

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE ESPÉCIES DOS
GÊNEROS *PHASEOLUS* E *VIGNA* POR MEIO DA TÉCNICA
DO DNA POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AO ACASO.**

Kleber Simônio Parreira

Monografia apresentada à
Coordenação do curso de
Ciências Biológicas para a
obtenção do grau de Bacharel
em Ciências Biológicas.

Uberlândia-MG
Dezembro/1996

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE ESPÉCIES DOS
GÊNEROS *PHASEOLUS* E *VIGNA* POR MEIO DA TÉCNICA
DO DNA POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AO ACASO.**

Kleber Simônio Parreira

**Luiz Ricardo Goulart Filho
(Orientador)**

Monografia apresentada à
Coordenação do curso de
Ciências Biológicas para a
obtenção do grau de Bacharel
em Ciências Biológicas.

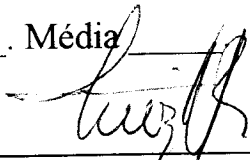
Uberlândia-MG
Dezembro/1996

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE ESPÉCIES DOS GÊNEROS
PHASEOLUS E VIGNA POR MEIO DA TÉCNICA DO DNA POLIMÓRFICO
AMPLIFICADO AO ACASO.

KLEBER SIMÔNIO PARREIRA

Aprovada pela comissão em ____/____/____. Média



Luiz Ricardo Goulart Filho
(Orientador)

Maria Inês H. Brandeburgo
(Conselheiro)

Malcon A. Manfredi Brandeburgo
(Conselheiro)

Nora Ney Santos Barcelos
(Coordenadora do Curso)

Uberlândia-MG
Dezembro/1996

***Dedico a meus
pais, Nilton e
Antônia, pelo
heróico ato de me
concederem a
vida.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Luiz Ricardo Goulart Filho pela oportunidade e pela orientação no desenvolvimento desse trabalho. Agradeço ao amigo e companheiro Juarez, que esteve sempre presente em todas as dificuldades. Um abraço carinhoso aos amigos Waldesse, Renata, Irmão, Júnior, Elaine, Daniel e Lucy por termos seguidos junto o mesmo caminho durante todo esse tempo.

E por fim, um agradecimento especial aos amigos que encontrei no laboratório, Christiane, Gismar, Warlei, César, Maurício, Robson, Cristina, Eduardo, Wânia, Juliana, Marta, Marcelo, Terezinha, Adailton, Vivian, Adelmo e Syomara, pela força que me deram.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	3
REVISÃO DE LITERATURA	4
MATERIAL E MÉTODOS	18
Material Biológico	18
Extração do DNA	18
Reações da PCR	20
Eletroforese e Coloração	21
Análise dos Dados e Construção do Fenograma	22
RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
Extração do DNA	24
Reações da PCR	25
Análise de Cluster	28
CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

INTRODUÇÃO

O feijão é uma planta alimentícia consumida em muitos países. Como é uma planta autógama, o feijão apresenta uma pequena variabilidade mesmo possuindo uma base genética ampla. A análise das distâncias genéticas entre as espécies pode auxiliar no melhoramento dessa cultura, pois ela fornece informações a respeito da possibilidade de ocorrência de cruzamentos interespecíficos.

As distâncias genéticas têm sido deduzidas diretamente do DNA genômico das plantas. Técnicas em genética molecular, tais como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplification Fragments Length Polymorphisms), Lys-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphisms), foram criadas após a

invenção da Cadeia de Reações da Polimerase (PCR). A PCR é uma série de reações que levam à produção de fragmentos de DNA específicos e, em alguns casos, aleatórios tendo como modelo as fitas de um DNA alvo.

Esse trabalho foi realizado com a intenção de estimar as distâncias genéticas entre as quatro espécies de feijão, *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus acutifolius*, *Vigna angularis* e *Vigna unguiculata*, por meio da técnica molecular denominada RAPD.

As distâncias genéticas deduzidas demonstraram que as duas espécies do gênero *Phaseolus* estão pouco distanciadas uma da outra, enquanto que as do gênero *Vigna* estão moderadamente distantes. A técnica também foi avaliada quanto à sua confiabilidade e segurança, e mostrou-se relativamente eficiente, mesmo sendo testada em condições restritas. O fenograma gerado agrupou os gêneros em clusters distintos como era esperado, aumentando assim a credibilidade da técnica para o uso no melhoramento do feijão.

OBJETIVOS

Determinar a divergência genética entre as quatro espécies de feijão *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus acutifolius*, *Vigna unguiculata* e *Vigna angularis*, além de avaliar o uso de marcadores moleculares do tipo RAPD em sistemática botânica.

REVISÃO DA LITERATURA

Os gêneros *Phaseolus* e *Vigna* compreendem um número grande de espécies popularmente denominadas de feijão. Entre as espécies que constituem o gênero *Phaseolus*, a mais importante é o “feijão comum” ou *Phaseolus vulgaris* L. devido ao seu potencial como planta alimentícia. Outra espécie cultivada que faz parte do gênero é o *Phaseolus acutifolius*, também chamado de “feijão tepari”. O *P. acutifolius* é bem adaptado a áreas quentes e secas. Daí sua importância como fonte de genes resistentes ao estresse hídrico em programas de melhoramento do feijoeiro.

O centro de origem do *Phaseolus* ainda é incerto, embora existam algumas teorias que procuram explicar a origem americana do gênero. Achados arqueológicos do México e Peru apontam para três possíveis hipóteses: (a) a de

um centro de origem difuso, formado por dois centros primários independentes na América Central e América do Sul (KAPLAN, 1981); (b) de um centro único de origem Sul-americano, partindo do pressuposto que o *Phaseolus* tenha sido transportado da América do Sul ao México e Guatemala após domesticação (BERGLUND-BRUCHER & BRUCHER, 1976); (c) e de um centro Centro-americano que parece ser a menos provável (KAPLAN *et al*, 1973; KAPLAN, 1981). A hipótese de origem Sul-americana é a mais aceita atualmente.

O gênero *Vigna* engloba um número de 160 espécies aproximadamente. A espécie *Vigna unguiculata*, comumente denominada de “feijão caupi”, tem seu centro de origem situado no continente africano. A hipótese do centro de origem africano é reforçada pelo fato de nenhum outro exemplar selvagem do gênero ter sido encontrado fora da África (STEELE & MEHRA, 1980). A espécie *V. unguiculata* tem um conjunto genético muito rico.

A espécie *Vigna angularis* faz parte de um grupo que recebeu o nome de “Adzuki”, popularmente subdividido do gênero *Vigna* a partir de algumas características morfológicas (THAVARASOOK *et al*, 1991). O sudeste da Ásia é o centro de origem da *V. angularis* mais aceito. O grupo Adzuki distribuiu-se principalmente no leste asiático, em países como Japão, Tailândia e China (TOMOOKA *et al*, 1991). As espécies selvagens do gênero *Vigna* apresentam

ampla diversidade genética que, em termos de características agronômicas, envolve resistência a pragas e doenças, crescimento rápido, boa adaptação ambiental, alta produtividade, entre outras (PRESCOTT-ALLEN & PRESCOTT-ALLEN, 1988).

Os fenômenos evolutivos vêm sendo, durante muito tempo, investigados por meio de caracteres morfológicos, fisiológicos, biogeográficos, ecológicos e comportamentais. Essas investigações têm como objetivo principal fornecer dados para estudos de sistemática e dedução filogenética.

Todas as características são geneticamente mediadas. Portanto, os dados destinados à inferência filogenética refletem informações genômicas. Partindo desse pressuposto, uma história evolutiva é sinônimo de eventos sucessivos de mutações em qualquer linhagem genômica. Essa visão fornece sustentação para análises e comparações de tipos de dados moleculares (SWOFFORD, 1990).

Os dados moleculares tornaram-se ferramentas poderosas para a identificação de unidades sistemáticas e para estudar parentescos entre extensos grupos de taxons. A sistemática visa identificar unidades sistemáticas, enquanto que a filogenética tem como objetivo deduzir relações evolutivas entre essas unidades. Os dados acessados do DNA tornaram-se disponíveis a partir da

hibridização e da análise dos fragmentos de restrição bem antes do sequenciamento do DNA vir a ser considerada a aplicação mais popular das técnicas moleculares para filogenética (SCHIERWATER *et al.*, 1994).

O atributo de um organismo (ou taxon) usado para estabelecer sua relação com outros organismos, recebeu o nome de caracter. Dados moleculares, úteis à construção de árvores filogenéticas, se comportam como caracteres discretos ou similaridade (ou distância). Um valor de distância é uma comparação quantitativa entre espécies; especifica um parentesco entre pares de taxons.

À sistemática fenética interessa classificações baseadas em similaridades. Ela envolve todos os caracteres possíveis e um cálculo das distâncias médias onde os caracteres são igualmente úteis. Os valores de similaridade são frequentemente representados em uma escala de 1 a 0 (100% a 0%). A distância é definida por $1 - S$, onde S é a similaridade.

Uma vez reunidos e transformados em valores apropriados, os dados devem ser analisados por algum dos métodos disponíveis de estimativa filogenética. Um número grande de modelos matemáticos têm sido aplicados com a finalidade de transformar dados moleculares em distâncias genéticas.

A matriz de distâncias contém os valores necessários ao agrupamento da taxa em estudo. A metodologia usada para agrupar unidades fenéticas chama-se Análise de Cluster. A análise de cluster é uma família de técnicas de agrupamento, eficientes para representar valores de distância em árvores ultramétricas. Entre os vários métodos de agregação em clusters, o mais amplamente empregado recebeu o nome de UPGMA (Unweighted Pair - Group Method using an Arithmetic average).

O UPGMA constrói o fenograma pela ligação do par de taxons menos distante, seguida do taxon imediatamente mais distante. Quando dois grupos são ligados, eles perdem sua identidade individual e passam a ser referidos como um único cluster. Como cada taxon constitui seu próprio cluster, dois clusters são unidos em um só e o número de clusters inicial diminui em 1. O processo finaliza quando os dois últimos são agrupados em um cluster constituído de todos os taxons inicialmente individuais (SWOFFORD & OLSEN, 1990; HOY, 1994).

O método envolve uma série de passos descritos a seguir. A matriz de distâncias une os clusters (taxons) i e j , tal que d_{ij} seja a distância mínima na tabela. O comprimento do ramo entre i e j é definido por $d_{ij} / 2$. Se i e j forem os dois últimos clusters, então a árvore estará completa. Caso contrário, um novo

cluster, u , será criado. A distância de u a cada um dos demais clusters (k , com $k \neq i$ ou j) é definida pelo produto de d_{ki} e d_{kj} e suas taxas T_i e T_j respectivamente, dividido pela somatória das taxas T_i e T_j . Assim os clusters i e j serão eliminados, e o cluster u adicionado. A cada u que se forma, o número de clusters iniciais decresce até que

$$d_{ku} = (T_i d_{ki} + T_j d_{kj}) / (T_i + T_j)$$

todos os restantes sejam agrupados.

Hadrys *et al.* (1992) sugeriu o uso de técnicas de Amplificação Arbitrária do DNA (AAD) como um método novo para discutir questões em sistemática e filogenética a níveis taxonômicos baixos, por diversas razões: a produção de marcadores AAD (RAPD, DAF, AP-PCR) é altamente efetiva em termos de custos (relativamente baixos) e exigência de tempo, independe de alguma informação anterior do genoma sob investigação, e é viável com quantidades pequenas de DNA. Diversos estudos têm usado marcadores AAD com sucesso para identificar unidades taxonômicas, ou discutir temas em sistemática e filogenética dentro e entre espécies de parentesco próximo.

A utilidade dos marcadores DNA-diagnósticos é determinada em grande parte pela tecnologia que é usada para revelar polimorfismos diretamente

no DNA. Revelar polimorfismos diretamente no DNA se tornou realidade com o advento da tecnologia da Cadeia de Reações da Polimerase, ou simplesmente PCR.

A PCR é um método de síntese de ácido nucléico, *in vitro*, pelo qual um fragmento particular do DNA pode ser amplificado. Ele envolve dois primers de oligonucleotídeos que flanqueiam o fragmento de DNA a ser amplificado, em consonância com ciclos repetidos de desnaturação do DNA pelo calor, anelamento dos primers à sua sequência complementar e extensão dos primers anelados pela DNA polimerase. Esses primers se ligam (hibridização) às fitas opostas da sequência alvo (sequência de interesse no DNA template; exemplo geral, um gene) e são orientados de modo que a síntese do DNA pela polimerase se processa dentro da região entre os primers (Figura 1).

Os produtos amplificados são complementares entre si. Assim, sucessivos ciclos de amplificação duplicam a quantidade de DNA alvo sintetizada no ciclo anterior. Alguns parâmetros são de importância para expandir o processo de otimização da reação.

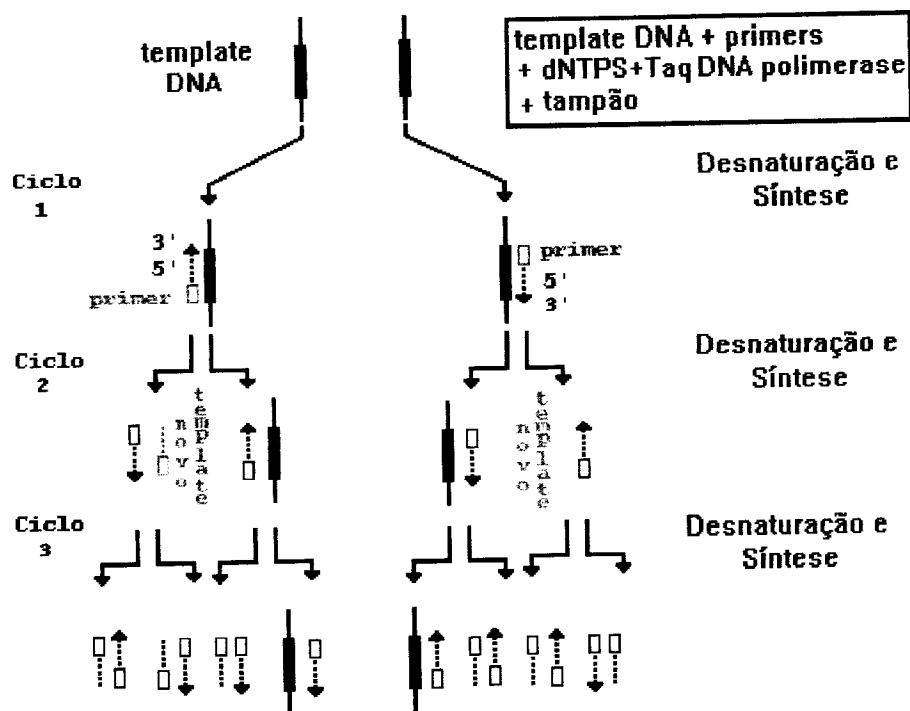


Figura 1. Esquema representativo do método padrão da PCR.

A faixa de concentração recomendada para a *Taq* DNA polimerase está entre 1 e 2,5 unidades por 100 μ l de reação. Entretanto, as exigências de enzima variam de acordo com as sequências alvo do template e primers. A solução estoque de dNTPs (desoxinucleotídeo trifosfato) deve ser diluída para uma concentração final de 20 a 200 μ M cada. Essa concentração resulta no balanço ótimo de rendimento, especificidade, e confiabilidade. Os dNTPs a 20 μ M cada em uma reação de 100 μ l é teoricamente suficiente para sintetizar 2,6 μ g de DNA alvo de 400 bp.

A concentração do íon magnésio pode afetar a maioria dos demais passos da reação, ou seja, temperatura de dissociação da dupla fita tanto do template quanto dos produtos da PCR, dimerização e anelamento dos primers, atividade da *Taq* DNA polimerase e especificidade dos produtos. As reações devem conter magnésio numa faixa de 2,0 a 2,5 mM sobre a concentração total de dNTP.

Outro parâmetro crítico da PCR é a concentração de primers. A faixa entre 0,1 e 0,5 μ M geralmente corresponde ao ótimo. Quantidades altas de primer acabam por resultar em acúmulo de produtos inespecíficos, além de gerar artefatos independentes do template conhecidos como dímeros de primers. Esses inconvenientes podem tirar a legitimidade das ampliações e, conseqüentemente, descaracterizar os dados.

Embora os aspectos descritos acima interfiram no rendimento e sucesso da tecnologia, eles não são os únicos responsáveis. Paralelamente, as condições de termociclagem contribuem intensamente para a conquista do resultado esperado. A mais provável causa de insucesso da PCR é a desnaturação incompleta do template. Condições típicas de desnaturação podem ser produzidas com 95°C durante 30 segundos, ou 97°C por 15 segundos. Entretanto,

temperaturas mais altas podem ser apropriadas de acordo com a quantidade de resíduos de G e C contidos na sequência alvo.

O comprimento, composição e concentração dos primers representam os requisitos básicos para a definição de suas temperaturas de anelamento. Para primers que possuem um grau de homologia baixo, ou seja, menor especificidade, e comprimento de 10 bp, temperaturas entre 35°C e 38°C são mais eficientes ao anelamento. Primers de maior comprimento e especificidade, exigem temperaturas de anelamento da ordem de 55°C a 72°C.

O tempo de extensão depende do comprimento e concentração do primer. Extensões clássicas são realizadas à temperatura de 72°C, porque essa temperatura foi considerada ótima para extensões de primers em um template modelo. O número de ciclos da reação depende principalmente da concentração do DNA alvo. Um procedimento padrão deve ser executado com 10^3 moléculas de DNA alvo em um programa termociclável de 35 a 40 ciclos (INNIS *et al.*, 1990).

As condições padrões descritas na literatura são cruciais para uma boa amplificação, porém os passos de otimização das reações levam a condições específicas para cada caso.

Com o passar dos anos, a tecnologia da PCR levou ao desenvolvimento de vários ensaios genéticos novos baseados na amplificação seletiva do DNA. Em 1990, um desses ensaios genéticos foi desenvolvido. Esse procedimento foi chamado de ensaio RAPD, ou DNA Polimórfico Amplificado Aleatoriamente, e é capaz de detectar polimorfismos de sequências nucleotídicas em um experimento fundamentado na amplificação do DNA usando somente um único primer de sequência nucleotídica arbitrária (WELSH & McCLELLAND, 1991).

Nessa reação, uma única espécie de primer se liga ao DNA genômico em dois sítios diferentes sobre as fitas opostas do DNA template. Se esses sítios estão delimitando uma região amplificável, um produto discreto do DNA é produzido através da amplificação termocíclica. A presença de cada produto da amplificação identifica a homologia completa ou parcial da sequência nucleotídica, entre o DNA genômico e o primer de oligonucleotídeos, em cada uma das extremidades do produto amplificado (Figura 2). Em média cada primer pode dirigir a amplificação de diversos *loci* discretos no genoma, fazendo do teste uma eficiente via de exibição de polimorfismo de sequência nucleotídica entre indivíduos. A principal vantagem desse ensaio é que ele não requer um conhecimento prévio da sequência do DNA. Pelo fato da técnica do RAPD ser

sustentada pela amplificação, somente quantidades em nanogramas de DNA são exigidas.

A área de pesquisa que mais tem demonstrado crescimento com respeito ao uso da tecnologia RAPD é a genética de população (HEDRICK, 1992). Os marcadores RAPD têm sido usados na criação de *fingerprintings* para o estudo de identidade individual e parentesco taxonômico tanto em organismos eucariontes quanto em procariontes (CAETANO-ANOLLÉS *et al.*, 1991). Uma importante questão é se as bandas do RAPD de peso molecular igual, que são distintas entre os indivíduos, são caracteres homólogos, ou seja, caracteres herdados a partir de um ancestral comum, ou se são homoplásticos, que foram gerados independentemente dentro da população. Parece provável que indivíduos de parentesco próximo podem co-herdar um estado distinto do caracter a partir de um ancestral comum, ao invés do improvável evento de aquisição independente do mesmo caracter.

Vários grupos de pesquisadores publicaram sobre a utilidade dos marcadores RAPD como fonte de informação filogenética. Hu e Quiros (1991) foram capazes de demonstrar que os produtos da amplificação com 4 primers aleatórios é suficiente para distinguir 14 cultivares diferentes de brócolis e 12 de

couve-flor (*Brassica oleracea* L.). Os marcadores RAPD fornecem uma tecnologia eficaz para a descoberta de caracteres polimórficos.

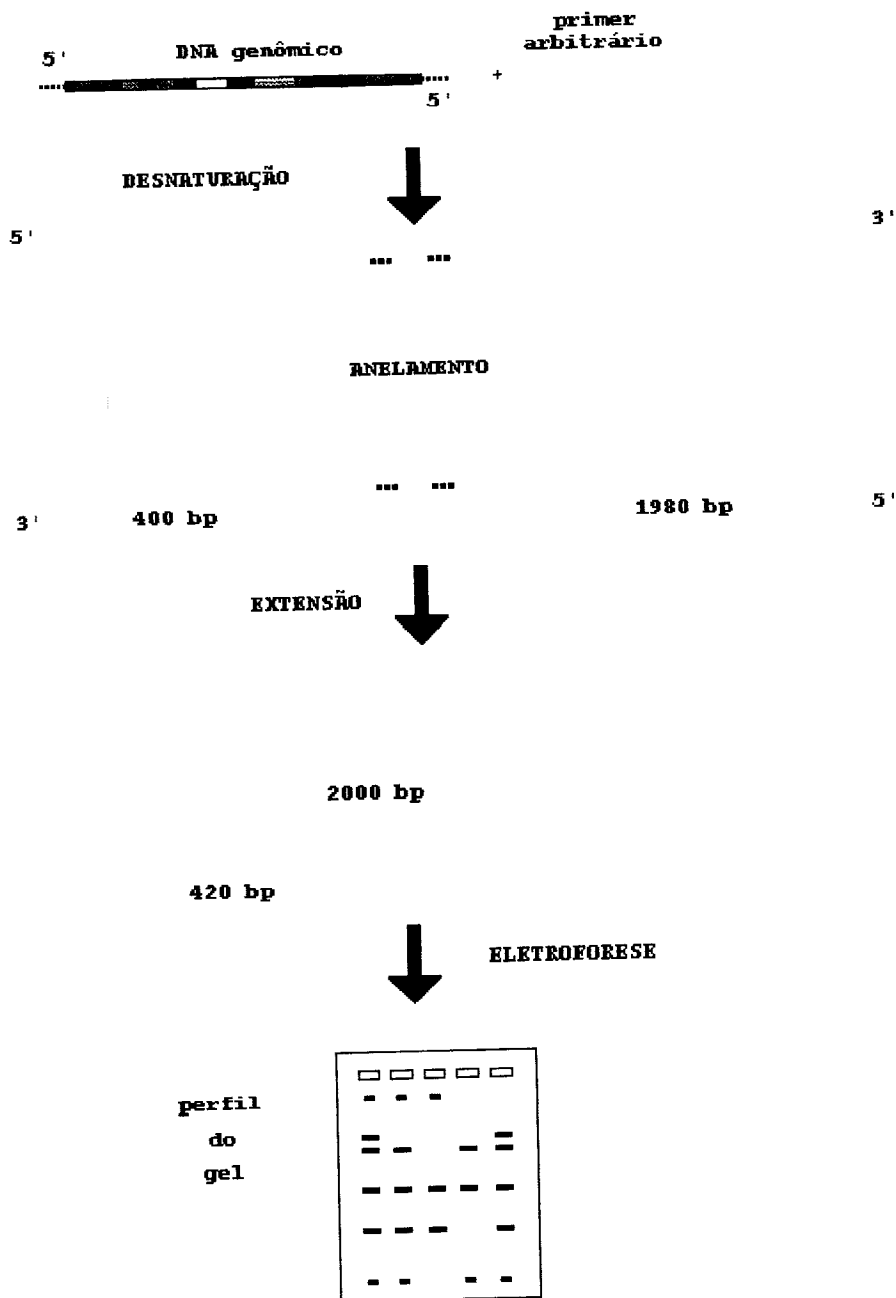


Figura 2. Esquema representativo da técnica do RAPD.

O processo desde a PCR até a confecção do fenograma pode ser resumido como no esquema da figura 3.

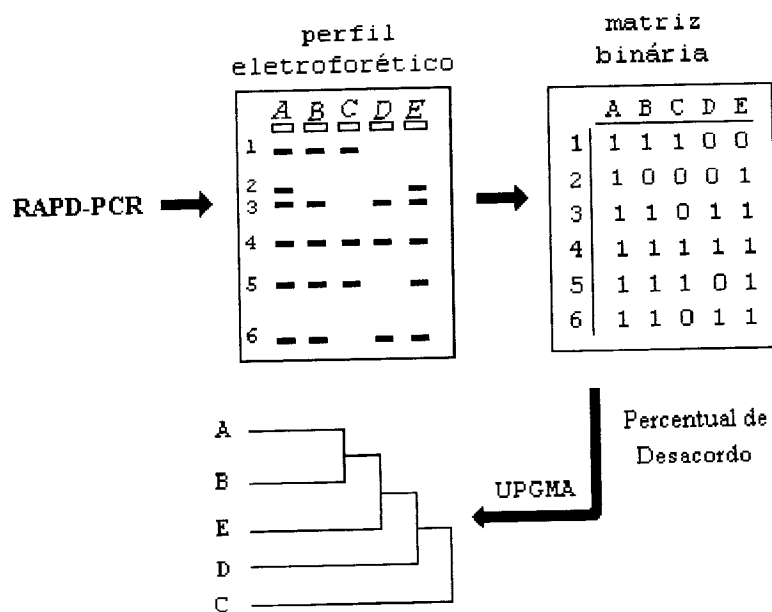


Figura 3. Esquema geral do método de determinação da distância genética entre taxons, a partir de dados moleculares.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado nas dependências do Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, durante o período de agosto/95 à setembro/96.

Material Biológico - As sementes foram gentilmente cedidas pelo Centro Nacional de Pesquisas de Arroz e Feijão (CENPAF-EMBRAPA). As sementes das espécies *Phaseolus acutifolius*, *Vigna angularis* e *Vigna unguiculata* são amostras de plantas consideradas selvagens. As amostras de *P. vulgaris* são sementes da cultivar “Overitos 32”, exemplar de plantas já domesticadas, mas pouco cultivadas. Portanto, muito próxima das selvagens.

Extração do DNA: O DNA das 4 espécies foi extraído pelo método descrito por Doyle & Doyle (1990) com pequenas modificações. O tecido fresco

das folhas foi colhido da planta jovem, e 30 mg (cada amostra) desse foi triturado em nitrogênio líquido até se tornar um pó fino. Cerca de 750 µl de tampão de extração [CTAB 2% (m/v), NaCl 1,4 M, 2-mercaptoetanol 0,2% (v/v), EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,0] pré-aquecido, foi adicionado aos tubos Eppendorf juntamente com a massa de tecido triturada e, sob agitação cuidadosa, aquecida por 1 hora a 60°C. As 4 amostras receberam 750 µl de clorofórmio-álcool isoamílico [24:1 (v/v)]. Após inversão gentil dos tubos durante 2 minutos, elas foram centrifugadas a 1.600 x g (\cong 4.000 rpm), à temperatura ambiente, por 15 minutos em uma microcentrífuga SANYO/MSE. Ao término da centrifugação, a fase aquosa de cada amostra foi removida e colocada em tubos novos limpos contendo 250 µl de isopropanol gelado. As soluções foram centrifugadas a 17.000 x g (\cong 12.000 rpm) por 15 minutos, e os peletes formados ressuspensos em 100 µl de tampão de lavagem (Etanol 76%, acetato de amônia 10 mM) durante 20 minutos. Cada tubo foi novamente centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos, e os peletes de DNA postos para secar à temperatura ambiente. Em seguida, foram ressuspensos em 200 µl de tampão TE [Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), EDTA 1 mM] contendo RNase A a uma concentração final de 10 µg/ml e incubados 30 minutos a 37°C. As amostras de DNA foram diluídas em uma relação de 10:1.000

µl (amostra de DNA/volume final) e lidas em um espectrofotômetro de luz ultravioleta GBC UV/VIS 911A a um comprimento de onda de 280 (proteínas) e 260 (DNA) nm (nanômetros). A quantificação foi realizada de acordo com a fórmula abaixo.

$$[\text{DNA}] (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \times f$$

onde, A_{260} é a absorvância em 260 nm, e f o fator de diluição. Nesse caso, o valor de f para as amostras foi igual a 1.000/10. As amostras foram avaliadas quanto à relação DNA/proteína (a faixa proporcional ótima está entre 1,6 e 2,0) pela fórmula DNA/proteína = A_{260}/A_{280} , e quanto à qualidade do DNA, por perfil eletroforético. A corrida em eletroforese foi realizada em gel de agarose à concentração de 0,8% {0,8 g de Agarose, 100 ml de tampão TBE 0,5 x [Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0)], 7,5 µl de brometo de etídio} em uma cuba Life Technologies Horizon 11.14 contendo tampão TBE 0,5 x durante 2 horas, com voltagem constante de 80 Volts. O perfil de bandagem do gel foi fotografado em um aparato cassete Fisher Scientific FB-PDC 34 sobre um transiluminador de UV SIGMA T2201.

Reações da PCR - Visando amplificar 24 reações (4 amostras por primer, com 3 repetições) da PCR com os primers GOU07 e GOU10 (Gibco BRL; ver sequências na tabela I), foram montadas as soluções Master Mix,

PrimerG07, PrimerG10, DNA_{Pacu}, DNA_{Pvul}, DNA_{Vung}, e DNA_{Vang}. O cálculo de diluição do DNA para amplificação foi feito por meio da fórmula $V_{DNA} (\mu\text{l}) = 0,5 \times A_{260}$, onde V_{DNA} é o volume da solução de DNA extraído a ser diluído em $V_{H_2O} (\mu\text{l}) = 500 - V_{DNA}$ e A_{260} , o valor da absorvância alcançada na leitura do DNA extraído. As reações foram realizadas de acordo com as concentrações das soluções apresentadas nas tabelas II e III, e volumes na tabela IV.

As amplificações foram realizadas em um termociclador MJ Research, Inc. PTC-100 com 1 ciclo inicial de 94°C durante 4 minutos para desnaturação do DNA; mais 44 ciclos de 94°C por 1 minuto, 35°C durante 1 minuto para anelamento dos primers, e 72°C por 2 minutos para extensão dos primers; e 1 ciclo de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Primer	Sequência (5' - 3')
GOU07	AACGCGGCACACATAGTTTT
GOU10	CTCGAACCTTCCCATTTC

Tabela I. Sequências nucleotídicas dos primers de oligonucleotídeos usados nas amplificações arbitrárias dos DNAs.

DNA (ng/ μl)	Primer (pmol/ μl)	dNTP (mM)	MgCl ₂ (mM)	Tampão (x)	Taq (U/ μl)
10	10	40	15	10	5

Tabela II. Concentrações das soluções estoque.

Eletrforese e Coloração - Aos tubos dos produtos amplificados foram adicionados 5 μl de Load Dye (Azul de Bromofenol, Xileno Cianol; Promega), e

25 µl de cada amostra foi corrido em gel de agarose 1,5% (1,5 g de agarose, 100 ml TBE 1 x) à voltagem constante de 120V em tampão TBE 1 x.

Espécie	Primer	Primer (pmol)	Taq (U)	dNTP (mM)	MgCl ₂ (mM)	Tampão	DNA (ng)
<i>V. ang</i>	GOU07	20	1,5	1,6	2	1,3x	20
	GOU10						
<i>V. ung</i>	GOU07	20	1,5	1,6	2	1,3x	20
	GOU10						
<i>P. Vul</i>	GOU07	20	1,5	1,6	2	1,3x	20
	GOU10						
<i>P. acu</i>	GOU07	20	1,5	1,6	2	1,3x	20
	GOU10						

Tabela III. Concentrações finais das soluções na reação da PCR. *Pvul* = *Phaseolus vulgaris*; *Pacu* = *Phaseolus acutifolius*; *Vang* = *Vigna angularis*; *Vung* = *Vigna unguiculata*.

Os géis foram corados pelo método de coloração com brometo de etídio. O brometo de etídio foi adicionado ao gel ainda líquido para uma concentração final de 0,5 µg por ml de gel.

Análise dos Dados e Construção do Fenograma - A análise dos dados e construção do fenograma foram realizados com o auxílio do programa de computador STATISTICA for Windows.

Espécie	Primer	Primer (μl)	DNA (μl)	dNTP (μl)	Taq (μl)	Tampão (μl)	H ₂ O (μl)
<i>Vang</i>	GOU07	2	2	1,8	0,3	5,85	33,05
	GOU07						
	GOU07						
	GOU10	2	2	1,8	0,3	5,85	33,05
	GOU10						
	GOU10						
<i>Vung</i>	GOU07	2	2	1,8	0,3	5,85	33,05
	GOU07						
	GOU07						
	GOU10	2	2	1,8	0,3	5,85	33,05
	GOU10						
	GOU10						
<i>Pacu</i>	GOU07	2	2	1,8	0,3	5,85	33,05
	GOU07						
	GOU07						
	GOU10	2	2	1,8	0,3	5,85	33,05
	GOU10						
	GOU10						
<i>Pvul</i>	GOU07	2	2	1,8	0,3	5,85	33,05
	GOU07						
	GOU07						
	GOU10	2	2	1,8	0,3	5,85	33,05
	GOU10						
	GOU10						
subΣ		48	48	43,2	4,8	140,4	795,6
10%		48	48	47,52	5,3	152,8	875,14
Σ							1080
Reação							

Tabela IV. Volume das soluções nas reações da PCR. *Pvul* = *Phaseolus vulgaris*; *Pacu* = *Phaseolus acutifolius*; *Vang* = *Vigna angularis*; *Vung* = *Vigna unguiculata*.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Extração do DNA - As amostras dos DNAs extraídas foram analisadas em gel de agarose 0,8% e o perfil eletroforético está representado na figura 4. De acordo com o perfil, podemos classificar as amostras dos DNAs como de boa qualidade para amplificação, embora uma pequena parcela tenha sido degradada pelas agitações exigidas durante a extração. A qualidade do DNA se comporta como fator importante para a repetibilidade das bandas geradas pela PCR. A tabela V mostra os valores referentes às extrações.

Espécie	A_{260}	A_{280}	DNA/Prot.	$1/A_{260}$
<i>Pvul</i>	0,090	0,179	2,0	5,6
<i>Pacu</i>	0,158	0,305	1,9	3,3
<i>Vang</i>	0,125	0,241	2,0	4,1
<i>Vung</i>	0,125	0,246	1,9	4,0

Tabela V. Valores referentes às amostras de DNA extraídas. *Pvul* = *Phaseolus vulgaris*; *Pacu* = *Phaseolus acutifolius*; *Vang* = *Vigna angularis*; *Vung* = *Vigna unguiculata*; A_{260} = Absorvância a 260 nm; A_{280} = Absorvância a 280 nm; DNA/Prot. = Relação de DNA por Proteínas.

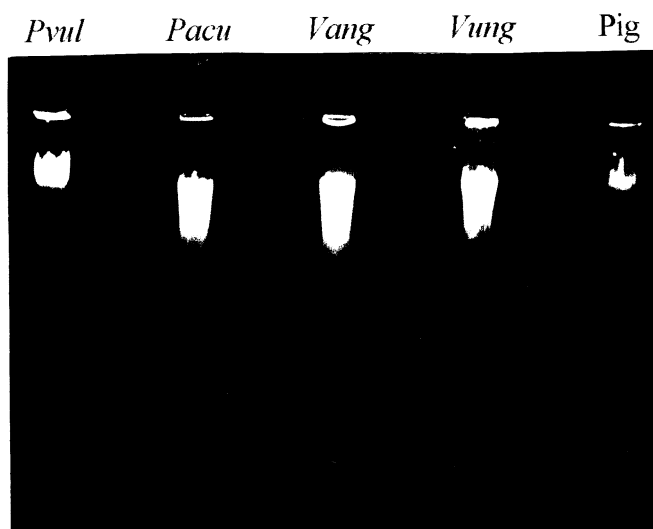


Figura 4. Perfil eletroforético das amostras dos DNAs genômicos. *Pig* = DNA genômico de suíno (Controle). *Pvul* = *Phaseolus vulgaris*; *Pacu* = *Phaseolus acutifolius*; *Vang* = *Vigna angularis*; *Vung* = *Vigna unguiculata*

Reações da PCR - As reações da PCR foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1.5%, e o perfil de bandas foi utilizado para construção da matriz binária. Cada locus amplificado foi referido de acordo com o peso molecular [em pares de base (bp)] estimado para as bandas em particular.

O primer GOU07 foi capaz de amplificar 16 locus, enquanto que o primer GOU10, 12 locus. As espécies foram avaliadas quanto a presença (1) ou ausência (0) dos 28 locus resultantes. Foram amplificadas 3 amostras de cada espécie para verificação da repetibilidade das bandas. O perfil eletroforético

revelou uma repetibilidade satisfatória para admissão dos dados (Figuras 5 e 6). Dessa forma, a matriz binária pode ser montada (tabela VI). A partir da matriz binária, foi possível a estimativa da matriz das distâncias entre as espécies através do modelo matemático do Percentual de Desacordo.

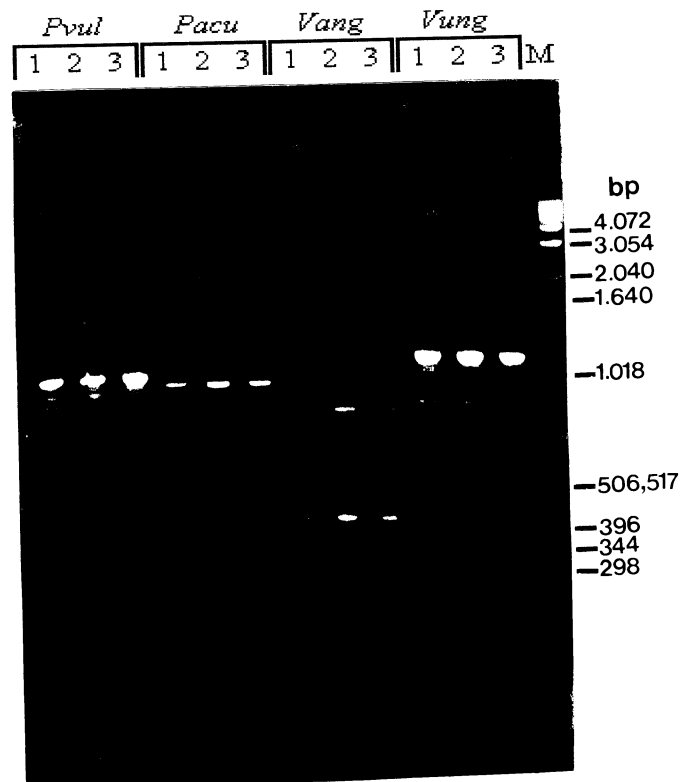


Figura 5. Perfil eletroforético das ampliações realizadas com o primer GOU07. *Pacu* = *Phaseolus acutifolius*; *Vang* = *Vigna angularis*; *Vung* = *Vigna unguiculata*; M = Padrão molecular.

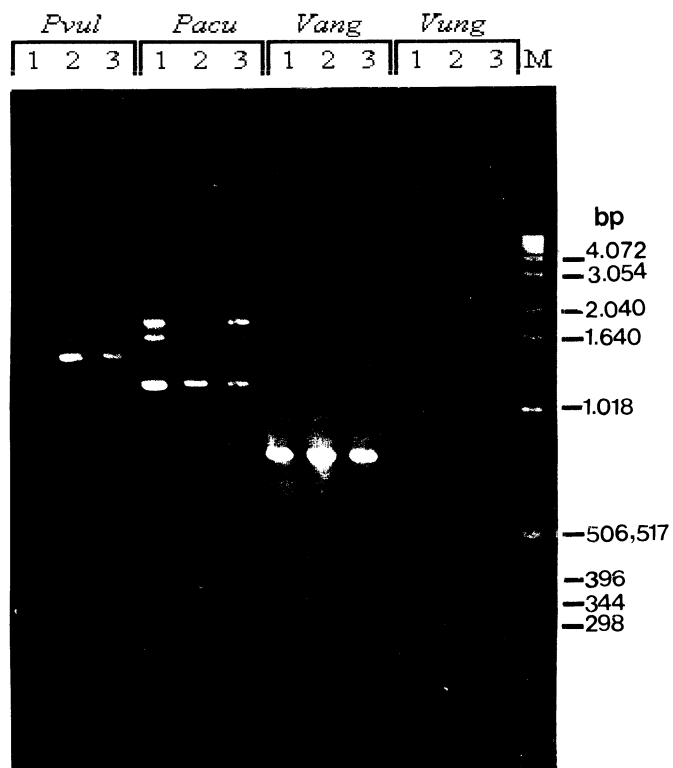


Figura 6. Perfil eletroforético das ampliações realizadas com o primer GOU10. *Pacu* = *Phaseolus acutifolius*; *Vang* = *Vigna angularis*; *Vung* = *Vigna unguiculata*; M = Padrão molecular.

Locus	<i>Pvul</i>	<i>Pacu</i>	<i>Vang</i>	<i>Vung</i>
P7-3107	0	1	0	0
P7-2837	1	1	0	0
P7-2475	0	1	0	0
P7-2260	0	0	1	1
P7-2111	0	0	1	0
P7-2017	0	0	0	1
P7-1972	1	0	0	0
P7-1842	1	1	0	0
P7-1800	0	0	0	1
P7-1760	1	0	0	1
P7-1682	1	0	0	0
P7-1614	0	0	1	0
P7-1370	0	0	0	1
P7-1340	1	1	0	0
P7-1043	0	0	1	0
P7-850	0	0	1	0
P10-2307	1	0	0	0
P10-2176	0	1	1	0
P10-1973	0	0	0	1
P10-1935	1	1	1	1
P10-1705	1	1	1	1
P10-1550	0	0	0	1
P10-1530	0	1	0	1
P10-1437	1	0	0	0
P10-1182	0	0	1	0
P10-1099	0	0	0	1
P10-926	0	0	1	0
P10-618	0	1	0	0

Tabela VI. Matriz binária. 1 - Presente; 0 - Ausente; *Pvul* = *Phaseolus vulgaris*; *Pacu* = *Phaseolus acutifolius*; *Vang* = *Vigna angularis*; *Vung* = *Vigna unguiculata*.

Análise de Cluster - A matriz das distâncias revelou que a espécie *Phaseolus vulgaris* está 36% distante da espécie *Phaseolus acutifolius*, 57% distante da espécie *Vigna angularis*, e 54% da espécie *Vigna unguiculata*. A *P.*

acutifolius apresentou uma distância de 50% pontos em relação à *V. angularis*, e 54% em relação à *V. unguiculata*. As espécies do gênero *Vigna* mostram-se distantes entre si em 54% (tabela VII).

Espécies	<i>Pvul</i>	<i>Pacu</i>	<i>Vang</i>	<i>Vung</i>
<i>Pvul</i>	0,00	0,36	0,57	0,54
<i>Pacu</i>	0,36	0,00	0,50	0,54
<i>Vang</i>	0,57	0,50	0,00	0,54
<i>Vung</i>	0,54	0,54	0,54	0,00

Tabela VII. Matriz das distâncias entre as espécies. *Pvul* = *Phaseolus vulgaris*; *Pacu* = *Phaseolus acutifolius*; *Vang* = *Vigna angularis*; *Vung* = *Vigna unguiculata*.

O fenograma, dendograma que representa de forma figurada as distâncias (ou similaridades) entre os taxons, foi confeccionado tendo em vista os valores contidos na matriz das distâncias. As distâncias foram lançadas no algoritmo responsável pela conversão desses dados em uma representação gráfica, e o resultado foi o fenograma da figura 7.

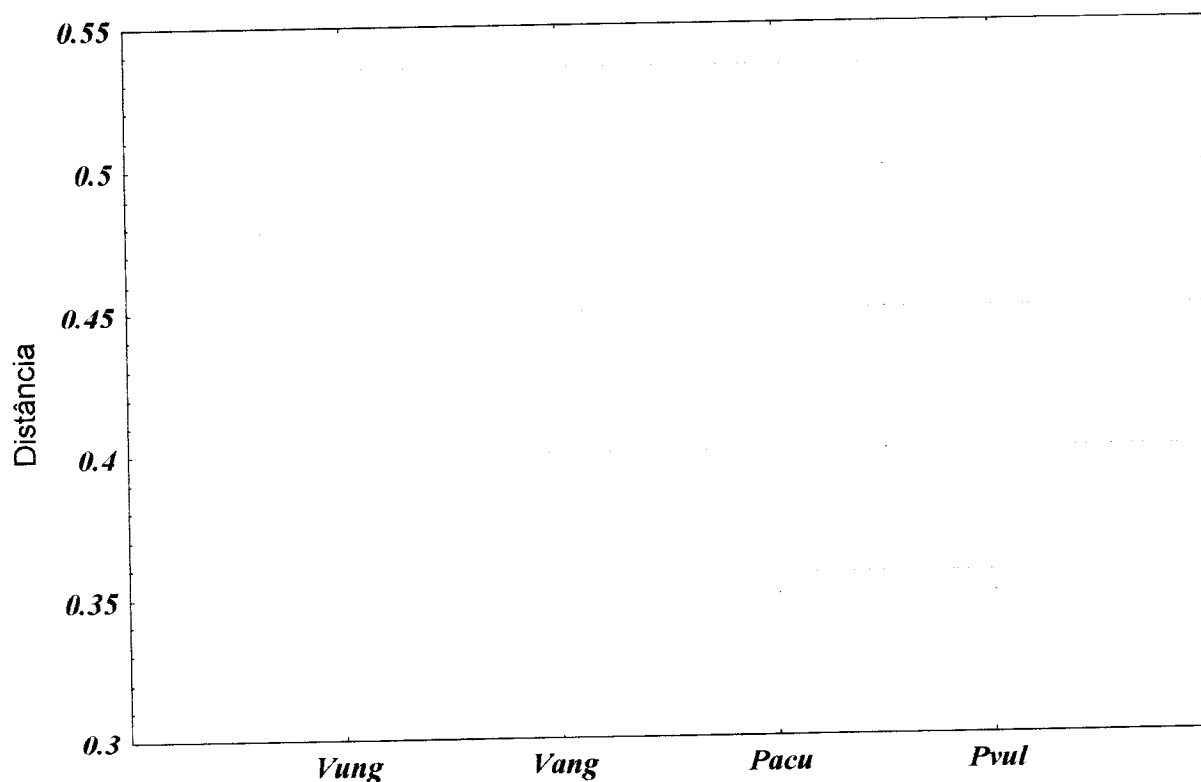


Figura 7. Fenograma ilustrativo das distâncias entre as quatro espécies deduzido pelo método do UPGMA. *Pvul* = *Phaseolus vulgaris*; *Pacu* = *Phaseolus acutifolius*; *Vang* = *Vigna angularis*; *Vung* = *Vigna unguiculata*.

No fenograma as espécies do gênero *Vigna* foram colocadas em um grupo separadas das espécies do gênero *Phaseolus* como era esperado. Embora fazendo parte de um único cluster, as *P. Vulgares* e *P. acutifolius* apresentaram uma divergência genética de aproximadamente 36%. A divergência de 36% entre as espécies do gênero *Phaseolus* pode ser talvez explicada pelo fato de seus centros de origem estarem muito próximos. Isso poderia gerar condições para a permanência do fluxo gênico entre as espécies.

Já as espécies de *Vigna* mostram-se um pouco mais distantes, sendo a distância entre elas a mesmo que distanciou o seu cluster do cluster do gênero *Phaseolus*. No gênero *Vigna* a distância de 54% parece estar também relacionada com os centros de origem das espécies em questão. Eles são relativamente distanciados um do outro, podendo assim ter criados mecanismos de isolamento mais eficientes.

CONCLUSÕES

As espécies *V. angularis* e *V. unguiculata* estão 54 % distantes entre si, enquanto que as espécies do gênero *Phaseolus* revelaram uma divergência na ordem de 36%. A partir do fenograma, conclui-se também que a distância entre os gêneros é de 54%.

A técnica do RAPD foi bastante satisfatória para a análise sistemática, pois os marcadores agruparam os gêneros em clusters distintos. Embora seja necessário um número maior de primers para se ter uma estimativa mais precisa da divergência genética entre essas espécies, os resultados obtidos com os dois primers utilizados foram satisfatórios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERGLUND-BRUCHER, O. and BRUCHER, H. The South American wild bean (*Phaseolus aborigineus* Burk) as ancestor of the common bean. **Economic Botany**, New York, **30**:257-272, 1976.
- BHASKARAI AH, K. B., SHIVSHANKAR, G., VIRUPAKSHARPA, K. Hybrid vigor in cowpea. **Indian Journal Genetic Plant Breeding**, **40**(2):334-337, 1980.
- CAETANO-ANOLLÉS, G., BASSAM, G. J. and GRESSHOFF, P. M. High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Bio/Technology**, **9**:553-557, 1991.
- DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.2, **1**:13-15. 1990.
- FREIRE FILHO, F. R., CARDOSO, M. J., ARAUJO, A. G., SANTOS, A. A. and SILVA, P. H. S. **Características botânicas e agronômicas de cultivares de feijão macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**. Teresina, EMBRAPA-UEPAE de Teresina. (Boletim de Pesquisa, 4) p.45. 1981.
- HADRY S, H. BALICK, M. and SCHIERWATER, B. **Molecular Ecology**. **1**:55-63, 1992.

- HEDRICK, P. Shooting the RAPDs. **Nature** (London) **355**:679-680, 1992.
- HOY, M. A. **Insect Molecular Genetics: An Introduction to Principles and Applications**. Academic Press, San Diego. 1994.
- HU, J. and QUIROS, C. F. Identification and broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. **Plant Cell Reports**. **10**:505-511, 1992.
- INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SNINSKY, J. J. and WHITE, T. J. **PCR protocols**. 1st ed. Academic, San Diego. p.482. 1990.
- KAPLAN, L. What is the origin of the common bean? **Economic Botany**, New York, **35**(2):240-257, 1981.
- KAPLAN, L., LYNCH, T. and SMITH, C. E. Early cultivated beans (*Phaseolus vulgaris*) from an intermontane Peruvian Valley. **Science**, Washington, **179**:76-77, 1973.
- PRESCOTT-ALLEN, R. and PRESCOTT-ALLEN, C. **Genes from the wild**. Earthcan Publ. Ltd. London. 1988.
- SCHIERWATER, B., STREIT, B., WAGNER, G. P. and DE SALLE, R. (Eds) **Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications**, Birkhauser, Basel, 1994.
- STEELE, W. M. & MEHRA, K. L. Structure, evolution and adaptation to farming systems and environment in *Vigna*. In: SUMMERFIELD, R. J. & BUNTING, A. H. (Eds). **Advances in Legume Science**. England, Royal Botanic Gardens, pp.459-468. 1980.
- SWOFFORD, D. L. and OLSEN, G. J. Phylogeny reconstruction. Ch.11, pp.411-501. In: HILLIS, D. M. and MORITZ, C. (Eds). **Molecular Systematics**, Sinauer, Sunderland, MA.1990.
- THAVARASOOK, C. et al (Eds). **Proceedings of The Mungbean Meeting 90**. Chiang Mai, 23-24, February, 1990. Tropical Agriculture Research Center, Japan, Thailand Office, Bangkok, 318p., 1991.

TOMOOKA, N., LAIRUNGREANG, C., NAKEERAKS, P., EGAWA, Y. and THAVARASOOK, C. The genetic diversity of mungbean in Asia. **TARC Newsletter**, 2(2), 6-7. Tropical Agriculture Research Center, Tsukuba, Japan. 1991.

WELSH, J. and McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**. 18:7213-7218, 1990.

WILEY, E. O. **Phylogenetics: the theory and practice of phylogenetic systematics**. A JOHN WILEY & SONS, INC., PUBLICATION. New York, USA. 439p. 1981.