow a chronological order, and, after that, an alphabetical order of authors, and must be divided by semicolon.

More than one work by the same authors: do not repeat the name of the authors; commas divide the years of publication.

Citation of citation: surname of the author and year of publication of the original document, followed by the expression "cited by", as well as the citation of the work regarded.

Citation of citation must be avoided because there is a chance of misinterpretation; if it is essential, only the regarded work must comprise the references.

Citations out of brackets

With name of authors included in the sentence: they follow the previous guidelines, with the years of publication in brackets; they are divided by commas.

Formulas, expressions, and mathematical expressions

They must begin on the left margin of the page in a standard size of Times New Roman font.

They must not be in italics or in bold. Exceptions to the use of italics would be formula symbols conventionally written in italics.

Tables

Tables must be sequentially numbered, with Arabic numerals, and presented in separated sheets,

at the end of the text, after the references.

Tables should be self-explanatory, without the necessity to return to the text to understand them.

Essential elements: titles, headings, grid (columns and rows/lines) and column indicating treatments and variables.

Complementary elements: footnotes and bibliographical source.

The title, followed by a period, must come after the word Table, in bold, numbered sequentially in Arabic numerals. It must be clear, brief and comprehensive; it must include the species name (general or scientific) as well as the dependent variables.

In the headings, the names of the variables must be written in full; if this is not possible, explain the meaning of the abbreviations in the title or footnotes of the table.

Measure units of all variables must be presented using the International System of Units.

The columns of the data, numerical values must be aligned by the last numeral.

No table cell (crossings between lines and columns) may be empty. The lack of numerical data should be represented by a hyphen (-), followed by an explanation footnote. To indicate the minimum significant difference, lowercase or uppercase letters are used in the columns or in the lines, at the right of the data, with indication in the footnote of the test and probability used.

In order to separate headings from titles and from the table, use horizontal borders; use them also on the base of the table to separate the content from the complementary elements. Additional horizontal borders may be used inside the headings and tables; do not use vertical borders.

Tables should be assembled in Word files, using the menu Table; do not introduce spaces using the space bar of the keyboard, but the indentation on the menu format paragraph.

Table footnotes

Source notes: they indicate the origin of data on the table; sources must be in the references.

Indication notes: specific pieces of information about parts of the table, in order to form an opinion about the data. They are indicated in Arabic numerals, superscripted, in brackets, on the right of the word or number, on the title, on the headings, on the table, or on the column. They are continuous, without changing lines, separated by a period.

To indicate significance, the indications ns (nonsignificant); * and ** (significant at 5 and 1% probability, respectively) will be used.

Figures

Charts, graphs, drawings, maps and photographs will be considered figures to illustrate the texts.

They should only accompany the text when necessary to explain the described facts.

The title of the figure, without bold, must come after the word Figure, the number in Arabic numerals, and the period, in bold.

Figures should be self-explanatory, without the necessity to return to the text to understand them.

Legends (key to the adopted conventions) must be included in the figure, in the title, or between the figure and the title.

On the graphs, the indications of the axes X and Y must have initials in uppercase, and must be followed by the units in brackets.

After the figure title, non-original figures must include the source from which they were taken; sources must be in the references.

Copyright to the author of photographs is mandatory, as well as the copyright to the authors of drawings and graphs, which have required creative action in their construction.

To standardize units, font (Times New Roman) and size of letters in all figures.

Dots of curves must be represented by contrasting markers, such as: circles, squares, triangles or diamonds (full or empty).

Numbers that stand for the measures and respective signs must be out of the quadrant.

Curves must be identified in the figure, avoiding excess information that interferes with the understanding of the graphs.

Figures can not present data included in tables.

They must be organized in such a way as to present the necessary quality for good reproduction and measure 8.5 or 17.5 cm width.

The figures must be saved in Word, Excel, or Corel Draw, in order to make editing and corrections possible.

Use borders with, at least, $\frac{3}{4}$ width.

In the case of a graph of bars and columns, use a scale of proportional gray (e.g.: 0%, 25%, 50%, 75% and 100% for five variables).

Do not use bold in figures.

Photographs must have a resolution of, at least, 300 dpi and be saved in TIF files, separated from text files.

Avoid using colours in the figures; photographs, however, may be coloured.

Scientific Notes

Scientific notes are brief communications, which justify immediate publication, due to the fact that the finding is original and important, but the content is still not enough to constitute a complete scientific article.

Presentation of Scientific Notes

The organization of a scientific note must be the following: Title, authorship (with respective indication to authors' address), Abstract, Index terms, the text itself (including introduction, materials and methods, results and discussion, as well as conclusion, without division), references, tables and figures.

The guidelines to the presentation of a scientific note are the same as for a scientific article, except in the following items:

The abstract must not exceed 100 words.

The note must not be longer than eight pages, including tables and figures.

It may have up to 15 references.

It may have, at most, two illustrations (tables and figures).

Further information

There are no charges for publication.

Manuscripts accepted for publication are double reviewed by experts.

The editor and the referees have the right to request changes in the articles and to decide about their publication.

Opinions and concepts developed in the manuscript are of the authors' exclusive responsibility.

The accepted articles cannot be reproduced, even partially, without the expressed consent of the editor of PAB.

Contacts can be made by phone: 55 61 3448-2461; and e-mail: sct.pab@embrapa.br

Embrapa - Secretaria de Pesquisa e Desenvolvimento
Pesquisa Agropecuária Brasileira - PAB
Caixa Postal 040315
CEP 70770-901 Brasília, DF, Brazil