



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA –
CITA**



**ESTIMATIVA DA DIVERSIDADE DE VARIEDADES
TRADICIONAIS DE FEIJÃO-CAUPI DO ACRE COM
MARCADORES SSR**

FRANCISCA SILVANA SILVA DO NASCIMENTO

RIO BRANCO, AC
2022

FRANCISCA SILVANA SILVA DO NASCIMENTO

**ESTIMATIVA DA DIVERSIDADE DE VARIEDADES
TRADICIONAIS DE FEIJÃO-CAUPI DO ACRE COM
MARCADORES SSR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências e Inovação Tecnológica**.

Orientador: Vanderley Borges dos Santos

Co-orientador: Antônio Gilson de Mesquita

RIO BRANCO, AC
2022

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

N244e Nascimento, Francisca Silvana Silva do, 1984 -

Estimativa da diversidade de variedades tradicionais de feijão-caupi do Acre com marcadores SSR/ Francisca Silvana Silva do Nascimento; orientador: Dr. Vanderley Borges dos Santos e Coorientador: Antônio Gilson de Mesquita. - 2022.

44 f.: il.; 30 cm.

Dissertação(Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Mestrado em Ciências e Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Rio Branco, 2022.

Inclui referências bibliográficas.

1. *Vigna unguiculata*. 2. Microssatélites. 3. Genótipos. I. Borges, Vanderley Borges dos (orientador). II. Mesquita, Antônio Gilson de (coorientador). III. Título.

CDD: 509


Bibliotecária: Nádia Batista Vieira CRB-11º/882.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E TECNOLOGIA
PARA A AMAZÔNIA – CITA

**ESTIMATIVA DA DIVERSIDADE DE VARIEDADES
TRADICIONAIS DE FEIJÃO-CAUPI DO ACRE COM
MARCADORES SSR**

Francisca Silvana Silva do Nascimento

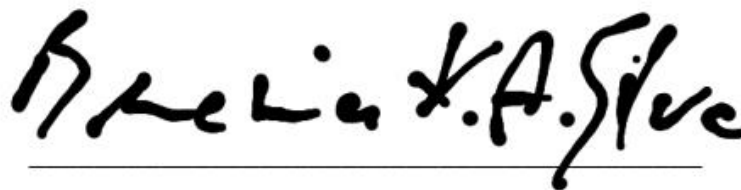
DISSERTAÇÃO APROVADA em: 29 de abril de 2022



Vanderley Borges dos Santos
Universidade Federal do Acre



Leila Priscila Peters
Universidade Federal do Acre



Berenice Kussumoto de Alcântara da Silva
Universidade Federal do Acre

Ao meu filho, Arthur Murilo Nascimento Souza
DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que fez com que todas as coisas cooperassem para a realização desse sonho.

Ao meu orientador, Dr. Vanderley Borges dos Santos, pela orientação, sabedoria de seus ensinamentos, paciência e incentivo que foram essenciais para a concretização deste trabalho.

À Universidade Federal do Acre, em especial, o Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia (CITA), por ter me proporcionado a oportunidade de dar continuidade à minha qualificação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

A FAPAC pelo apoio financeiro.

À minha família pelo amor, estrutura, incentivo e confiança no meu potencial, em especial minha mãe, por todo cuidado e zelo para que eu pudesse me dedicar totalmente a este sonho.

Ao meu amado e querido namorado, Clemeson da Silva Souza, por ser meu porto seguro, parceiro e maior motivador para eu deixar desistir.

À Sabrina Sondre Oliveira pela disposição e paciência em me ensinar as técnicas e rotinas do laboratório.

Aos amigos Joaes Alves da Silva Pereira e Carolaine Nascimento dos Santos pelo apoio, convivência e momentos de descontração.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, pelas contribuições e disciplinas ministradas.

Aos amigos do CITA por compartilharem as dificuldades e experiências deste mestrado, além dos momentos de confraternização.

E a todos os amigos que colaboraram direta ou indiretamente para esta conquista.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O Estado do Acre é um importante celeiro da diversidade de feijão-caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., sendo os pequenos agricultores os principais responsáveis pela manutenção e conservação desta cultura. 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. Foram coletadas sementes de 53 genótipos nas principais regiões produtoras desta cultura. Os genótipos coletados foram semeados e cultivados em vasos até a produção de folhas totalmente expandidas para extração de DNA. Foram utilizados cinco locos microssatélites. Os dados de presença e ausência das bandas de cada marcador foram utilizados para calcular o 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. A variabilidade entre os genótipos de feijão-caupi é alta. Os genótipos divergentes identificados nesse estudo podem ser indicados para compor programas de melhoramento genético do feijão-caupi.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*. Microssatélites. Genótipos. Análise de agrupamento. Polimorfismo. Recursos genéticos.

ABSTRACT

The State of Acre is an important source of diversity of cupi bean, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., with small farmers being the main responsible for the maintenance and conservation of this crop. Although it is of great importance for improvement, 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 objective of this study was to determine, through microsatellite markers, the genetic variability of traditional varieties of cowpea cultivated in Acre. Seeds of 53 genotypes were collected in the main producing regions of this culture. The collected genotypes were seeded and cultivated in pots until the production of fully expanded leaves for DNA extraction. Five microsatellite loci were used. The data on the presence and absence of the bands of each marker were used to calculate the jaccard index. 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 variability among cowpea genotypes is high. The divergent genotypes identified in this study can be indicated to compose cowpea genetic improvement programs.

Keywords: *Vigna unguiculata*. Microsatellites. genotypes. Cluster analysis. Polymorphism. Genetic resources.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Dendrograma gerado pelo método UPGMA, representando a dissimilaridade genética entre 53 genótipos de feijão-caupi, com base na similaridade de jaccard..... 28
- Figura 2 -** Dispersão gráfica entre os 53 genótipos de feijão-caupi reveladas pela análise de coordenadas principais, com base na similaridade de jaccard..... 33
- Figura 3 -** Dispersão gráfica das 15 populações de feijão-caupi identificadas pelo método de otimização de Tocher, com base na similaridade de jaccard..... 34

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1 -	Nomes e origens dos genótipos de feijão-caupi.....	23
Tabela 2 -	Descrição dos marcadores SSRs utilizados, incluindo sequência dos primers e temperatura de anelamento (Ta°).....	26
Tabela 3 -	Agrupamento de 53 genótipos de feijão-caupi pelo método de otimização de Tocher, com base na similaridade de jaccard.....	29
Tabela 4 -	Agrupamento em populações (POP) de 53 genótipos de feijão-caupi pelo método de otimização de Tocher, com base similaridade de jaccard.....	31
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.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

APC - Análises de Coordenadas principais

ISSR - *Inter Simple Sequence Repeat*

RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*

SSR - Sequências simples repetida

UFAC - Universidade Federal do Acre

UPGMA - *Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 ASPECTOS TAXONÔMICOS E BOTÂNICOS DE <i>Vigna unguiculata</i>	15
2.2 ORIGEM E CENTRO DE DIVERSIDADE.....	16
2.3 IMPORTÂNCIA ECONOMICA	17
2.4 VARIEDADES TRADICIONAIS	18
2.5 MARCADORES MOLECULARES.....	18
2.6 ESTUDOS MOLECULARES em <i>Vigna unguiculata</i>	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA	24
3.3 QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO DNA EXTRAÍDO	25
5.4 ANÁLISES DOS LOCOS MICROSSATELITES	25
5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5 CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1 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 agrônômicos (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 agrônômica dos indivíduos, as quais são fortemente influenciadas 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 agrônômico 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).

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo geral determinar a diversidade genética de variedades tradicionais de feijão-caupi do Acre baseado em marcadores microssatélites. Os objetivos específicos foram: (i) verificar a variabilidade entre genótipos de feijão-caupi; (ii) identificar as distâncias genéticas por meio de análises de agrupamento; (iii) indicar genótipos de feijão-caupi para cruzamentos divergentes e complementares.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Em 2016 foi decretado o ano internacional das leguminosas com a finalidade de mostrar o poder da proteína e os benefícios à saúde dos legumes secos, além de contribuir para eliminar a fome e a insegurança alimentar, principalmente, em países e regiões menos desenvolvidas (FAO, 2016). Dentre as leguminosas alimentícias, o feijão- tem grande importância mundial por ser uma fonte proteica utilizada principalmente na dieta da população de baixa renda (ALMEIDA et al., 2010).

2.1 ASPECTOS TAXONÔMICOS E BOTÂNICOS DE *Vigna unguiculata*

A espécie *V. unguiculata* pertence a divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família leguminosae, tribo Phaseoleae e gênero *Vigna*. O gênero *Vigna* possui pelo menos 90 espécies (BADIANE et al.,2014; IGWE et al.,2017). Apenas sete espécies são cultivadas, com destaque para o feijão-mungo-verde (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek, feijão-adzuki (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & H. Ohashi), feijão-arroz (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & H. Ohashi) e feijão-caupi (*V. unguiculata* (L.) Walp.) (VIEIRA et al., 1992; FREIRE FILHO et al., 2005).

A espécie *V. unguiculata* L. é uma planta herbácea, dicotiledônea e autógama, que foi descrita inicialmente por Linnaeus como *Dolichos unguiculatus* L., em seguida foi classificada por Walpers como *V. unguiculata* (L.) Walp. (PASQUET, 1996). É uma espécie diploide cujo número cromossômico mais comum é $2n = 22$ e raramente $2n = 20$ ou 18 (MERCADO-RUARO; DELGADO-SALINAS, 1998; BEYRA; ARTILES, 2004; SNAK et al., 2011).

O feijão-caupi produz frutos do tipo legume e, dependendo da variedade, pode apresentar variação na altura da planta. Suas raízes podem atingir até dois metros de profundidade no solo, o que auxilia a planta a resistir à seca, e possui propriedades proteicas, minerais e fibras (SOUSA, 2013).

Seu aspecto botânico é caracterizado por um sistema radicular ramificado, com raiz principal, secundária e terciária, profundidade de 20 a 40 cm sendo sensível a deficiência hídrica, possui caule herbáceo com eixo principal formado por nós e entrenós (1º nó constitui os cotilédones, 2º nó corresponde à inserção das folhas primárias e 3º nó a inserção das folhas trifolioladas), sendo que essas características determinam seu hábito de crescimento (determinado ou indeterminado). O primeiro par de folhas é simples e oposta; as folhas

secundárias são trifolioladas e opostas de forma triangular a lanceolada, sua inflorescência com flores agrupadas em duas ou mais podem ser brancas, róseas ou rochas, a partir do eixo central, constitui de um racemo (pedicelo da flor se insere em diversos níveis no eixo comum) modificado, com seis a oito pares de gemas florais; pode ser simples, com apenas uma inflorescência, ou composta, com mais de uma inflorescência. Suas flores são perfeitas (pistilo e estame na mesma flor), zigomorfas (simetria bilateral) e geralmente são distribuídas aos pares no racemo e nas extremidades do pedúnculo, região que antecede a flor ou o fruto o que se desenvolver a partir da axila da folha. Apresenta cálice do tipo pentâmero (cinco sépalas), persistente e gamossépalo (sépalas unidas ou soldadas entre si), apresentado coloração que pode ir do verde ao roxo. Sua corola assim como cálice é pentâmera e dialipétala (pétalas livres entre si), sendo a maior pétala o estandarte, que é a única pétala que se abre completamente na antese. O estandarte fica localizado na região posterior da flor enquanto as demais quatro pétalas continuam na mesma posição que ocupavam na gema. Suas flores abrem-se nas primeiras horas do dia (cerca de 5h00) e fechando-se por volta do meio-dia, dificultando a polinização pelos insetos (ARAÚJO et al., 1984; BEYRA; ARTILES, 2004; SNAK et al., 2011; SUSO et al., 2015).

2.2 ORIGEM E CENTRO DE DIVERSIDADE

A espécie *V. unguiculata* tem sua ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais do mundo com uma vasta distribuição mundial, sendo que a África apresenta a maioria das espécies, 66 das mesmas consideradas endêmicas. Podendo-se presumir que o gênero *Vigna* obteve sua evolução vinculada a esse continente (SANTANA et al., 2017).

Acredita-se que a entrada do feijão-caupi no Brasil ocorreu pela América latina no século XVI, provavelmente pelos primeiros colonizadores portugueses e espanhóis (FREIRE FILHO et al., 2011). Acompanhando o processo de colonização, essa leguminosa foi difundida para todo território brasileiro (FREIRE FILHO et al., 2011; BEZERRA; SAUNDERS, 1992), mas se destacou na região Norte e Nordeste do país (FREIRE FILHO et al., 2005). Por esse motivo, seu nome varia de acordo com a região: feijão-de-corda, feijão macassar e feijão-de-moite (Região Nordeste); feijão-de-praia (Região Norte) e feijão miúdo (Região Sul) (FREIRE FILHO et al., 2011). Seu cultivo ocorre em diferentes condições edafoclimáticas durante todo o ano, o que permite o estabelecimento de mais de uma safra (SALVADOR, 2014).

2.3 IMPORTÂNCIA ECONOMICA

O cultivo do feijão tem uma grande importância no cenário socioeconômico do Brasil. Está presente na dieta dos brasileiros, que possui indispensável papel nutricional, principalmente por possuir elevados teores de proteínas, ferro, cálcio, magnésio, zinco, vitaminas, carboidratos e fibras. (LOPES, 2010; CABRAL et al., 2011). No Brasil, a espécie mais importante em termos econômicos é o feijão-comum e o preto, seguido pelo feijão-caupi e o feijão-fava (GUIMARÃES et al., 2007; FREIRE FILHO et al., 2011).

Estas leguminosas são produzidas em quase todos os estados brasileiros, sob diferentes condições climáticas e do solo, épocas de semeadura (chuvosa, seca e inverno) e sistemas de cultivo, desde agricultura de subsistência, com baixo uso de tecnologia, até agricultura de alta tecnologia e por isso, o Brasil está entre os maiores produtores mundiais do grão (PEREIRA et al., 2017).

A produção nacional na safra 2020/2021 foi estimada em 712,6 mil toneladas, com área plantada de 1.307,800 ha⁻¹. A produção de feijão-caupi concentra-se nas regiões Nordeste (1,3 milhão de hectares) e Norte (321,14 mil hectares) do país, no entanto, a cultura está conquistando espaço na região Centro-Oeste, em razão do desenvolvimento de cultivares com características que favorecem o cultivo mecanizado. Os dados da Companhia Nacional de Abastecimento apontam crescimento expressivo em área plantada de feijão-caupi na safra 2020/2021, em torno de 73,7%, na primeira safra e de 74% na safrinha (CONAB, 2021). No Estado do Acre, a produção total de feijão na safra 2021 foi de 2,91 mil toneladas, colhidos de 5,22 mil hectares de área plantada (IBGE, 2021).

A expectativa é que para 2027/2028 a produção passe para 3.342,000 milhões de toneladas, que a área plantada seja de 3,09 milhões de hectares e que o consumo médio seja de 15,8 kg/habitante/ano, considerando as projeções da Federação das Indústrias do Estado de São Paulo (2020).

Estima-se que 70% do feijão produzido no território brasileiro seja do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) e 30% do feijão-caupi. É evidente que o feijão comum predomina nas regiões Sudeste, Sul e Centro Oeste, possivelmente em razão de fatores climáticos e o feijão-caupi predomina no Nordeste e Norte, mas tem se expandido para o Centro-Oeste (FREIRE FILHO et al., 2011). O cultivo de feijão-fava ainda tem pouca relevância, provavelmente pela tradição do consumo do feijão comum, apesar disso é uma espécie com adaptação mais ampla que o feijão tradicional (GUIMARÃES et al., 2007).

2.4 VARIEDADES TRADICIONAIS

As variedades tradicionais, locais ou crioulas são genótipos que não passaram por melhoramento convencional (FONSECA et al., 2015), mas que foram selecionadas ao longo de milhares de anos, por meio do processo de seleção de plantas, feito pelos agricultores, seus vizinhos, parentes e amigos, passadas de geração em geração (FISCHER et al., 2016). Esse tipo de recurso genético é considerado de grande importância para atender as necessidades dos pequenos agricultores, já que se trata variedades adaptadas ao meio em que são cultivadas (DA CUNHA, 2013).

A diversidade tem permitido aos agricultores não só superar as adversidades, como também explorar e aproveitar de forma mais segura o potencial do seu ambiente (ALMEIDA; CORDEIRO, 2002). Sendo assim, a adaptação a sistemas produtivos com pouca utilização de insumos externos também tem contribuído para o destaque alcançado nos últimos anos pelas variedades tradicionais, principalmente porque essas podem ser mais facilmente adaptadas a sistemas agroecológicos, que têm se tornado o objetivo de muitos agricultores (DA CUNHA, 2013).

A variabilidade genética presente nas cultivares que estão sob cuidados dos agricultores não só pode como deve ser utilizada pelos programas de melhoramento, tendo em vista que só se conservam aquelas linhagens que expressam alguma vantagem adaptativa. Desse modo, as leguminosas que são cultivadas pelos agricultores e que já passaram por diversas adaptações, estão aptas a serem utilizadas pelos programas de melhoramento, sendo necessário conhecer essa diversidade genética existente (BONETT et al., 2008; RAMALHO; ABREU, 2015).

O conhecimento da diversidade genética dessas variedades tradicionais é fundamental para os programas de melhoramento de feijão visando desenvolver e selecionar novas características e então, novas cultivares com alto potencial produtivo e demais características desejadas (BONETT et al., 2008).

2.5 MARCADORES MOLECULARES

Os estudos de diversidade genética de populações de plantas foram inicialmente desenvolvidos por meio de caracteres fenotípicos. Atualmente este método ainda é utilizado devido ao baixo custo e fácil manuseio da técnica. No entanto, essas informações apresentam limitações devido à exposição do fenótipo ao ambiente (OLIVEIRA, et al., 2007). Portanto, é fundamental que a caracterização seja complementada com o auxílio de marcadores

moleculares, os quais são capazes de detectar o polimorfismo genético a nível de DNA sem serem afetados pelo ambiente (FRANCO et al., 2001).

Os marcadores moleculares são ferramentas utilizadas com a finalidade de detectar variações no genoma, auxiliando na análise genética e permitindo indiretamente a seleção de caracteres desejáveis em programas de melhoramento de plantas (BORÉM; CAIXETA, 2009). Um marcador molecular pode ser denominado de marcador genético, quando seu comportamento está de acordo com as leis básicas da herança mendeliana (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Há diversos marcadores moleculares acessíveis para o uso em estudos de diversidade. Eles se diferenciam pelas formas de tecnologias utilizadas, pela capacidade de detectar diferenças entre indivíduos e pelo custo e facilidade de manuseio da técnica (BORÉM; CAIXETA, 2006). Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), as metodologias utilizadas para identificar os tipos de marcadores moleculares dividem-se em dois grupos: hibridização ou amplificação de DNA.

Os marcadores RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism* (BOTSTEIN et al., 1980) e os minissatélites ou locos VNTR - *Variable Number of Tandem Repeats*, (JEFFREYS et al., 1985) são os mais conhecidos dentre os marcadores identificados por hibridização. Com o advento da metodologia de amplificação via reação em cadeia da polimerase (PCR) foram desenvolvidos diversos marcadores moleculares: AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (VOS et al., 1995), RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA* (WILLIAMS et al., 1990), SSR - *Simple Sequence Repeats* (LITT E LUTTY, 1989), ISSR - *Inter Simple Sequence Repeat* (ZIETKIEWICZ et al., 1994), SNP - *Single Nucleotide Polymorphism* (RAFALSKI, 2002). Esses marcadores abriram inúmeras possibilidades de detecção e avaliação de polimorfismo encontrado diretamente na molécula de DNA.

No melhoramento de plantas a utilização desses marcadores é bastante ampla, destacando-se: a identificação e discriminação de genótipos; caracterização da variabilidade genética; identificação de origem parental e teste de paternidade; identificação e proteção de cultivares; certificação de pureza genética; caracterização de germoplasma; estudos de diversidade e distância genética e; identificação e seleção para locos de caracteres quantitativos (QTLs) (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Dentre a alta gama de marcadores moleculares citados acima os SSR ou microssatélites, tem sido amplamente utilizado pelo seu elevado conteúdo informativo e robustez analítica (GRATTAPAGLIA, 2007). São abundantes e distribuídos por todo o genoma, apresentam polimorfismo do tipo codominante, possuem natureza multialélica, necessitam de pequenas

quantidades de DNA nas reações de PCR e, são altamente transferíveis entre espécies de um mesmo gênero (GRATTAPAGLIA, 2001).

Muitos geneticistas e melhoristas de plantas têm realizado estudos genéticos com SSRs para fazer inferências sobre genealogia, evolução e identidade de vários caracteres em bancos de germoplasma (McCOUCH et al., 2001). Esses marcadores têm provado ser especialmente eficientes na avaliação da diversidade em pools gênicos, nos quais outras classes de marcadores moleculares, tais como AFLP, RFLP, RAPD não são aptos para detectar variações entre indivíduos (POWELL et al., 1996).

Os microssatélites são encontrados no DNA em regiões constituídas por sequências curtas, contendo de um a seis nucleotídeos por motivo repetidos em tandem, a saber: mononucleotídeo, dinucleotídeo, trinucleotídeo, tetranucleotídeo, pentanucleotídeo e hexanucleotídeo (TÓTH et al., 2000).

Os elevados níveis de polimorfismo encontrados nos microssatélites são decorrentes das altas taxas de mutação presente nesses locos. Diferentes hipóteses têm sido levantadas para explicar os mecanismos que levam às altas taxas de mutação que variam de loco para loco, sendo transferida de uma geração para outra a uma taxa de variação de 10^{-2} a 10^{-6} nucleotídeo por loco (SCHLÖTTERER, 2000). Takezaki (2010) atribui os erros que acontecem nos processos de recombinação, crossing-over desigual e no processo de slippage (deslizamento) da polimerase na replicação ou reparo do DNA como os principais eventos mutacionais que conferem polimorfismos nos microssatélites. Oliveira et al. (2006) fornece uma ampla abordagem sobre este assunto.

2.6 ESTUDOS MOLECULARES em *Vigna unguiculata*

Diversos marcadores tem contribuído para a caracterização de germoplasma, em programas de melhoramento genético, bem como no entendimento das relações filogenéticas de *V. unguiculata* (SPIAGGIA et al., 2009; SAWADOGO et al., 2010; VIJAYKUMAR et al., 2010).

Várias espécies do gênero *Vigna* tiveram a caracterização da diversidades genética estima por marcadores SSRs, cintando-se a *V. unguiculata* (BADIANE et al., 2012), *V. radiata* (SANGIRI et al., 2007; GWAG et al., 2010), *V. angularis* (XU et al., 2008), *V. subterranea* (SOMTA et al., 2011) e *V. mungo* (BINYAMIM et al., 2011).

Em *V. unguiculata*, Li et al. (2001) detectaram marcadores do tipo microssatélite utilizando 44 pares de primers desenvolvidos a partir de bibliotecas enriquecidas. No estudo, os autores detectaram uma baixa variabilidade genética nas 90 linhagens analisados.

A partir de base de dados de domínio público, Gupta e Gopalakrishna (2010) desenvolveram marcadores SSR baseados em unigene de feijão-caupi. Os autores verificaram em 20 acessos um valor médio de PIC (conteúdo de informação polimórfica, do inglês *Polymorphism Information Content*) de 0,53, sendo considerado informativo.

Xu et al. (2010) desenvolveram 600 marcadores genômicos derivados de sequências depositadas no *Cowpea Gene Space. Sequence, GSS – Knowledge Base* e 410 derivados de sequências EST. Tais autores analisaram a transferibilidade para a subespécie *V. unguiculata sesquipedalis* e a separação genética entre as duas subespécies. Marcadores foram mapeados em *V. unguiculata* ssp. *sesquipedalis* e podem ser utilizados em estudos comparativos com outras espécies do gênero *Vigna* (XU et al., 2011).

Diversidade genética e relações filogenéticas entre 252 acessos de feijão-caupi, coletados nas seis regiões geográficas do Sudão foram avaliados usando marcadores moleculares SSR. Os 18 marcadores utilizados separam os acessos em três grupos e identificaram diversidade genética média de 0,60 (ALI et al., 2015).

Outro estudo relacionado a diversidade genética do feijão-caupi foi conduzido por Wamalwa et al. (2016) em acessos do banco de germoplasma do Quênia. Os dois marcadores utilizados foram capazes de detectar alta divergência entre os acessos da Etiópia e da Austrália e os do oeste do Quênia.

Chen et al. (2017a) desenvolveram, em feijão-caupi, um total de 200 marcadores SSRs gênicos e 100 genômicos a partir de sequências de unigenes e genômicas, respectivamente. Dentre eles, 27 marcadores gênicos e 27 genômicos SSR foram polimórficos e foram utilizados para avaliação da diversidade genética e estrutura populacional em 105 acessos selecionados. Tais marcadores foram destacados como recursos valiosos para a avaliação da diversidade genética, estrutura populacional, avaliação de acessos de germoplasma, construção de mapas genéticos, identificação de genes de interesse e aplicação de seleção assistida por marcadores em programas no melhoramento de feijão-caupi.

Uma et al. (2016) utilizaram 92 marcadores microssatélites para marcar genes que controlam a ferrugem em feijão-caupi, afim acelerar a seleção de genótipos tolerantes a essa doença. Um genótipo de alta produtividade, mas sensível a ferrugem (C-152) foi cruzados com um genótipo menos produtivo e resistente a ferrugem (IC202778). Os resultados dos segregantes F2 mostraram que três marcadores foram associados à resistência à ferrugem.

Marcadores SSRs também foram associados mancha foliar de *Cercospora* em populações segregantes F2 de feijão-caupi (OMOIGUI et al., 2019).

Um estudo relacionado a transcriptoma foi realizado por Chen et al. (2017b). De um conjunto aleatório de 500 marcadores, os autores validaram 54 marcadores EST-SSR polimórficos entre 32 acessos de feijão-caupi. O estudo de transcritos tem revelado muitas informações de associação genica com atributos de interesse, como tolerância ao sal (PAN et al., 2019; ZHANG et al., 2021) e tolerância ao frio (TAN et al., 2016).

Essas pesquisas evidenciaram os recentes avanços dos estudos moleculares em *V. unguiculata*. No entanto, a caracterização da diversidade genética ainda é necessária para ampliar o conhecimento, bem como para auxiliar nos avanços do programa de melhoramento de feijão-caupi. Essa necessidade é ainda mais eminente nas variedades tradicionais do Estado do Acre, cujo perfil genético molecular ainda permanece totalmente desconhecido.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

O trabalho foi conduzido na Universidade Federal do Acre e no Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos. Utilizou-se 53 amostras (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 graus centígrados. A solicitação para visitas e coletas a produtores foi registrada no Sisbio (n.34945-1). As informações dos genótipos estão descritas na Tabela 1.

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

Tabela 1 - Continuação

Identificação	Genótipos	Origem
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)

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. A irrigação foi feita diariamente, sempre no período da manhã e a limpeza de plantas invasoras foi feita manualmente.

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Para a extração do DNA foram coletadas folhas jovens de plantas com 21 dias após a semeadura, as quais foram acondicionadas em envelopes de alumínio e armazenadas em freezer a -20 °C.

A extração de DNA genômico das folhas foi feita conforme descrito em Ferreira e Grattapaglia (1998), com modificações. Foram utilizados 30 mg de fragmento foliar de cada genótipo. Os fragmentos foliares foram macerados em cadinho com nitrogênio líquido e transferidos para tubos de polipropileno de 1,5 mL. Foram adicionados 700 µL de tampão de extração (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 0,2% 2- mercapetanol, 20mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, 1% PVP-40), homogeneizados e colocados em banho-maria a 65° C por trinta minutos, com agitações suaves a cada dez minutos. Após a incubação, foram adicionados 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e homogeneizados. Os materiais foram centrifugados (13.000 rpm) durante 15 minutos para que a fase aquosa fosse transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 400 µL de isopropanol gelado, reservar por 3 min em freezer, e centrifugar a (13.000 rpm) por 10 a 15 minutos, para formar o pellet (massa densa precipitada no fundo do microtubo) e retirar o máximo de isopropanol. O precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70%, adicionando-se 300 µL do álcool, agitando cada tubo suavemente até o precipitado soltar-se do tubo para que pudesse ser lavado e centrifugado novamente. Em seguida foi realizado outra lavagem com etanol absoluto frio 300 uL e centrifugado a 13 rpm por 2 minutos. Os tubos foram deixados abertos, à temperatura ambiente, para secar e logo após foram ressuspensos em 40 µL TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA e 10 ug/mL de RNase).

3.3 QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO DNA EXTRAÍDO

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.

5.4 ANÁLISES DOS LOCOS MICROSSATELITES

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:CTTTACCTTTATGCAAACCAATTC	55 °C	Timko (2013)
VM 10	F:TCCCACTCACTAAAATAACCAACC 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.

5.5 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 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. A partir da matriz, procedeu-se o agrupamento pelos métodos de Tocher (RAO, 1974) e Tocher modificado (sequencial) proposto por Vasconcelos et. al. (2007). Também realizaram-se agrupamento UPGMA e dispersão gráfica para melhor entendimento.

4 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 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 (Figura 1 e Tabela 3).

Em ambos os métodos, verificou-se que 37 grupos foram formados por um 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.

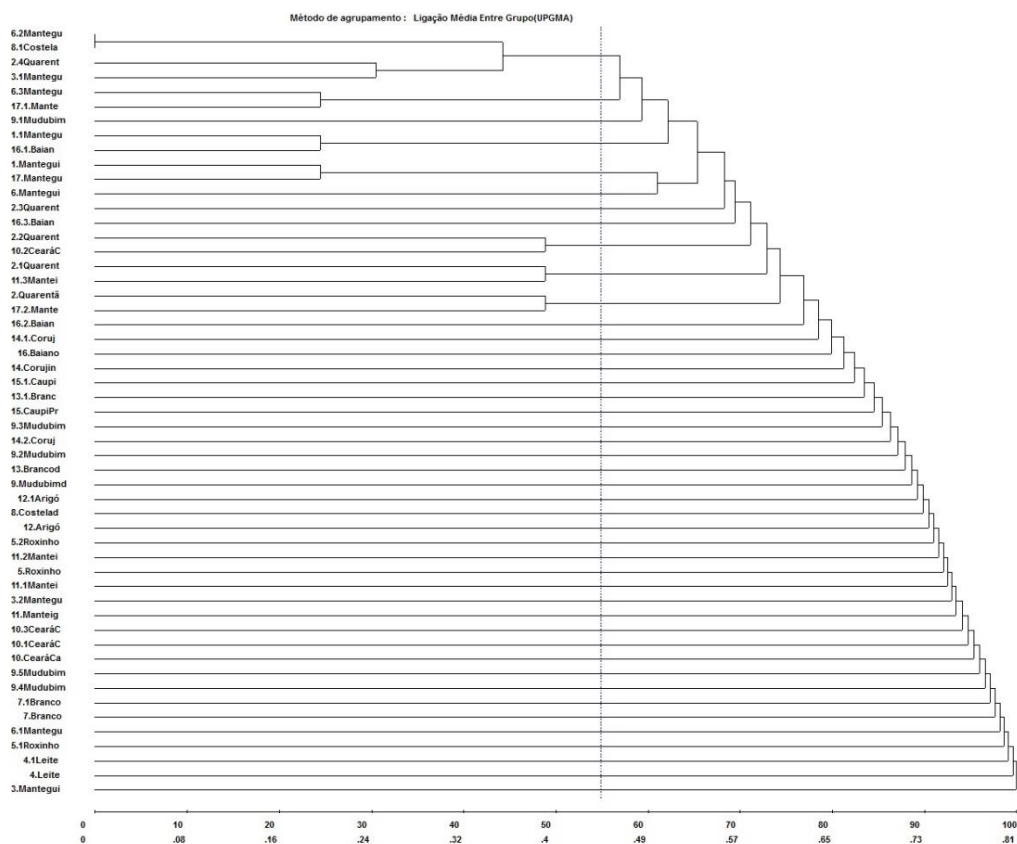


Figura 1 - Dendrograma gerado pelo método UPGMA, representando a dissimilaridade genética entre 53 genótipos de feijão-caupi, com base na similaridade de jaccard.

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

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 consistente 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; NG, 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) e, portanto, elevados níveis de variabilidade, como os verificados neste estudo, são passíveis de ocorrer.

Os grupos que alocaram dois ou mais indivíduos são considerados homogêneos entre si e heterogêneo 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). Neste sentido, a utilização de ferramentas para identificar redundâncias no momento da incorporação de novos genótipos em uma coleção é fundamental.

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.

Pelo método de agrupamento de Tocher, baseado na similaridade de jaccard, os 53 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).

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

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, pois conforme Vasconcelos et al. (2007), o método de otimização Tocher reuni muitos 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 distancias 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 e as distâncias entre eles, sendo estes acessos de diferentes procedências e altamente divergentes (VENDRAMINI et al., 2011). No entanto, mesmo apresentado 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, afim 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 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 Manteguiinha Vermelho (1), Manteguiinha Roxo (3,1), Manteguiinha (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.

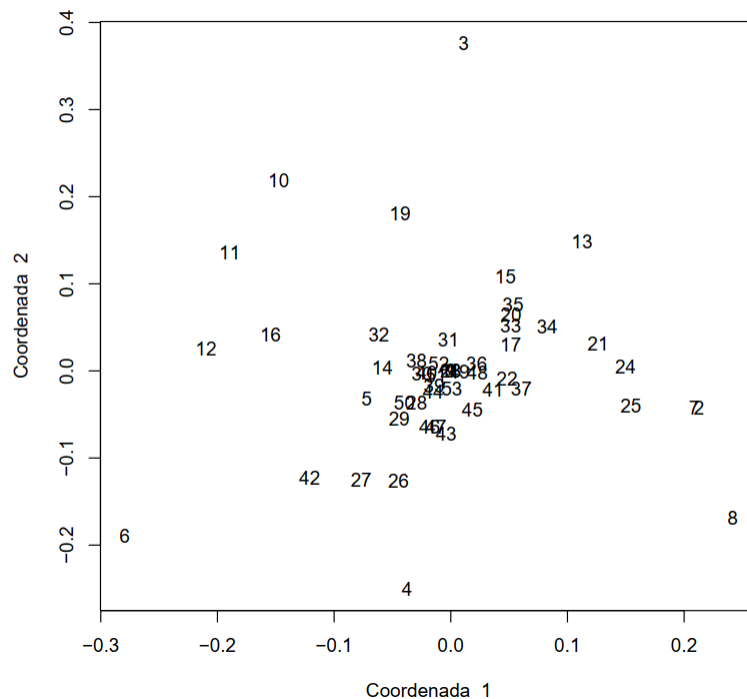


Figura 2 - Dispersão gráfica entre os 53 genótipos de feijão-caupi reveladas pela análise de coordenadas principais, com base na similaridade de jaccard.

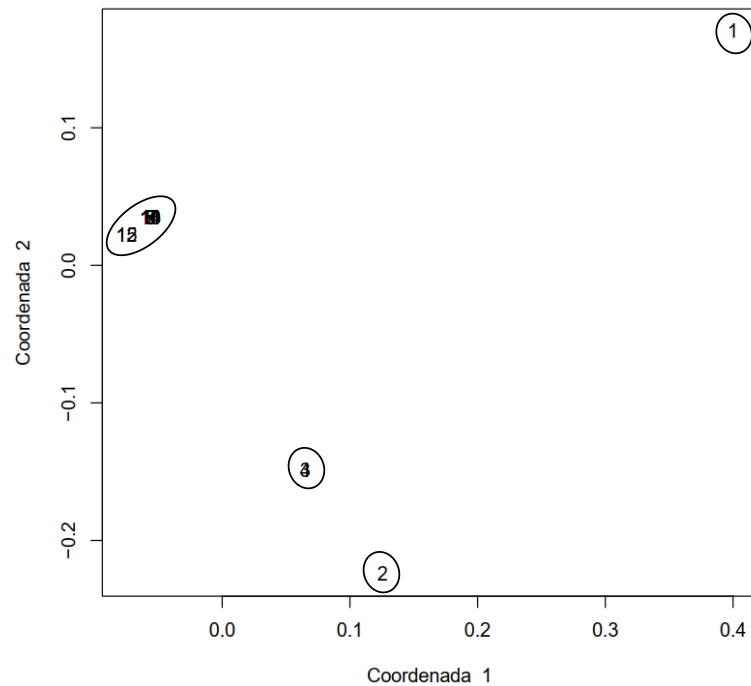


Figura 3 - Dispersão gráfica das 15 populações de feijão-caupi identificadas pelo método de otimização de Tocher, com base na similaridade de jaccard.

Em feijão-caupi a variação molecular já foi explicada por coordenadas principais. Chen et 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 coordena 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.

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 que

encontrados dentro de grupos diferentes, os quais apresentam grande distância genética (BORÉM; MIRANDA, 2013).

5 CONCLUSÕES

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 BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- ALMEIDA, A. L. G.; ALCÂNTARA, R. M. C. M.; NÓBREGA, R. S. A.; NÓBREGA, J. C. A.; LEITE, L. F. C.; SILVA J. A. L. Produtividade do feijão-caupi cv. BR 17 Gurguéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.5, n.3, p.364-369, 2010.
- ALMEIDA, P.; CORDEIRO, A. **Semente da paixão: estratégia comunitária de conservação de variedades locais no semi-árido**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 2002. 72 p.
- ARAÚJO, J. P. P. de.; RIOS, G. P.; WATT, E. E.; NEVES, B. P. das; FAGERIA, N. K.; OLIVEIRA, P. de; GUMARÃES, C. M.; SILVEIRA FILHO, A. **Cultura do caupi, *Vigna unguiculata* (L) Walp., descrições e recomendações de cultivo**. Goiânia: EMBRAPA/CNPAF, 1984. 82 p. (Circular técnica, 18).
- 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 Paranã River valleys of Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, p. gmr.15038601, 2016.
- BADIANE, F. A.; DIOUF, M.; DIOUF, D. Cowpea. In: SINGH, M.; BISHT, I. S.; DUTTA, M. **Broadening the genetic base of grain legumes**. India: Springer India, 2014. p. 95-114.
- BADIANE, F. A.; GOWDA, B. A.; CISSÉ, N.; DIOUF, D.; SADIO, O.; TIMKO, M. P. Genetic relationship of cowpea (*Vigna unguiculata*) varieties from Senegal based on SSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 1, p. 292-304, 2012.
- 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.

BEYRA, A.; ARTILES, G. R. Revisión taxonômica de los gêneros Phaseolus y Vigna (Leguminosae – Papilionoideae) en Cuba. **Anales Del Jardín Botánico de Madrid**. v. 61, n.2, p.135-154. 2004.

BEZERRA, F. M. L.; SAUNDERS, L. C. U. Irrigação de dois cultivares de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) em três épocas de plantio sob dois níveis de irrigação no Vale do Curu. **Ciência Agrônômica**, v.23, n.112, p.39-44, 1992.

BINYAMIM, R.; KHAN, M. A.; KHAN, A. I.; AWAN, F. S.; KHAN, N. A. Molecular characterization of urdbean (*Vigna mungo*) germplasm related to resistance against urdbean leaf crinkle vírus. **Genetic and Molecular Research**, v.10, n.3, p.1681-1688, 2011.

BORÉM, A.; CAIXETA E. T., **Marcadores Moleculares**, Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2006, 374 p.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores Moleculares**. 2. ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 532 p.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Melhoramento de plantas**. 6. Ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2013.

BOTSTEIN, D., WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal Human Genetics**, v. 32, n. 3, p.314-331,1980.

BONETT, L. P.; SCHEWE, I.; SILVA, L. I. Variabilidade de *Colletotrichum lindemuthianum* em feijoeiro comum no oeste do Estado do Paraná. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 207-210, 2008.

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.

CABRAL, P. D. S.; SOARES, T. C. B.; LIMA, A. B. D. P.; ALVES, D. D. S.; NUNES, J. A. Diversidade genética de acessos de feijão comum por caracteres agrônômicos. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 42, n. 3, p. 898-905, 2011.

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, 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**. Minas gerais, 2011. 620p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 480 p.

DA CUNHA, S. D.; ALVES, A. J. D. A.; ARCANJO, A. J. M.; RIBEIRO, R. P. R.; DANTAS, M. R.; FINOTO, E. L.; SANTOS, M. P. H. Caracterização de plantas daninhas em área rotacionada de milho e feijão-caupi em plantio direto. **Scientia Agropecuária**, v. 9, n. 1, p. 7-15, 2013.

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 Agrônômica**, v.46, n. 3, p.563-572, 2015.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Ano internacional das leguminosas**. Disponível em: <<http://www.fao.org/portugal/ano-internacional-leguminosas/en/>>. Acesso em 28 jun. 2016.

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

FISSEHA, Z.; TESFAYE, 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.

FONSECA, J. R.; MARQUES, E. M. G.; VIEIRA, E. H. N.; da SILVA, H. T. Algumas características do germoplasma de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) coletado no Espírito Santo. **Ceres**, v. 54, n. 314, p.358-362, 2015.

FRANCO, M. C.; CASSINI, S. T. A.; OLIVEIRA, V. R.; TSAI, S. M. Caracterização da diversidade genética em feijão por meio de marcador RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 2, p.381-385, 2001.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S.; RODRIGUES, E. V. **Produção, melhoramento genético e potencialidades do feijão-caupi no brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 84 p.

FREIRE FILHO, F. R.; ROCHA, M. M.; RIBEIRO, V. Q.; LOPES, A. C. A. Adaptabilidade e estabilidade produtiva de feijão-caupi. **Ciência Rural**, v. 35, n 2, p.24-30, 2005.

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.

GRATTAPAGLIA, D. Aplicações operacionais de marcadores moleculares. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa: UFV, 2007. 175-200 p.

GRATTAPAGLIA, D. Marcadores moleculares em espécies florestais: Eucalyptus como modelo. In: NASS, L. L. et al. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. 967-1010 p.

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.

GUIMARÃES, W. N. R.; MARTINS, L. S. S.; SILVA, E. F.; FERRAZ, G. M. G.; OLIVEIRA, F. J. Caracterização morfológica e molecular de acessos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 37-45, 2007.

GUPTA, S. K.; GOPALAKRISHNA, T. Development of unigene-derived SSR markers in cowpea (*Vigna unguiculata*) and their transferability to other *Vigna* species. **Genome**, v. 53, n. 7, p. 508-523, 2010.

GWAG, J. G.; DIXIT, A.; PARK, Y. J.; MA, K. H.; KWON, S. J.; CHO, G. T.; LEE, G. A.; LEE, S. Y.; KANG, H. K.; LEE, S. H. Assessment of genetic diversity and population structure in mungbean. **Genes & Genomics**, v. 32, n. 4, p. 299-308, 2010.

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. **Plant Genome**, v. 6, n. 3, p. 1-8, 2013.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas. Censo Agropecuário. Disponível em: <https://www.sidra.ibge.gov.br/tabela/6783>>. Acesso em: 23 nov. 2021.

IGWE, D. O.; AFIUKWA, C. A.; UBI, B. E.; OGBU, K. I.; Ojuederie, O. B.; UDE, G. N. Assessment of genetic diversity in *Vigna unguiculata* L. (Walp) accessions using intersimple sequence repeat (ISSR) and start codon targeted (SCoT) polymorphic markers. *BioMed Central*, 2017.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, v. 314, p. 67-73, 1985.

JOLLIFFE, Ian T.; CADIMA, Jorge. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 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.

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

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American journal of human genetics*, v. 44, n. 3, p. 397, 1989.

LOPES, L. C. M. **Determinação das melhores condições de extrusão e caracterização de farinha de feijão para utilização como ingrediente de alimentos instantâneos.** 2010. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

McCOUCH, S. R. et al. Microsatellite markers in rice: Abundance, diversity and applications. In: Klush, G.S.; Bran, D.S.; Hardy, B. (Ed.). *Rice Genetics IV*. Manila: IRRI, 2001. 117-135 p.

MERCADO-RUARO, P.; DELGADO-SALINAS, A. Karyotypic studies on species of *Phaseolus* (Fabaceae: Phaseolinae). *American Journal of Botany*, v. 85, n. 1, p. 1-9, 1998.

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 (*Zea mays* 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.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites, **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

OLIVEIRA, M. S. P.; FERREIRA, D. F.; SANTOS, J. B. Divergência genética entre acessos de açaizeiro fundamentada em descritores morfoagronômicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 4, p. 501-506, 2007.

OMOIGUI, L. O.; ARREY, M. O.; DANMAIGONA, C. C.; EKERUO, G.; TIMKO, M. P. Inheritance of resistance to Cercospora leaf spot disease of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. **Euphytica**, v. 215, n. 5, p. 1-12, 2019.

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.

PAN, L.; YU, X.; SHAO, J.; LIU, Z.; GAO, T.; ZHENG, Y.; ZEN, C.; LIANG, C.; CHEN, C. Transcriptomic profiling and analysis of differentially expressed genes in asparagus bean (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) under salt stress. **PLoS One**, v. 14, n. 7, p. e0219799, 2019.

PASQUET, R. S. Cultivated cowpea (*Vigna unguiculata*): genetic organization and domestication. In: PICKERSGILL B.; LOCK, J. M. (Ed.) **Advances in Legume Systematics 8: Legumes of Economic Importance**, Royal Botanic Gardens, Kew, 1996. p. 101-108.

PEREIRA, H. S.; ALVARES, R. C.; MELO, L. C.; COSTA, A. F.; CARVALHO, H. W. L. Culinary and nutritional quality of common bean lines with Carioca grain type and interaction with environments. **Revista Ceres**, v. 64, n. 1, p. 159-166, 2017.

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 caiua. **Journal of Agronomic Sciences**, v. 5, n. 1, p. 83-96, 2016.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. A comparison for germoplasm analysis. **Molecular Breeding**, v.2, n. 3, p. 225-238, 1996.

RAFALSKI, A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 2, p. 94-100. 2002.

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

RAMALHO, M; ABREU, Â. F. B. OBTENÇÃO DE CULTIVARES. In: CARNEIRO, José Eustáquio; JÚNIOR, Trazilbo José de Paula; BÓREM, Aluízio. **Feijão: do plantio à colheita**. Viçosa, MG. Universidade Federal, 2015. p. 96-111

RAO, C. R. **Advanced Statistical Methods in Biometric Research**. New York, NY: John Wiley Sons. 1970.

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.

SALVADOR, C. A. Feijão - análise da conjuntura agropecuária. Curitiba: DER/SAA, 2014.
SANGIRI, C.; KAGA, A.; TOMOOKA, N.; VAUGHAN, D.; SRINIVES, P. Genetic diversity of the mungbean (*Vigna radiata*, Leguminosae) genepool on the basis of microsatellite analysis. **Australian Journal of Botany**, v. 55, n. 8, p. 837-847, 2007.

SANTANA, A. V.; HEINEMANN, A. B.; STONE, L. F.; NASCENTE, A.S. Índice de refletância na estimativa da área foliar e biomassa das folhas em feijão comum. **Colloquium Agrariae**, Piracicaba, v.12, n.1, p.07-19, 2016.

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.

SAWADOGO, M.; OUÉDRAOGO, J. T.; GOWDA, B. S.; TIMKO, M. P Genetic diversity of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) cultivars in Burkina Faso resistant to *Striga gesnerioides*. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 48, p. 8146-8153, 2010.

SCHLÖTTERER C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA, **Chromosoma**, v. 109, p. 365-371, 2000.

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.

SNAK, C.; MIOTTO, S. T. S.; GOLDENBERG, R. Phaseolinae (Leguminosae, Papilionoideae, Phaseoleae) no estado do Paraná, Brasil. **Rodriguésia**, v. 62, n. 3, p. 695-716, 2011.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v. 11, n. 2, p. 30-40. 1962.

SOMTA, P.; CHANKAEW, S.; RUNGNOI, O.; SRINIVES, P. Genetic diversity of the Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.) as assessed by SSR markers. **Genome**, v. 54, n. 11, p. 898-910, 2011.

SOUSA, J. L. M. **Seleção de genótipos de feijão-caupi em condições de sequeiro e irrigado para o mercado de vagens e grãos verdes**. 2013. 63 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.

SOUSA, 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.

SPIAGGIA, F.; CARVALHO, R.; BENKO-ISEPPON, A.M. Preliminary Molecular Characterization of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Accessions by DAF (DNA Amplification Fingerprinting). **Gene Conserve**, v.8, n.34, p.818-828, 2009.

SUSO, M.; BEBELI, P.; PALMER, R. Reproductive Biology of Grain Legumes. In: DE RON, A. **Grain Legumes. Handbook of Plant Breeding**. New York: NY, 2015. v.10, p.365-399.

TAKEZAKI, N. Evolution of Microsatellites, **Encyclopedia of life Sciences**, p. 1-6, 2010.

TAN, H.; HUANG, H.; TIE, M.; TANG, Y.; LAI, Y.; LI, H. Transcriptome profiling of two asparagus bean (*Vigna Unguiculata* subsp. *sesquipedalis*) cultivars differing in chilling tolerance under cold stress. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0151105, 2016.

TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J. O uso de marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 1, p. 1- 5, 2013.

TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome research**, v. 10, n. 7, p. 967-981, 2000.

UMA, M. S.; HEGDE, N.; HITTALMANI, S. Identification of SSR marker associated with rust resistance in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) using bulk segregant analysis. **Legume Research-An International Journal**, v. 39, n. 1, p. 39-42, 2016.

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 Agrônômica**, v. 42, n. 4, p. 906-913, 2011.

VIEIRA, R. F.; NISHIHARA, M. K. Comportamento de cultivares de mungo-verde (*Vigna radiata*) em Viçosa, Minas Gerais. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 39, n. 221, p. 60-83, 1992.

VIJAYKUMAR, A.; SAINI, A.; JAWALI, N. Phylogenetic Analysis of Subgenus *Vigna* Species Using Nuclear Ribosomal RNA ITS: Evidence of Hybridization among *Vigna unguiculata* Subspecies. **Journal of Heredity**, v. 101, n 2, p. 177-188, 2010.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. V. D.; HORNES, M., FRITERS, A.; POTE, J.; PALEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p. 4.407-4.414. 1995.

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.

XU, H. X.; TOMOOKA, N.; KAGA, A.; ISEMURA, T.; VAUGHAN, D. A. Genetic diversity of the azuki bean (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi) gene pool as assessed by SSR markers. **Genome**, v. 51, n. 9, p. 728-738, 2008.

XU, P.; WU, X.; WANG, B.; LIU, Y.; EHLERS, J. D.; CLOSE, T. J.; ROBERTS, P. A.; NDEYENDACK, D.; QIN, D.; HU, T.; LU, Z.; LI, G. A. SNP and SSR based genetic map of asparagus bean (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedialis*) and comparison with the broader species. **PLoS ONE**, v.6, n.1, 2011.

XU, P.; WU, X.; WANG, B.; LIU, Y.; QIN, D.; EHLERS, J. D.; CLOSE, T. J.; HU, T.; LU, Z.; LI, G. Development and polymorphism of *Vigna unguiculata* ssp. *unguiculata* microsatellite markers used for phylogenetic analysis in asparagus bean (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedialis* (L.) Verdc.). **Molecular Breeding**, v.25, n.4, p.675-684, 2010.

ZHANG, H.; XU, W.; CHEN, H.; CHEN, J.; LIU, X.; CHEN, X.; YANG, S. Transcriptomic analysis of salt tolerance-associated genes and diversity analysis using indel markers in yardlong bean (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedialis*). **BMC Genomic Data**, v. 22, n. 1, p. 1-15, 2021.

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