

Estimativa da diversidade de variedades tradicionais de feijão-caupi do Acre com marcadores SSR

Francisca Silvana Silva do Nascimento¹, Gabriela do Nascimento Souza^{2*}, Vanderley Borges dos Santos³, Sabrina Sondre de Oliveira Reis⁴, Clemeson da Silva Souza⁵; Leila Priscila Peters³, Berenice Kussumoto de Alcântara da Silva³

¹Mestre em Ciências e Inovação Tecnológica pela Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Brasil, ²Mestranda em Produção Vegetal pela Universidade Federal do Acre, Brasil, ³Professora da Universidade Federal do Acre, Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Rio Branco, Acre, Brasil, ⁴Doutoranda em Biodiversidade e Tecnologia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Brasil, ⁵Doutor em Produção Vegetal pela Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Brasil *gns.gabi21@gmail.com

Recebido em: 27/02/2023

Aceito em: 18/05/2023

Publicado em: 31/07/2023

DOI: <https://doi.org/10.29327/269504.5.1-20>

RESUMO

O Estado do Acre é um importante celeiro da diversidade de feijão-caupi, sendo os pequenos agricultores os principais responsáveis por sua manutenção e conservação. Embora seja de grande importância para o melhoramento, a diversidade genética do feijão-caupi ainda não foi devidamente determinada e explorada. Os marcadores moleculares são ferramentas eficientes para estimar com confiabilidade as diferenças entre genótipos de uma mesma espécie. O objetivo desse estudo foi determinar por meio de marcadores microssatélites a variabilidade genética de variedades tradicionais de feijão-caupi cultivadas no Acre. Os 53 genótipos utilizados foram semeados e cultivados em vasos até a produção de folhas totalmente expandidas para extração de DNA. Utilizou-se cinco locos microssatélites. Através dos dados de presença e ausência das bandas de cada marcador realizou-se os cálculos do índice de Jaccard. Foram realizadas análises multivariadas para verificar o agrupamento dos genótipos pelos métodos UPGMA, Otimização de Tocher, Tocher modificado e coordenadas principais. As distâncias genéticas variaram 0,00 a 0,81. Verificou-se alta variabilidade entre os 53 genótipos, os quais foram separados em 44 grupos distintos. Um par de genótipo foi identificado como duplicata. Os genótipos divergentes identificados nesse estudo podem ser indicados para compor programas de melhoramento genético do feijão-caupi.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*. Microssatélites. Polimorfismo.

Estimation of the diversity of traditional varieties of cowpea in Acre with SSR markers

ABSTRACT

The State of Acre is an important source of cupi bean diversity, with small farmers being the main responsible for its maintenance and conservation. Although it is of great importance for breeding, the genetic diversity of cowpea has not yet been properly determined and explored. Molecular markers are efficient tools to reliably estimate the differences between genotypes of the same species. The aim of this study was to determine, using microsatellite markers, the genetic variability of traditional varieties of cowpea cultivated in Acre. The 53 genotypes used were seeded and grown in pots until the production of fully expanded leaves for DNA extraction. Five microsatellite loci were used. Based on the presence and absence of bands for each marker, the Jaccard index was calculated. Multivariate analyzes were performed to verify the grouping of genotypes by the UPGMA, Tocher Optimization, Modified Tocher and principal coordinates methods. Genetic distances ranged from 0.00 to 0.81. There was high variability among the 53

genotypes, which were separated into 44 distinct groups. One genotype pair was identified as a duplicate. The divergent genotypes identified in this study can be indicated to compose cowpea genetic improvement programs.

Keywords: *Vigna unguiculata*. Microsatellites. Polymorphism.

INTRODUÇÃO

Dentre as angiospermas dicotiledôneas tem-se o feijão-caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., leguminosa de grande importância entre as espécies cultivadas, que além de contribuir com a alimentação humana auxilia na fertilidade do solo por meio da fixação biológica de nitrogênio (MUSVOSVI, 2009). As variedades desta cultura possuem plasticidade fenotípica e alta variabilidade genética, o que lhes conferem alta capacidade adaptativa a diferentes condições edafoclimáticas (BARROS et al., 2011).

A produção nacional de feijão-caupi na safra 2020/2021 foi estimada em 712,6 mil toneladas. As regiões Nordeste (1,3 milhão de hectares) e Norte (321,14 mil hectares) são as que concentram maior área plantada (CONAB, 2021). Portanto, o feijão-caupi se destaca socioeconomicamente no cenário agrícola da Amazônia brasileira, pois seu cultivo é praticado por pequenos e médios produtores, os quais desempenham a agricultura extensiva e de subsistência (CORRÊA et al., 2015).

O modelo agrícola supramencionado contribui com a conservação de genótipos pouco estudados, que poderiam ser utilizados em programas de melhoramento genético para seleção ou melhoramento de características específicas, como qualidade de grãos e resistência a estresses bióticos e abióticos (DIAS et al., 2015). Um dos pré-requisitos necessários em programas de melhoramento é o conhecimento da diversidade genética disponível, o que permite avaliar os genitores quanto à semelhança ou divergência entre eles. Isso contribui para determinar as combinações híbridas com maior efeito heterótico e alta heterozigosidade e, conseqüentemente, maior potencial para gerar populações segregantes promissoras para obtenção de cultivares superiores (CRUZ et al., 2011).

Esse conhecimento pode ser obtido aplicando métodos de agrupamento como Tocher e UPGMA, baseados em medidas de dissimilaridade ou similaridade (CRUZ et al., 2011). A variabilidade genética entre genótipos de feijão-caupi já foi relatada anteriormente com base em caracteres morfológicos e agronômicos (SANTOS et al., 2014; SOUSA et al., 2017; GERRANO et al., 2015). O Estado do Acre é um dos celeiros da variabilidade genética desta cultura (MIQUELONI et al., 2018). Contudo, apenas trabalhos de caracterização morfoagronômica foram realizados (NASCIMENTO et al., 2022).

Geralmente, a seleção de genótipos é realizada com base em informações fenotípicas e agronômica dos indivíduos, as quais são fortemente influenciados pelas interações ambientais. Neste sentido, o processo de caracterização e estudo da diversidade utilizando marcadores moleculares assume um papel importante por detectar a presença de polimorfismo genético diretamente no DNA sem alterações de fatores ambientais (CRUZ et al., 2004; TOPPA; JADOSKI JÚNIOR, 2013).

As variedades locais de feijão-caupi do Estado Acre ainda são desconhecidas quanto ao perfil genético molecular. O estudo do polimorfismo molecular fornecerá informações valiosas, como a identificação de alelos de interesse agronômico que poderão ser usados nos programas de melhoramento genético desta cultura. Uma das ferramentas capaz de auxiliar nessa problemática são os marcadores microssatélites ou repetições de sequência simples (SSRs - Simple Sequence Repeats). Esses marcadores são ferramentas importantes na caracterização de genótipos e estudos da diversidade genética em diferentes espécies, tais como *Phaseolus vulgaris* (FISSEHA et al., 2016), *Arachis hypogaea* (DAUDI et al., 2021) e *Arachis pintoi* (AZÊVEDO et al., 2016).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi determinar a diversidade genética de variedades tradicionais de feijão-caupi do Acre baseado em marcadores microssatélites.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Universidade Federal do Acre, no Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos. Utilizou-se 53 acessos de feijão-caupi, provenientes de coletas em agricultores familiares e mercados públicos em municípios do estado do Acre. As sementes coletadas foram armazenadas em sacos de papel e plástico e garrafas tipo pet, devidamente identificadas. Em seguida armazenadas em câmaras frias tipo B.O.D. a 12 °C. A solicitação para visitas e coletas a produtores foi registrada no Sisbio (n.34945-1). As informações dos genótipos estão descritas na Tabela 1.

Em casa de vegetação, localizada na Universidade Federal do Acre, os genótipos coletados foram semeados em vasos com capacidade para 7 L, os quais estavam preenchidos com terra vegetal. As plantas foram cultivadas por 21 dias, período necessário para o desenvolvimento das folhas primárias e das primeiras folhas trifoliadas. Foi realizada uma irrigação e limpeza de plantas invasoras manualmente e diariamente, sempre no período da matutino. Posteriormente, foram coletadas folhas jovens das

plantas, após os 21 dias, para a extração de DNA genômico A extração de DNA genômico, conforme o método descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998).

Tabela 1 - Nomes e origens dos genótipos de feijão-caupi.

Identificação	Genótipos	Locais de coleta
1	Manteguinha Vermelho	Tarauacá
1.1	Manteguinha Vermelho	Cruzeiro do Sul
2	Quarentão	Marechal Thaumartugo
2.1	Quarentão	Praia da Amizade
2.2	Quarentão	Sena Madureira/ Mercado
2.3	Quarentão	Experimento 1 (UFAC)
2.4	Quarentão	Experimento 2 (UFAC)
3	Manteguinha Roxo	Experimento (UFAC)
3.1	Manteguinha Roxo	Cruzeiro do Sul 1
3.2	Manteguinha Roxo	Cruzeiro do Sul 2
4	Leite	Mâncio Lima
4.1	Leite	Sem Identificação
5	Roxinho	Sem Identificação
5.1	Roxinho MLB	Sem Identificação
5.2	Roxinho de praia	Experimento (UFAC)
6	Manteguinha	CVT
6.1	Manteguinha	Cruzeiro do Sul/ Praia Grande
6.2	Manteguinha	Sem Identificação
6.3	Manteguinha	Sem Identificação
7	Branco	Maloca
7.1	Branco	Sem Identificação
8	Costela de Vaca	CVT
8.1	Costela de Vaca	Sem Identificação
9	Mudubim de Rama	Mâncio Lima
9.1	Mudubim de Rama	Cruzeiro do Sul
9.2	Mudubim de Rama	Sem Identificação
9.3	Mudubim de Rama	Sena Madureira
9.4	Mudubim de Rama	Cruzeiro do Sul
9.5	Mudubim de Rama	Experimento (UFAC)
10	Ceará Caupi	Sena Madureira/ Mercado
10.1	Ceará Caupi	Sena Madureira/ Rio Caeté
10.2	Ceará Caupi	Sem Identificação
10.3	Ceará Caupi	IFAC (CVT)
11	Manteigão	IFAC (CVT)
11.1	Manteigão	Sem Identificação 1
11.2	Manteigão	Sem Identificação 2
11.3	Manteigão	Sem Identificação 3
12	Arigó	Sena Madureira
12.1	Arigó	Mâncio Lima
13	Branco de Praia	Sem Identificação 1
13.1	Branco de Praia	Sem Identificação 2
14	Corujinha	Cruzeiro do Sul
14.1	Corujinha	Bujari
14.2	Corujinha	Experimento
15	Caupi Preto	Sena Madureira
15.1	Caupi Preto	Sem Identificação
16	Baiano	Sena Madureira (Mercado)

16.1	Baiano	Sena Madureira
16.2	Baiano	Sem Identificação
16.3	Baiano	Experimento
17	Manteguinha Liso	Sem Identificação
17.1	Manteguinha Liso	Experimento 1 (UFAC)
17.2	Manteguinha Liso	Experimento 2 (UFAC)

O DNA extraído dos diferentes acessos foi quantificado e a qualidade avaliada em gel de agarose 0,8%. Foram utilizados 2 µL da solução estoque de cada DNA, juntamente com 4 µL de água bidestilada autoclavada e 1 µL de corante de carregamento. A intensidade das bandas foi comparada à de padrões com peso molecular e concentração conhecida de DNA do fago λ (10, 20, 50 ng). O gel foi submetido a uma voltagem de 80 V (3 V/cm) por meia hora. O gel foi analisado em luz ultravioleta e fotografado.

Para a utilização nas reações de PCR, os DNA extraídos de cada amostra foram diluídos em uma proporção de uma parte de DNA (solução estoque) para 4 partes de água bidestilada autoclavada, formando a solução de trabalho (aproximadamente 25 ng.µL⁻¹). As soluções de trabalho foram armazenadas em geladeira.

Inicialmente, foram testados 6 iniciadores de 44 bases de comprimento com o DNA de três acessos, sendo 5 destes selecionados, por terem apresentado amplificação nos testes. Os iniciadores utilizados e as sequências de bases estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 - Descrição dos marcadores SSRs utilizados, incluindo sequência dos primers e temperatura de anelamento (Ta°).

Nome	Sequência do primer (5' - 3')	Ta°	Fonte
SSR-6217	F:GGGAGTGCTCCGGAAAGT R:TTCCCTATGAACTGGGAGATCTAT	55 °C	Assare et al. (2010)
SSR-6265	F:CAGAAGCGGTGAAAATTGAAC G:CAGAAGCGGTGAAAATTGAAC	55 °C	Assare et al. (2010)
SSR-6613	F:CTATTGGAATCTTGCCGTTG G:CTTTACCTTTATGCAAACCAATC	55 °C	Timko (2013)
VM 10	F:TCCCCTCACTAAAATAACCAACC G:GGATGCTGGCGGCGGAAGG	55 °C	Gioi et al. (2012)
VM 36	F:ACTTTCTGTTTTACTCGACAACCTC G:GTCGCTGGGGGTGGCTTATT	55 °C	Gioi et al. (2012)

Para as reações de amplificação dos fragmentos de DNA foram utilizados 20 ng de DNA genômico; tampão 1x; 0,25 mM de dNTP's cada; 0,25 mg/mL de BSA (Albumina Sérica Bovina); 2,0 mM MgCl₂; 0,8 µM de cada iniciador e 1 U de Taq Polymerase.

As amplificações foram realizadas em termociclador. As etapas de amplificação consistiram em: desnaturação inicial do DNA a 95 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão a 95 °C por 60 segundos, 55 °C por 60 segundos e 72 °C por 60 segundos, respectivamente, e uma fase final de extensão de 72 °C por 10 minutos. Os produtos das amplificações foram visualizados em gel de agarose (3%), comparados a um marcador de peso molecular padrão 1 Kb plus.

Então, para as análises estatísticas, gerou-se uma matriz de presença e ausência para cada marcador, sendo 0 e 1 ausência e presença de alelo, respectivamente. As análises foram divididas em duas etapas. Na primeira, os 53 genótipos foram considerados como amostras. Para esta análise, utilizou-se o procedimento diversidade genética – diversidade entre acessos – variáveis qualitativas binárias – índice de Jaccard, para gerar a matriz de dissimilaridade do Software Genes (CRUZ, 2013). A partir dessa matriz, procedeu-se o agrupamento pelos métodos de Tocher (RAO, 1974) e Tocher modificado (sequencial) proposto por Vasconcelos et al., (2007).

A segunda etapa procedeu-se com o agrupamento gerado pelo método de Tocher modificado proposto por Vasconcelos et al., (2007) realizado anteriormente. Considerou-se o resultado do agrupamento como populações, total de 15, e utilizou-se o procedimento diversidade genética – diversidade entre e dentro de populações – análise binária – índice de Jaccard, para gerar a matriz de dissimilaridade do Software Genes (CRUZ, 2013). A partir desta matriz, procedeu-se o agrupamento pelos métodos de Tocher (RAO, 1974) e Tocher modificado (sequencial) proposto por Vasconcelos et. al. (2007). Também se realizaram agrupamento UPGMA e dispersão gráfica para melhor entendimento

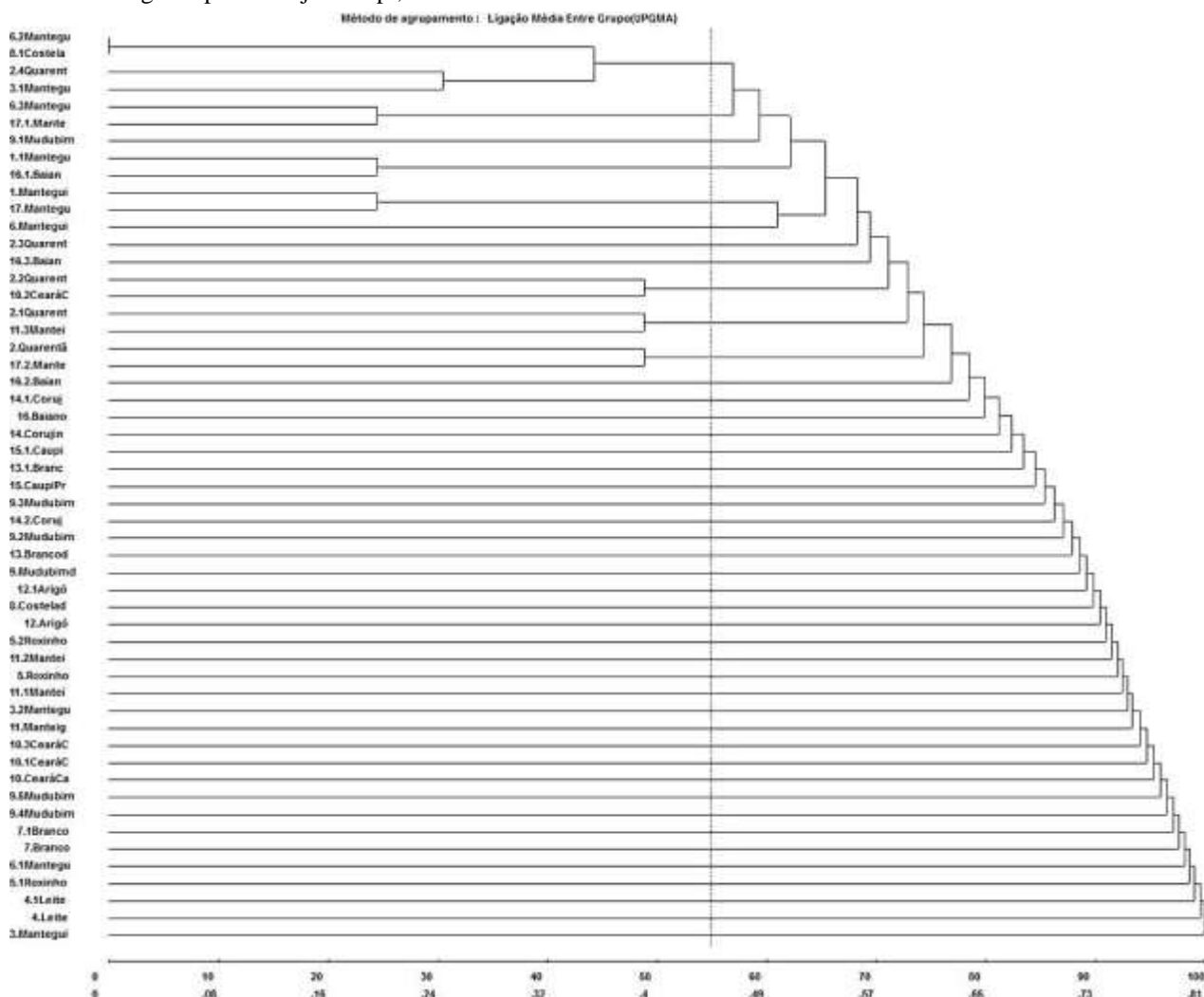
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se, com base nos marcadores SSR, que as distâncias genéticas entre os genótipos variaram de 0,00 a 0,81 (Figura 1). O dendrograma foi gerado pelo método UPGMA (distância média) e o agrupamento pelo método de otimização de Tocher, baseados no índice de Jaccard, mostraram que os 53 acessos de feijão-caupi foram divididos em 44 grupos (Tabela 3).

Em ambos os métodos, verificou-se que 37 grupos foram formados por um único genótipo, seis grupos por dois genótipos e um grupo por quatro genótipos. A amplitude das distâncias genéticas e quantidade de grupos formados neste estudo é superior à de pesquisas anteriores. Dias et al. (2015), examinaram a diversidade genética de 38 acessos

de feijão-caupi por meio de marcadores RAPD e verificaram a formação de 10 grupos distintos com um coeficiente de similaridade variando de 0,08 a 0,57. Já os 18 SSRs utilizados por Ali et al., (2015) separam os 252 acessos de feijão-caupi em apenas três grupos. Isso sugere que os 53 genótipos analisados neste estudo apresentam elevado nível de variabilidade genética.

Figura 1 - Dendrograma gerado pelo método UPGMA, representando a dissimilaridade genética entre 53 genótipos de feijão-caupi, com base na similaridade de Jaccard.



A variabilidade genética é a extensão em que o material difere dentro de um grupo de plantas (HINTUM, 1995). Conforme relatado a cima, a variabilidade genética dos acessos de feijão-caupi foi elevada. Esse resultado não é compatível com as observações verificadas em estudos anteriores, os quais além de relatarem baixos índices de variabilidade genética, explicaram que este fato é devido a um único evento de domesticação está envolvido na origem dessa cultura (ASARE et al., 2010; WAMALWA

et al., 2016). Além disso, o caráter autopolinizador do feijão-caupi contribui para a ocorrência de baixos índices de variabilidade (PADULOSI, 1993). Contudo, ao mesmo tempo que é verificado baixa variabilidade, há evidências genéticas de que o feijão-caupi é um táxon altamente diverso (HUYNH et al., 2013). Portanto, elevados níveis de variabilidade, como os verificados neste estudo, são passíveis de ocorrer.

Tabela 3 - Agrupamento de 53 genótipos de feijão-caupi pelo método de otimização de Tocher, com base na similaridade de Jaccard.

Grupos	Genótipos	Grupos	Genótipos
1	6.2 Manteguinha; 8.1 Costela de Vaca; 3.1 Manteguinha Roxo; 1 Manteguinha Vermelho	23	5.1 Roxinho MLB
2	1.1 Manteguinha Vermelho; 16.1 Baiano	24	6.1 Manteguinha
3	2. Quarentão; 17 Manteguinha Liso	25	6.3 Manteguinha
4	2.1 Quarentão; 17.1 Manteguinha Liso	26	7 Branco
5	2.2 Quarentão; 10.2 Ceará Caupi	27	7.1 Branco
6	2.3 Quarentão; 11.3 Manteigão	28	9.4 Mudubim de Rama
7	2.4 Quarentão; 17.2 Manteguinha Liso	29	9.5 Mudubim de Rama
8	6 Manteguinha	30	10 Ceará Caupi
9	9.1 Mudubim de Rama	31	10.1 Ceará Caupi
10	3.2 Manteguinha Roxo	32	10.3 Ceará Caupi
11	5 Roxinho	33	11 Manteigão
12	5.2 Roxinho de praia	34	11.1 Manteigão
13	8 Costela de Vaca	35	11.2 Manteigão
14	9 Mudubim de Rama	36	12 Arigó
15	9.2 Mudubim de Rama	37	12.1 Arigó
16	9.3 Mudubim de Rama	38	13 Branco de Praia
17	13.1 Branco de Praia	39	14.2 Corujinha
18	14 Corujinha	40	15 Caupi Preto
19	14.1 Corujinha	41	15.1 Caupi Preto
20	3 Manteguinha Roxo	42	16 Baiano
21	4 Leite	43	16.2 Baiano
22	4.1 Leite	44	16.3 Baiano

Os grupos que alocaram dois ou mais indivíduos são considerados homogêneos entre si e heterogêneos entre os genótipos dos outros grupos. Genótipos do mesmo grupo são geneticamente similares e, portanto, são menos indicados para serem utilizados em programas de melhoramento (GERRANO et al., 2015). Por outro lado, genótipos com grande divergência são promissores para serem usados como genitores e produzir híbridos altamente heteróticos (GONÇALVES et al., 2017).

Ao analisar o dendrograma apresentado na Figura 1, verificou-se que dentro do grupo com quatro genótipos, dois foram identificados com distância nula (6.2 Manteguinha e 8.1 Costela de Vaca). Essas duas variedades são distintas no nome e na morfologia, portanto é inesperado que os resultados deste estudo demonstrem redundância

entre elas. A identificação de duplicatas em coleções é comum (RIBEIRO et al., 2011; GROSS et al., 2012). Provavelmente, isso ocorre devido às trocas de materiais entre produtores, onde no novo local o genótipo pode receber outro nome (MOURA et al., 2016). Desse modo, a identificação de redundâncias nas coleções contribui para a melhor conservação e manejo do genótipo, diminuindo os desperdícios de manutenção e garantindo uma diversidade mais representativa (MOURA et al., 2013).

É conveniente considerar que a redundância entre Manteguinha (6,2) e Costela de Vaca (8,1) pode ter ocorrido pelo baixo número de marcadores utilizados (cinco locos). A maioria dos estudos que utilizam SSR para estimar a diversidade genética de populações de feijão-caupi empregam uma quantidade considerável de locos marcadores (ALI et al., 2015; CHEN et al., 2017A CHEN et al., 2017b). Contudo, há pesquisas que são conduzidas com baixo número de marcadores, a exemplo, do estudo com 19 acessos de feijão-caupi do banco de germoplasma do Quênia, o qual de forma eficiente estimou a diversidade genética com apenas dois marcadores microssatélites (WAMALWA et al., 2016). Isso sugere que poucos marcadores podem ser eficazes para diferenciar genótipos de feijão-caupi.

Tabela 4 - Agrupamento em populações (POP) de 53 genótipos de feijão-caupi pelo método de otimização de Tocher, com base similaridade de Jaccard.

POP	Genótipos	Distância média
P1	Manteguinha (6,2); Costela de Vaca (8,1); Manteguinha Roxo (3,1); Manteguinha Vermelho (1)	0,4
P2	Manteguinha Vermelho (1,1); Baiano (16,1); Manteguinha (6); Quarentão (2); Manteguinha Liso (17) Quarentão (2,1); Manteguinha Liso (17,1); Mudubim de Rama (9,1) Quarentão (2,2); Ceará Caupi (10,2); Quarentão (2,3)	0,6
P3	Quarentão (2,4); Manteigão (11,3)	0,6
P4	Manteguinha (6,3); Manteguinha Liso (17,2)	0,8
P5	Manteguinha Roxo (3); Manteguinha Roxo (3,2)	0,8
P6	Leite (4); Roxinho (5)	0,8
P7	Leite (4,1); Roxinho de praia (5,2)	0,8
P8	Roxinho MLB (5,1); Costela de Vaca (8)	0,8
P9	Manteguinha (6,1); Mudubim de Rama (9)	0,8
P10	Branco (7); Mudubim de Rama (9,2)	0,8
P11	Branco (7,1); Mudubim de Rama (9,3)	0,8

P12	Mudubim de Rama (9,4); Branco de Praia (13,1)	0,8
P13	Mudubim de Rama (9,5); Corujinha (14)	0,8
P14	Ceará Caupi (10); Corujinha (14,1)	0,8
P15	Ceará Caupi (10,1); Ceará Caupi (10,3); Manteigão (11) Manteigão (11,1); Manteigão (11,2); Arigó (12); Arigó (12,1); Branco de Praia (13) Corujinha (14,2); Caupi Preto (15); Caupi Preto (15,1); Baiano (16); Baiano (16,2) Baiano (16,3)	1,0

Pelo método de agrupamento de Tocher, baseado na similaridade de Jaccard, os 44 genótipos foram divididos em 15 grupos (ou populações) (Tabela 4). Os grupos 1, 2, 11 e 15 reuniram quatro (7,54%), 11 (20,75%) e 14 (26,42%) genótipos, respectivamente. Os demais grupos foram compostos por dois genótipos. Conforme análise de Tocher modificado, as 15 populações foram separadas em dois grupos (Tabela 5). A população 1 compôs singularmente o grupo II, mostrando que os genótipos alocados neste grupo são intimamente relacionados entre si e dissimilares dos genótipos presentes no conjunto formado pelas outras 14 populações (grupo I).

Observou-se que dentre os 15 grupos formados pelo método de otimização de Tocher, dois apresentaram grande quantidade de genótipos. Isso é uma característica deste método, conforme Vasconcelos et al. (2007), o método de otimização Tocher reúne vários acessos em um número bastante reduzido de grupos. Tais autores explicam que isso ocorre devido esse método utilizar um critério global, ou seja, baseia-se na maior entre as menores distâncias encontradas na matriz de dissimilaridade durante todo o processo. O grande número de acessos em um mesmo grupo reflete a variabilidade reduzida dos indivíduos, que não é significativa para promover a separação em mais grupos (ARAÚJO et al., 2017).

Tabela 5 – Agrupamento, gerado pelo Tocher Modificado, das 15 populações de feijão-caupi identificadas pelo método de otimização de Tocher, com base na similaridade de Jaccard.

Grupos	Populações	Distância média
I	P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15	0,191
II	P1	0,00
I x II	-	0,49

Embora tenham usados os mesmos valores de distância genética (D^2), os métodos de agrupamento UPGMA e de otimização de Tocher não foram totalmente concordantes entre si no agrupamento dos genótipos. Esta discrepância se deve à maneira distinta de cada método realizar o cálculo da variabilidade genética (BÜTTOW et al., 2010). Dentre estes métodos, o UPGMA possibilita uma melhor caracterização genotípica, identificando assim, os acessos mais próximos às distâncias entre eles, sendo estes acessos de diferentes procedências e altamente divergentes (VENDRAMINI et al., 2011).

No entanto, mesmo apresentando diferenças na entrega dos resultados, ambos os métodos de agrupamento são eficientes na discriminação de genótipos pela dissimilaridade genética como relatado em estudos anteriores (NARDINO et al., 2017; SIMON et al., 2012). Isso permite identificar os indivíduos que apresentam elevada distância genética e utilizá-los como genitores, a fim de elevar a probabilidade de alcançar populações com ampla variabilidade genética (POLETINE et al., 2016).

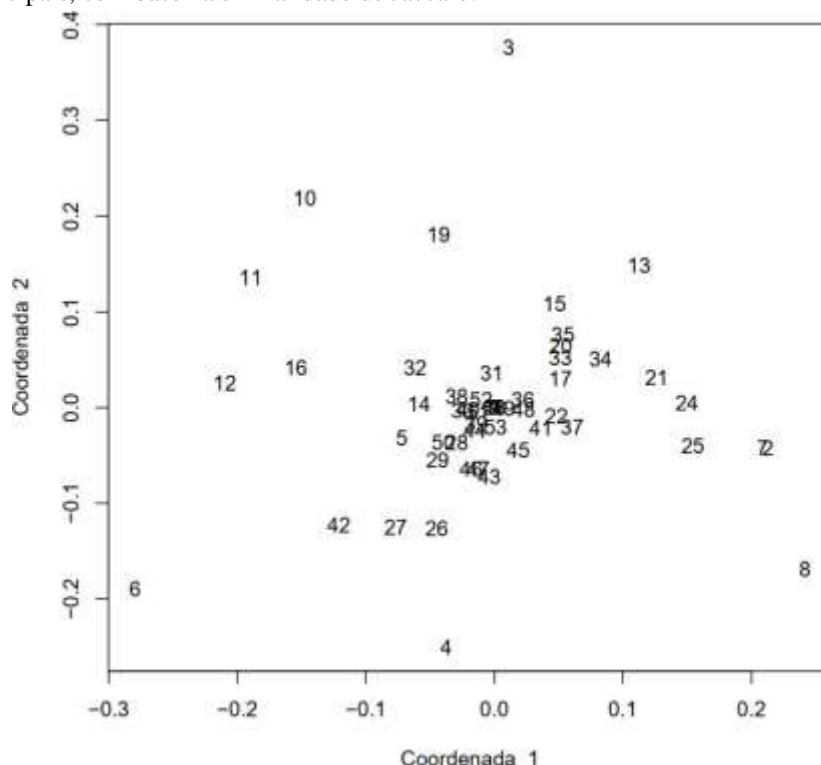
É importante destacar que conforme os dois métodos utilizados (UPGMA e Otimização de Tocher), os genótipos não agruparam fielmente com base no local de origem, evidenciando a existência de ampla divergência entre genótipos de mesma procedência. Observações similares, mas com base em caracteres morfoagronômicos, mostraram que genótipos de feijão-caupi não foram reunidos por local de coleta (NASCIMENTO et al., 2022). De um ponto de vista prático, a falta de correspondência no agrupamento pelo local de coleta pode ser explicada pelo intenso intercâmbio de sementes que ocorre entre os pequenos produtores e pela comercialização nos mercados locais, pois a venda ou a partilha de sementes de variedades tradicionais é uma prática comum na agricultura de subsistência (FICICIYAN et al., 2018).

As relações genéticas entre os genótipos de feijão-caupi foram ainda avaliadas usando análises de coordenadas principais - ACP ou PCA (do inglês *principal coordinate analysis*). Foram feitas duas ACPs. Na Figura 2 está apresentada a dispersão gráfica dos 53 genótipos e a ACP apresentada na Figura 3, refere-se a dispersão biplot dos 15 grupos identificados pelo método de otimização de Tocher.

As duas primeiras coordenadas principais confirmaram a existência de alta variabilidade entre os 53 genótipos de feijão-caupi, pois houve elevada dispersão no espaço bidimensional (Figura 2). Tais resultados são concordantes com o dendrograma apresentado na Figura 1 e com a análise de agrupamento de Tocher (Tabela 3), os quais também demonstraram variabilidade genética elevada.

A análise de coordenadas principais dos 15 grupos gerados pelo método de otimização de Tocher, confirmou que o grupo 1, formado pelo Manteguinha Vermelho (1), Manteguinha Roxo (3,1), Manteguinha (6,2) e Costela de Vaca (8,1) é altamente dissimilar dos demais grupos, corroborando com o agrupamento de Tocher Modificado (Tabela 4). Contudo, essas duas análises não foram completamente consistentes, pois pelo método de Tocher Modificado as 15 populações foram separadas em dois grupos, já na ACP foi possível identificar a segregação das 15 populações em quatro grupos.

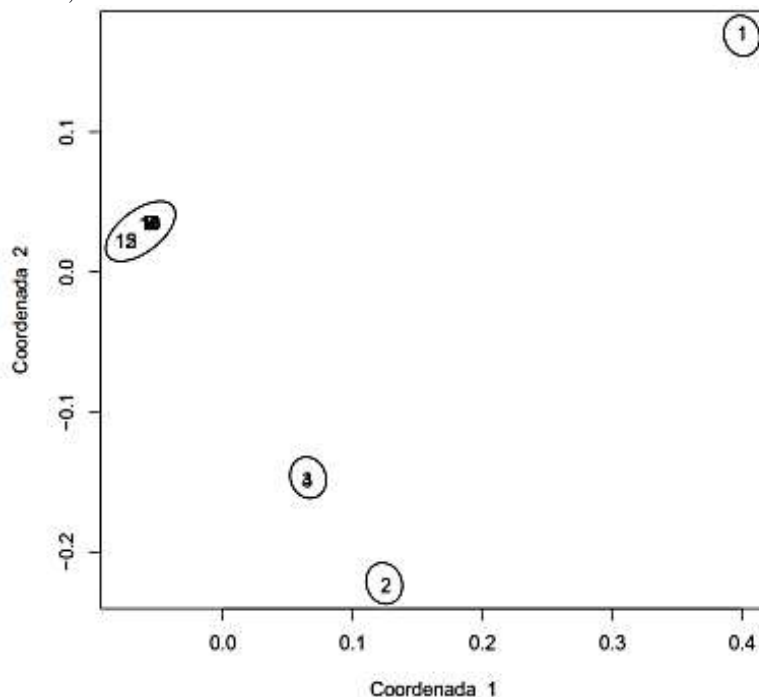
Figura 2 - Dispersão gráfica entre os 53 genótipos de feijão-caupi reveladas pela análise de coordenadas principais, com base na similaridade de Jaccard.



Em feijão-caupi a variação molecular já foi explicada por coordenadas principais. Chenet al., (2017b) verificaram que 78% da variância acumulada dos dados foram explicadas pelas três primeiras coordenadas principais. A primeira coordenada foi a que apresentou maior grau de explicação (55,3%) e separou os acessos em grupos com base na origem geográfica. A segunda coordenada também demonstrou a formação de grupos por procedência geográfica, porém com algumas misturas. Nas análises deste estudo, utilizou-se apenas as duas primeiras coordenadas para explicar a variação dos dados. Uma interpretação útil da análise de coordenadas principais é que a mudança percentual total nos dados é explicada pelas coordenadas principais (CP), sendo cada CP uma combinação

linear da variável original (JOLLIFFE; CADIMA, 2016). No entanto, todas as coordenadas não são normalmente usadas, devido a maioria dos padrões de variação dos dados serem limitados a CP1 e CP2, que podem ser resumidos em gráficos de dispersão biplot (LEVER et al., 2017), conforme apresentado neste estudo.

Figura 3 - Dispersão gráfica das 15 populações de feijão-caupi identificadas pelo método de otimização de Tocher, com base na similaridade de Jaccard.



De uma forma geral, os marcadores microssatélites utilizados neste estudo possibilitaram a verificação de resultados interessantes, pois em todas as análises realizadas constatou-se variabilidade genética entre os 53 genótipos e a formação de grupos distintos. Os resultados dos agrupamentos são importantes, pois mostra ao melhorista quais acessos são mais convergentes ou divergentes. Os convergentes são aqueles acessos que se encontram dentro do mesmo grupo, com baixa distância genética entre si. Já os acessos divergentes, são aqueles encontrados dentro de grupos diferentes, os quais apresentam grande distância genética (BORÉM; MIRANDA, 2013).

CONCLUSÃO

A variabilidade entre os genótipos de feijão-caupi é alta e é eficientemente detectada por marcadores microssatélites.

A coleção de feijão da Universidade Federal do Acre pode ser reduzida sem perda de diversidade genética, em razão da identificação de duplicidade entre o par de genótipos 6.2 Manteguinha e 8.1 Costela de Vaca.

Os genótipos divergentes identificados nesse estudo podem ser indicados para compor programas de melhoramento genético do feijão-caupi.

REFERÊNCIAS

- ALI, Z. B.; YAO, K. N.; ODENY, D. A.; KYALO, M.; SKILTON, R.; ELTAHIR, I. M. Assessing the genetic diversity of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] accessions from Sudan using simple sequence repeat (SSR) markers. **African Journal of Plant Science**, v. 9, n. 7, p. 293-304, 2015.
- ARAÚJO, L. B.; NETO, A. B.; GONDIM, G.; PIRES, K. R.; BERTINI, C. Diversidade genética em famílias de meios-irmãos de pinhão manso. **Enciclopédia Biosfera**, v. 14, n. 25, p. 452-465, 2017.
- ASARE, A. T.; GOWDA, B. S.; GALYUON, I. K.; ABOAGYE, L. L.; TAKRAMA, J. F.; TIMKO, M. P. Assessment of the genetic diversity in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) germplasm from Ghana using simple sequence repeat markers. **Plant Genetic Resources**, v. 8, n. 2, p. 142-150, 2010.
- AZÊVEDO, H. S. F. S.; SOUSA, A. C. B.; MARTINS, K.; OLIVEIRA, J. C.; TEIXEIRA, R.; SILVA, L. M.; VALLS, J. F. M.; ASSIS, G. M. L.; CAMPOS, T. Genetic diversity of the forage peanut in the Jequitinhonha, São Francisco, and Parana River valleys of Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, p. 15038601, 2016.
- BARROS, R. F.; ANUNCIÇÃO FILHO, J. D. C.; ROCHA, M. D. M.; NUNES, J. A. R.; SILVA, K. J. D.; FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q. Genetic potential of segregating cowpea progenies regarding inflorescence type. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 2, p. 182-189, 2011.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Melhoramento de plantas**. 6. ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2013.
- BÜTTOW, M. V.; BARBIERI, R. L.; NEITZKE, R. S.; HEIDEN, G.; CARVALHO, F. I. F. Diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões da Embrapa Clima Temperado. **Ciência Rural**, v. 40, n. 6, p. 1264-1269, 2010.
- CHEN, H.; CHEN, H.; HU, L.; WANG, L.; WANG, S.; WANG, M. L.; CHENG, X. Genetic diversity and a population structure analysis of accessions in the Chinese cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] germplasm collection. **The Crop Journal**, v. 5, n. 5, p. 363-372, 2017a.
- CHEN, H.; WANG, L.; LIU, X.; HU, L.; WANG, S.; CHENG, X. De novo transcriptomic analysis of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) for genic SSR marker development. **BMC Genetics**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2017b.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos, setembro 2021, safras 2020/2021**. Brasília, DF: Conab, v. 8, n. 12, p. 1-98. 2021.
- CORRÊA, M. J. P.; ALVES, G. L.; ROCHA, L. G. F.; SILVA, M. R. M. Períodos de interferência de plantas daninhas na cultura do feijão caupi. **Revista de Ciências Agroambientais**, v. 13, n. 2, p. 50-56, 2015.
- CRUZ, C. D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. 1. ed. Minas Gerais: EDUFV, 2011. 620 p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 1. ed. Viçosa: EDUFV, 2004. 480 p.

DAUDI, H.; SHIMELIS, H.; MATHEW, I.; OTENG-FRIMPONG, R.; OJIEWO, C.; VARSHNEY, R. K Genetic diversity and population structure of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) accessions using phenotypic traits and SSR markers: implications for rust resistance breeding. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 68, n. 2, p. 581-604, 2021.

DIAS, F. T. C.; BERTINI, C. H. C. M.; SILVA, A. P. M.; CAVALCANTI, J. J. V. Variabilidade genética de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce analisada por marcadores RAPD e ISSR. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 3, p. 563-572, 2015.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA D., **Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em análise Genética**. Curitiba: Biosystems, 1998. 219 p.

FISSEHA, Z.; TEFAYE, K.; DAGNE, K.; BLAIR, M. W.; HARVEY, J.; KYALLO, M.; GEPTS, P. Genetic diversity and population structure of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm of Ethiopia as revealed by microsatellite markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 52, p. 2824-2847, 2016.

GERRANO, A. S.; ADEBOLA, P. O.; JANSEN VAN RENSBURG, W. S.; LAURIE, S. M. Genetic variability in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) genotypes. **South African Journal of Plant and Soil**, v. 32, n. 3, p. 165-174, 2015.

GONÇALVES, T. M.; VIDIGAL FILHO, P. S.; VIDIGAL, M. C. G.; FERREIRA, R. C. U.; ROCHA, V. P. C. ORTIZ, A. H. T.; MOIANA, L. D.; KVITSCHAL, M. V. Genetic diversity and population structure of traditional sweet cassava accessions from Southern of Minas Gerais State, Brazil, using microsatellite markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 8, p. 346-358, 2017.

GROSS, B. L.; VOLK, G. M.; RICHARDS, C. M.; FORSLINE, P. L.; FAZIO, G.; CHAO, C. T. Identification of "duplicate" accessions within the USDA-ARS National plant germplasm system *Malus* collection. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 137, n. 5, p. 333-342, 2012.

HINTUM, T. J. L. Hierarchical approaches to the analysis of genetic diversity in crop plants. In: HODGKIN, T.; BROWN, A. H.; VAN HINTUM, T. J.; MORALES, E. A. V. (Ed.). **Core collections of plant genetic resources**, Chichester: John Wiley & Sons, 1995. p. 23-34.

HUYNH, B.; CLOSE, T. J.; ROBERTS, P. A.; HU, Z.; WANAMAKER, S.; LUCAS, M. R.; CHIULELE, R.; CISSÉ, N.; DAVID, A.; HEARNE, S.; FATOKUN, C.; DIOP, N. N.; EHLERS, J. D. Gene pools and the genetic architecture of domesticated cowpea. **The Plant Genome**, v. 6, n. 3, p. 1-8, 2013.

JOLLIFFE, I. T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. **Philosophical Transactions Royal Society A**, v. 374, n. 2065, p. 1-16, 2016.

LEVER, J.; KRZYWINSKI, M.; ALTMAN, N. Points of significance: Principal component analysis. **Nature Methods**, v. 14, n. 7, p. 641-643, 2017.

MIQUELONI, D. P.; dos SANTOS, V. B.; LIMA, S. R.; MESQUITA, D. N.; FURTADO, S. D. S. F. Descrição e discriminação de variedades crioulas de feijão-caupi na Amazônia Ocidental brasileira. **Acta Iguazu**, v. 7, n. 5, p. 49-61, 2018.

MOURA, E. F.; FARIAS NETO, J. T. D.; SAMPAIO, J. E.; SILVA, D. T. D.; RAMALHO, G. F. Identification of duplicates of cassava accessions sampled on the North Region of Brazil using microsatellite markers. **Acta Amazonica**, v. 43, n. 4, p. 461-468, 2013.

MOURA, E. F.; SOUSA, N. R.; MOURA, M. F.; DIAS, M. C.; SOUZA, E. D.; DE FARIAS NETO, J. T.; SAMPAIO, J. E. Molecular characterization of accessions of a rare genetic resource: sugary cassava

(*Manihot esculenta* Crantz) from Brazilian Amazon. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 63, n. 4, p. 583-593, 2016.

MUSVOSVI, C. Morphological characterisation and interrelationships among descriptors in some cowpea genotypes. **Journal of African Crop Science**, v. 9, n. 17, p. 501-507, 2009.

NARDINO, M.; BARETTA, D.; CARVALHO, I. R.; FOLLMANN, D. N.; FERRARI, M.; PELEGRIN, A. J. D.; SOUZA, V. Q. D. Divergência genética entre genótipos de milho (*Zeamays* L.) em ambientes distintos. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40 n. 1, p. 164-174, 2017.

NASCIMENTO, F. S. S.; SANTOS, V. B.; SOUZA, C. S.; PEREIRA, J. A. S.; ARAÚJO, R. I. S.; SANTOS, C. N.; ARAÚJO, A. M.; SILVA, E. A. Morphological and Agronomic Variability between Seven Local Cowpea Genotypes in Acre, Brazil. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 44, n. 3, p. 38-46, 2022.

PADULOSI, S.; NG, N. Q. A useful and unexploited herb, *Vigna marina* (Leguminosae- Papilionoideae) and the taxonomic revision of its genetic diversity. **Bulletin du Jardin botanique National de Belgique**, v. 62, n. 1-4, p. 119-126, 1993.

POLETINE, J. P.; SÁBIO, G.; BARELLI, M. A. A.; SEVERINO, J. J.; AUGUSTO, J.; SILVA, G. C. M. DA.; BORÁZIO, R. F. Caracterização morfoagronômica e divergência genética de acessos de feijão comum coletados no estado do mato grosso e avaliados na região do arenito caiuíá. **Journal of Agronomic Sciences**, v. 5, n. 1, p. 83-96, 2016.

RAO, R.C. **Advanced statistical methods in biometric research**. New York: John Wiley & Sons. 1974.

RIBEIRO, M. D. N. O.; CARVALHO, S. P. D.; SANTOS, J. B. D.; ANTONIO, R. P. Genetic variability among cassava accessions based on SSR markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 263-269, 2011.

SANTOS, J. A. D. S.; TEODORO, P. E., CORREA, A. M., SOARES, C. M. G., RIBEIRO, L. P., & ABREU, H. K. A. D. Desempenho agrônômico e divergência genética entre genótipos de feijão-caupi cultivados no ecótono Cerrado/Pantanal. **Bragantia**, v. 73, n. 4, p. 377-382, 2014.

SIMON, G. A.; KAMADA, T.; MOITEIRO, M. Divergência genética em milho de primeira e segunda safra. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 449-457, 2012.

SOUZA, S.; TAVARES, T.; BARROS, H.; NASCIMENTO, I.; SANTOS, V.; FIDELIS, R. Divergência genética de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) no sul do Tocantins. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. 2, p. 130-140, 2017.

VASCONCELOS, E. S.; CRUZ, C. D.; BHERING, L. L.; RESENDE JÚNIOR, M. F. R. Método alternativo para análise de agrupamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1421-1428, 2007.

VENDRAMINI, J. M.; NEVES, L. G.; BARELLI, M. A. A.; ELIAS, J. C. F.; LUZ, P. B. D. Otimização do uso dos descritores morfo-agronômicos de mandioca em análise multivariada. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 4, p. 906-913, 2011.

WAMALWA, E. N.; MUOMA, J.; WEKESA, C. Genetic diversity of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) accession in Kenya gene bank based on simple sequence repeat markers. **International Journal of Genomics**, v. 2016, n. 10, p. 1-5, 2016.