



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/FITOTECNIA

LESLYENE MARIA DE FREITAS

DIVERSIDADE GENÉTICA DE PROGÊNIES DE FEIJÃO-CAUPI UTILIZANDO
MARCADORES ISSR E SSR

FORTALEZA

2026

LESLYENE MARIA DE FREITAS

DIVERSIDADE GENÉTICA DE PROGÊNIES DE FEIJÃO-CAUPI UTILIZANDO
MARCADORES ISSR E SSR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia/Fitotecnia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientadora: Profa. Dra. Cândida Hermínia Campos de Magalhães.

Coorientadora: Dra. Patricia do Nascimento Bordallo.

FORTALEZA

2026

LESLYENE MARIA DE FREITAS

DIVERSIDADE GENÉTICA DE PROGÊNIES DE FEIJÃO-CAUPI UTILIZANDO
MARCADORES ISSR E SSR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia/Fitotecnia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

Aprovada em: 11 / 06 / 26

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Cândida Hermínia Campos de Magalhães (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Patricia do Nascimento Bordallo (Coorientadora)
Embrapa Agroindústria Tropical

Dra. Eveline Nogueira Lima
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Wardsson Lustrino Borges
Embrapa Agroindústria Tropical

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, pela oportunidade de formação.

À Instituição Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – (Código de Financiamento 001), pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pelo apoio estrutural e materiais fornecidos para a realização dessa pesquisa.

À professora Dra. Cândida Magalhães, pelos ensinamentos, confiança, apoio e orientação durante todos esses anos.

À Dra. Eveline Lima, pela parceria diária, paciência, disponibilidade e ensinamentos durante todo o meu mestrado. Obrigada pelo apoio incondicional, você foi essencial.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Patricia Bordallo e Dr. Wardsson Lustrino por todo apoio, orientação, paciência e ensinamentos fornecidos durante o meu mestrado e realização dessa pesquisa, bem como as valiosas colaborações e sugestões.

À minha tia Gyslane, pelo incentivo, pelos momentos de alegria compartilhados e por ser inspiração para mim.

À minha mais que amiga, minha irmã e dupla de vida, Érika Beatriz, que me acompanhou do primeiro ao último passo nessa jornada acadêmica, tornando-a mais leve durante todos esses anos. Você foi e é fundamental na minha vida. Conte comigo sempre!

Ao meu companheiro, José Pontes, por sempre me apoiar, me ouvir, me dar aconchego e me incentivar a ser melhor todos os dias, para viver uma vida que valha a pena ser vivida.

Aos amigos, pelo companheirismo, risadas partilhadas e apoio para enfrentar as dificuldades ao longo do mestrado, tornando a caminhada mais agradável, em especial ao Jesimiel, Thalita, Itamar, Gabrielly Alice e Lucas.

A todos que, de alguma forma, ajudaram e contribuíram para realização dessa pesquisa e para minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma cultura de grande importância socioeconômica e alimentar no Brasil, especialmente na região Nordeste, destacando-se por sua ótima adaptabilidade a diferentes condições ambientais e pelo elevado valor nutricional. No entanto, a produtividade da cultura ainda é limitada em algumas regiões, evidenciando a necessidade de avanços nos programas de melhoramento genético da cultura. Nesse sentido, o estudo da variabilidade genética constitui uma etapa importante para a identificação e seleção de genitores superiores e divergentes, contribuindo para a formação de populações com maior variabilidade e, conseqüentemente, aumentando a eficiência dos programas de melhoramento genético. Assim, o presente trabalho teve como objetivo confirmar a hibridação de progênies F1, avaliar a diversidade genética em populações F1 e F2 de feijão-caupi utilizando marcadores moleculares do tipo ISSR e avaliar o potencial da técnica de PCR multiplex associada à eletroforese capilar utilizando marcadores SSR. Foram avaliados sete genitores, oito progênies F1 e 97 indivíduos da população F2. O DNA genômico foi extraído a partir de folhas jovens e posteriormente submetido às reações de PCR para amplificação dos marcadores ISSR e SSR. Cinco progênies F1 previamente selecionadas tiveram suas hibridações confirmadas por meio de sete marcadores ISSR, os quais permitiram identificar bandas polimórficas herdadas do genitor masculino e distinguir híbridos verdadeiros de possíveis indivíduos autofecundados. A formação de agrupamentos distintos observada na população F2 evidencia variabilidade genética entre os indivíduos. Quatro indivíduos destacaram-se por apresentarem maior divergência genética em relação aos demais materiais avaliados, demonstrando potencial para avanço nas próximas gerações de seleção. Adicionalmente, a técnica de PCR multiplex associada à eletroforese capilar demonstrou potencial para identificação de alelos em feijão-caupi, embora sejam necessários ajustes metodológicos e otimização das condições experimentais para maior eficiência e padronização das análises. Assim, conclui-se que os marcadores do tipo ISSR foram eficientes na caracterização molecular, detecção de variabilidade genética e confirmação de híbridos em feijão-caupi, evidenciando o potencial da geração F2 como fonte de variabilidade para programas de melhoramento genético da cultura.

Palavras-chave: progênie; caracterização molecular; PCR; variabilidade genética.

ABSTRACT

Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) is a crop of great socioeconomic and nutritional importance in Brazil, particularly in the Northeast region, due to its excellent adaptability to diverse environmental conditions and its high nutritional value. However, crop productivity remains limited in some regions, highlighting the need for advances in cowpea breeding programs. In this context, the assessment of genetic variability is an essential step for identifying and selecting superior and genetically divergent parents, contributing to the development of populations with greater genetic variability and, consequently, improving the efficiency of breeding programs. Therefore, the present study aimed to confirm the hybridization of F1 progenies, evaluate the genetic diversity of F1 and F2 cowpea populations using ISSR molecular markers, and assess the potential of multiplex PCR associated with capillary electrophoresis using SSR markers. Seven parental genotypes, eight F1 progenies, and 97 individuals from the F2 population were evaluated. Genomic DNA was extracted from young leaves and subsequently subjected to PCR amplification using ISSR and SSR markers. The hybrid status of five previously selected F1 progenies was confirmed using seven ISSR markers, which enabled the identification of polymorphic bands inherited from the male parent and the discrimination of true hybrids from potential self-pollinated individuals. The formation of distinct clusters in the F2 population revealed the existence of genetic variability among the individuals. Four individuals exhibited the greatest genetic divergence compared with the remaining materials evaluated, indicating their potential for advancement in subsequent selection generations. In addition, multiplex PCR associated with capillary electrophoresis showed potential for allele identification in cowpea, although methodological adjustments and optimization of the experimental conditions are still required to improve the efficiency and standardization of the analyses. Overall, ISSR markers proved to be effective for molecular characterization, genetic diversity assessment, and hybrid confirmation in cowpea, highlighting the potential of the F2 population as a valuable source of genetic variability for cowpea breeding programs.

Keywords: progeny; molecular characterization; PCR; genetic variability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Genitores e progênies F1 resultantes de cruzamentos.....	20
Figura 2 – Semeadura dos genótipos de feijão-caupi.....	22
Figura 3 – Progênie F2 escolhida.....	25
Figura 4 – Dendrograma de dissimilaridade genética entre os indivíduos de feijão-caupi, construído com uso do coeficiente de Jaccard algoritmo UPGMA.....	32
Figura 5 – Produtos de amplificação de amostras de DNA genômico dos genitores masculinos, possíveis F1 e dos genitores femininos, respectivamente.....	34
Figura 6 – Estimativas das correlações entre similaridades genéticas obtidas com números crescentes de marcadores ISSR polimórficos (A) e valores de estresse, indicando o número mínimo ideal de fragmentos necessários para a análise genética dos 102 indivíduos de feijão-caupi avaliados (B).....	36
Figura 7 – Dendrograma representativo das distâncias genéticas dos 102 indivíduos estudados, obtido pelo método da ligação média não ponderada (UPGMA).....	39
Figura 8 – Estrutura da diversidade genética dos 102 indivíduos de feijão-caupi com base na análise de coordenadas principais (PCoA).....	41
Figura 9 – Eletroferograma representativo dos picos correspondentes aos alelos identificados nos marcadores SSR avaliados.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Informações gerais dos genótipos de feijão-caupi.....	21
Tabela 2	– Lista de marcadores SSR utilizados, suas sequências, temperatura de anelamento, cor do fluorófo marcado e tamanho do fragmento esperado...	27
Tabela 3	– Sequências dos marcadores polimórficos selecionados para a caracterização de genótipos de feijão-caupi.....	30
Tabela 4	– Progenies de F1 selecionadas com base em características morfoagronômicas de interesse e respectivos marcadores ISSR utilizados na confirmação das hidridações.....	34
Tabela 5	– Sequência do marcador, bandas geradas e polimórficas dos marcadores ISSR utilizadas na caracterização dos 102 indivíduos de feijão-caupi.....	35
Tabela 6	– Número de indivíduos amplificados e alelos identificados para os marcadores SSR avaliados.....	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	11
3	REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1	Importância e variabilidade genética do feijão-caupi	12
3.2	Melhoramento genético e obtenção de populações segregantes	13
3.3	Marcadores moleculares: estratégias de análise e aplicação no estudo da diversidade genética	15
3.3.1	<i>Marcadores moleculares</i>	15
3.3.2	<i>Marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)</i>	17
3.3.3	<i>Marcadores SSR (Simple Sequence Repeats)</i>	18
3.3.3.1	<i>PCR multiplex e eletroforese capilar com marcadores SSR</i>	18
4	MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1	Caracterização molecular e confirmação da hibridação das progênies F1	20
4.1.1	<i>Material vegetal e cruzamentos</i>	20
4.1.2	<i>Coleta de folhas e extração de DNA</i>	21
4.1.3	<i>Seleção dos marcadores ISSR, PCR e eletroforese</i>	22
4.1.4	<i>Análise do polimorfismo e eficiência dos marcadores</i>	23
4.1.5	<i>Análise da diversidade genética e confirmação dos híbridos</i>	23
4.2	Caracterização da progênie F2	24
4.2.1	<i>Material vegetal e progênie F2</i>	24
4.2.2	<i>Coleta de folhas e extração de DNA</i>	25
4.2.3	<i>Seleção dos marcadores ISSR, PCR e eletroforese</i>	25
4.2.4	<i>Seleção dos marcadores SSR, PCR e eletroforese capilar</i>	26
4.2.5	<i>Análise do polimorfismo e eficiência dos marcadores</i>	27
4.2.5.1	<i>Polimorfismo utilizando marcadores ISSR</i>	28
4.2.5.2	<i>Polimorfismo em SSR</i>	28
4.2.6	<i>Análise da diversidade genética</i>	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	Caracterização molecular e confirmação da hibridação das progênies F1	30
5.2	Caracterização molecular de F2	35
5.2.1	<i>Caracterização molecular por meio de marcador ISSR</i>	35
5.2.2	<i>Amplificação e identificação de alelos com marcadores SSR</i>	42
6.	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45
	APÊNDICE A – MATRIZ DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AS PROGÊNIES F1 E SEUS GENITORES	53

1 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma espécie que apresenta uma grande plasticidade fenotípica (Freire Filho *et al.*, 2011). Essa característica proporciona à espécie adaptar a sua fisiologia ou morfologia de acordo com as condições do ambiente em que é cultivada. O Brasil é um país biodiverso, apresentando uma infinidade de tipos de solos e microclimas, e, portanto, vários ambientes. Graças à adaptabilidade e estabilidade de produção do feijão-caupi, a cultura é cultivada na maioria dos municípios brasileiros (Conab, 2023). Por apresentar ampla adaptabilidade a diferentes condições edafoclimáticas, o feijão-caupi destaca-se como uma cultura de interesse para programas de melhoramento genético, que visam desenvolver cultivares com maior produtividade, resistência a pragas e doenças, tolerância a estresses bióticos e abióticos, além de características agrônômicas e comerciais que atendam às demandas dos produtores e do mercado consumidor.

Com o avanço da pesquisa e o advento da biologia molecular em que se permite a manipulação direta do DNA em laboratório, as diferentes metodologias da genética molecular, principalmente os marcadores de DNA, apresentam várias aplicações para resolver problemas e aumentar a eficiência dos programas de melhoramento (Bonett *et al.*, 2006). Entre os diferentes tipos, os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) destacam-se como uma estratégia eficiente para os estudos de diversidade genética, não necessitando conhecer previamente a sequência genômica da espécie em questão, visto que são de natureza dominante (Felix *et al.*, 2020). Além disso, têm elevado polimorfismo, boa reprodutibilidade e baixo custo (Costa *et al.*, 2015). Por outro lado, os marcadores SSR (*Simple Sequence Repeat*) são de natureza codominante, com abundância e uniformidade na distribuição dentro do genoma (Santhy *et al.*, 2023).

Contudo, as informações obtidas por esses marcadores não substituem as informações provenientes dos caracteres morfoagronômicos (Faleiro *et al.*, 2007). Dessa forma, informações obtidas por meio de caracteres morfológicos e de marcadores moleculares são utilizadas como ferramentas que se complementam na avaliação da diversidade genética de determinada população, tornando a avaliação mais completa, precisa e mais rápida (Rick & Yoder, 1988).

Portanto, estudar a variabilidade genética de espécies cultivadas, variedades e populações obtidas por meio de cruzamentos é importante, principalmente, para selecionar indivíduos que possam apresentar características de interesse e contribuir para programas de melhoramento genético. Assim, este projeto parte da hipótese de que as populações F1 e F2 de

feijão-caupi apresentam variabilidade genética detectável por marcadores ISSR, permitindo a distinção entre genitores e progênes, enquanto os marcadores SSR associados à PCR multiplex e à eletroforese capilar possibilitam a identificação preliminar de alelos na população avaliada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a diversidade genética de populações F1 e F2 de feijão-caupi utilizando marcadores ISSR e avaliar a eficiência da amplificação de marcadores SSR em PCR multiplex associada à eletroforese capilar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Confirmar a hibridação das progênes F1 de feijão-caupi por meio da caracterização genética dos genitores e das progênes utilizando marcadores ISSR;
2. Avaliar a variabilidade genética da população F2 por meio de marcadores ISSR;
3. Avaliar a eficiência de amplificação de marcadores SSR em PCR multiplex associada à eletroforese capilar;
4. Identificar indivíduos geneticamente divergentes, com potencial para uso em programas de melhoramento do feijão-caupi.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Importância e variabilidade genética do feijão-caupi

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma leguminosa herbácea e dicotiledônea, classificada na ordem Fabales, família Fabaceae, tribo Phaseoleae e gênero *Vigna*, apresentando ampla distribuição geográfica, sendo predominantemente encontrada em regiões tropicais da África, Ásia e Américas (Padulosi; Ng, 1997). Na América do Sul, o feijão-caupi foi introduzido no século XVI por colonizadores europeus e espanhóis na época da escravidão, e, no Brasil, seu cultivo iniciou-se pelo Estado da Bahia e, posteriormente, se expandiu para outras regiões do Nordeste, onde é conhecida popularmente como feijão-de-corda ou feijão macassar (Freire Filho, 1988).

O feijão-caupi é considerado uma das culturas alimentares mais importantes do mundo devido à sua qualidade nutricional (Costa *et al.*, 2006), principalmente quanto aos teores de proteína, ferro e zinco, além de um baixo teor de gordura (Carvalho *et al.*, 2017; Jayathilake *et al.*, 2018). Ele constitui a base da alimentação da população brasileira, além de ser um dos produtos agrícolas de grande valor econômico (Costa *et al.*, 2006).

Além dos fatores alimentícios, a cultura tem seu apelo agrônomo, principalmente pelo seu ciclo fenológico considerado mais curto, que possibilita a adequação do seu plantio dentro de uma janela de tempo menor, sem ter que renunciar à produção de outros grãos ainda no mesmo ano-safra (Conab, 2025). A cultura também vem se destacando devido à sua tolerância à seca e sua capacidade de fixação de nitrogênio, além da possibilidade de fazer cultivos consorciados (Gerrano *et al.*, 2020). Por isso, o feijão-caupi é a leguminosa anual mais cultivada em regiões tropicais secas do planeta (Boukar *et al.*, 2019). Sendo assim, o cultivo do feijão-caupi tem importante papel na complementação da renda, diversificação de cultivos e segurança alimentar das populações (Feitosa *et al.*, 2015).

No Brasil, além da relevância alimentar e agrônoma, o feijão-caupi apresenta expressiva importância econômica, sendo destinado a diferentes segmentos de mercado, como grãos secos, feijão verde (vagem e grãos) e sementes (Freire Filho *et al.*, 2005). Na safra de 24/25, a produção total de feijão-caupi foi de 614,8 mil toneladas, colhidas em 1.259,2 mil hectares, com uma produtividade média de 488 kg/ha. Nesta mesma safra, a produção de feijão-caupi na região Nordeste foi de 377,3 mil toneladas, o que representa 61% da produção do país. Entre os estados nordestinos, o Ceará se destaca por apresentar a maior área plantada (334,6 mil hectares), porém, registra uma das menores produtividades do país (195 kg/ha), valor abaixo

da média nacional, devido ao baixo nível tecnológico empregado e dependência climática (Conab, 2025).

Assim, o feijão-caupi contribui não só para a segurança alimentar de milhões de pessoas, como também para a fertilidade do solo e geração de emprego e renda (Kulkarni *et al.*, 2018). Globalmente, a área colhida, a produção e o rendimento de grãos secos de feijão-caupi têm aumentado nos últimos anos, sendo a África responsável pela maior parte da produção mundial, seguida pela Ásia, Américas e Europa (Faostat, 2024). Esse cenário reforça a importância da cultura e o crescente interesse pelo seu cultivo, especialmente devido à elevada adaptabilidade da espécie e aos avanços do melhoramento genético.

O feijão-caupi é uma espécie diploide ($2n = 22$), com genoma estimado em 641 Mbp (Lonardi *et al.*, 2019). Em função da alta taxa de autofecundação ($\geq 95\%$), apresenta uma base genética estreita (Boukar *et al.*, 2020). Esse mecanismo reprodutivo é favorecido pela proteção dos órgãos reprodutivos pelas pétalas, associada à ocorrência de protoginia, caracterizada pela maturação do gineceu antes do androceu, e de cleistogamia, na qual a polinização ocorre antes da abertura da flor (Freire Filho; Ribeiro, 2023). Apesar da baixa taxa de fecundação cruzada, que varia conforme o ambiente e o genótipo, esse processo possibilita a geração de materiais genéticos distintos (Freire Filho; Ribeiro, 2023), contribuindo para a formação do germoplasma nacional. Atualmente, o germoplasma brasileiro é constituído por materiais crioulos, tradicionais e melhorados (cultivares e linhagens) (Freire Filho *et al.*, 2011).

Embora a base genética do feijão-caupi seja estreita, a variabilidade genética tem sido mantida e aumentada ao longo do tempo por meio de mutações gênicas, recombinações e pela introdução de germoplasma diverso em programas de melhoramento (Boukar *et al.*, 2020; Freire Filho *et al.*, 2011; Borém, Miranda, 2013). Essa variabilidade é essencial para que se expressem características de interesse agrônomo, como produtividade, adaptação a diferentes condições edafoclimáticas, resistência a estresses bióticos e abióticos e melhoria da qualidade nutricional (Freire Filho; Ribeiro, 2023). Em um programa de melhoramento, uma grande e diversificada coleção de germoplasma é uma fonte preciosa de possíveis genitores para cruzamentos e, posteriormente, o desenvolvimento de variedades melhoradas (Chheda; Fatokun, 1982). Sendo assim, a caracterização e geração da variabilidade genética constitui uma etapa fundamental para auxiliar as estratégias de melhoramento, especialmente na obtenção de populações segregantes com maior potencial de seleção.

3.2 Melhoramento genético e obtenção de populações segregantes

Um programa de melhoramento de plantas tem como objetivo principal melhorar a adaptabilidade, estabilidade, produtividade das plantas cultivadas, além de torná-las mais resistentes a doenças e pragas, atendendo às necessidades dos produtores (Freire Filho; Ribeiro, 2023). No caso do programa de melhoramento genético do feijão-caupi, devido a sua importância socioeconômica, é importante integrar interesses de pequenos agricultores familiares e empresariais, permitindo que se tenha um sistema integrado entre produtor, comerciante, agroindústria, distribuidor, consumidor e exportador (Embrapa, 2016).

O melhoramento genético do feijão-caupi no Brasil iniciou-se em 1925 com um estudo pioneiro, onde fez-se a caracterização e avaliação de 12 cultivares dessa espécie (Lobbe, 1925). De 1968 a 2020, com o avanço da pesquisa no país, já foram lançadas 84 cultivares de feijão-caupi por meio do melhoramento genético, cultivares estas mais adaptadas às condições ambientais, apropriadas para um cultivo totalmente mecanizado, com ciclo de maturação mais precoce e uniforme, além da melhoria genética dos grãos (Freire Filho; Ribeiro, 2023; Embrapa, 2016). Nesse contexto, no estudo de Tomaz *et al.* (2022), ao avaliarem 12 genótipos em quatro diferentes ambientes, concluíram que as cultivares BRS Pajeú e BRS Potengi seriam recomendadas para o estado do Ceará, por apresentarem maiores produtividades de grãos secos, além de adaptabilidade e estabilidade, destacando-se na maioria dos componentes de produção, sendo a variável número de vagens por planta a de maior efeito sobre a produtividade de grãos.

O melhoramento de uma espécie pode ser feito por seleção no germoplasma já existente, introdução de germoplasma, cruzamentos entre genótipos, sendo as técnicas moleculares importantes ferramentas de apoio para aumentar a eficiência dos programas de melhoramento (Freire Filho; Ribeiro, 2023). Dentre as estratégias de melhoramento, a hibridação entre genótipos constitui uma importante fonte de geração de variabilidade genética, especialmente em espécies autógamas como o feijão-caupi. Nesses casos, os cruzamentos são realizados de forma artificial, com o objetivo de recombinar alelos de interesse presentes nos genitores (Borém; Miranda, 2013). A geração F1 resultante desses cruzamentos tende a apresentar uma uniformidade genética, enquanto a geração F2, obtida por autofecundação da F1, caracteriza-se por apresentar maior segregação genética e fenotípica devido ao maior número de recombinações alélicas possíveis, o que possibilita a seleção de indivíduos superiores ou com as características de interesse (Borém; Miranda; 2013). Dessa forma, a obtenção da geração F2 é considerada uma das etapas mais importantes nos programas de melhoramento, uma vez que retém maior variabilidade genética. Além disso, a utilização de marcadores moleculares vem avançando nas pesquisas com o feijão-caupi e tem contribuído significativamente para a confirmação de híbridos F1 e para o acompanhamento da segregação

e diversidade nas gerações posteriores, aumentando a eficiência do processo seletivo (Borém; Miranda, 2013).

Khajudparn *et al* (2012), ao estudarem feijão-mungo por meio da análise molecular com marcadores ISSR, puderam diferenciar os híbridos F1 de seus genitores, confirmando a hibridação e a eficácia desses marcadores nesse tipo de análise. Pessoa *et al* (2025a), ao estudar a divergência genética entre acessos de feijão-caupi usando características fenotípicas, moleculares e nutricionais, detectaram variabilidade genética entre estes e identificaram 11 acessos como potenciais genitores para hibridação e uma geração segregante subsequente capaz de apresentar expressões fenotípicas favoráveis para outros caracteres agrônômicos. Araújo *et al* (2019), ao analisar a diversidade de 8 variedades locais de feijão-caupi por meio de marcadores ISSR, sugeriram cruzamentos entre os genótipos mais divergentes, Cojó e Boi Deitado, na geração de populações segregantes. Kalluru *et al.* (2022), ao estudar a variabilidade genética em uma população F3 de híbridos interespecíficos de feijão-caupi obtidos por cruzamento artificial, puderam confirmar o sucesso da hibridação. Nascimento *et al.* (2023) encontraram alta variabilidade genética na caracterização genotípica de 53 acessos de feijão-caupi. Mafakheri *et al.* (2017), ao analisarem 32 genótipos de feijão-caupi por meio de marcadores microssatélites e dados morfológicos, verificaram que há diversidade genética entre os materiais, destacando que a combinação desses dados é uma ferramenta altamente informativa, eficiente e precisa para a detecção da diversidade genética no germoplasma da espécie.

Assim, torna-se interessante que a caracterização dos indivíduos seja complementada com o auxílio de marcadores moleculares, os quais têm a capacidade de analisar de forma ampla o genoma, sem a influência do ambiente e, dessa forma, gerar informações baseadas na variabilidade genética (Ouborg *et al.*, 1999). Nesse sentido, a avaliação molecular constitui uma abordagem viável e segura para a identificação e seleção de indivíduos divergentes de feijão-caupi, sendo de fácil aplicação em programas de melhoramento e na distinção entre genótipos (Pessoa *et al.*, 2025a).

3.3 Marcadores moleculares: estratégias de análise e aplicação no estudo da diversidade genética

3.3.1 Marcadores moleculares

Os primeiros marcadores genéticos comumente empregados em estudos de diversidade genética foram os morfológicos devido à sua natureza herdável, visível e determinável (Ipgri, 1996). Esses marcadores morfológicos podem ser avaliados em diferentes ambientes, permitindo a seleção de características desejáveis para uso nos cruzamentos em programas de melhoramento (Oliveira *et al.*, 2021). Entretanto, o ambiente pode influenciar a expressão dessas características, devido à interação genótipo x ambiente, o que pode levar a equívocos na interpretação dos resultados (Bered *et al.*, 1997). Com os avanços na biologia molecular, surgem os marcadores moleculares, que permitem a análise direta do genótipo, sem depender da expressão fenotípica, eliminando a influência do ambiente (Toppa; Jadoski, 2013). Por isso, o uso de marcadores moleculares se destaca como uma ferramenta promissora na detecção de polimorfismo e na estimativa da diversidade genética de indivíduos, permitindo a seleção mais precisa de genitores contrastantes (Boukar *et al.*, 2019).

Os marcadores moleculares são variações no DNA que podem ou não estar fisicamente associadas a genes envolvidos no controle de características, permitindo a distinção entre indivíduos contrastantes, e são classificados como marcadores codominantes ou dominantes (Silva, 2019; Souza, 2019). Os codominantes permitem distinguir indivíduos homozigotos e heterozigotos, enquanto os dominantes não o são, identificando apenas presença ou ausência de um determinado alelo (Oliveira *et al.*, 2021). O uso de marcadores moleculares no melhoramento vegetal apresenta ampla aplicabilidade, desde estudos de diversidade genética e evolução, análise de pedigree, mapeamento genético, recuperação do genoma recorrente em programas de retrocruzamentos, seleção assistida de características de interesse agrônomo até a orientação do melhorista na escolha de genitores (Souza, 2019; Borém; Miranda, 2013).

Diversos tipos de marcadores moleculares têm sido utilizados em programas de melhoramento, incluindo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e SSR (*Simple Sequence Repeat*), cada um com particularidades quanto à reprodutibilidade, custo e nível de polimorfismo detectado (FALEIRO, 2007). Dentre estes, os marcadores moleculares do tipo ISSR e SSR têm sido amplamente utilizados em estudos de diversidade genética em feijão-caupi (Sahu *et al.*, 2026; Lioi *et al.*, 2021; Sarr *et al.*, 2020), sendo considerados ferramentas eficientes e precisas para detectar variabilidade genética na espécie (Diallo *et al.*, 2024). Ambos utilizam a técnica da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para amplificar regiões de DNA, desde que tenham acesso a uma fita de DNA molde, desoxirribonucleotídeos e oligonucleotídeos utilizados como iniciadores pela enzima polimerase (Medeiros; Cardoso; Ferreira, 2006). A separação e visualização dos produtos amplificados é feita, principalmente, por eletroforese em

gel de agarose ou poliacrilamida (Faleiro, 2007). Para marcadores ISSR, os dados são convertidos em matrizes binárias baseadas na presença (1) ou ausência (0) de bandas para posterior análises (Wolfe, 2005). Já para os SSR, é possível identificar diferentes alelos, permitindo análises mais detalhadas da diversidade genética dos indivíduos (Diallo *et al.*, 2024).

3.3.2 Marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*)

Os marcadores ISSR baseiam-se na amplificação de regiões do DNA localizadas entre sequências microsatélites, utilizando primers ancorados em repetições simples (Silva, 2013). Possuem, geralmente, 16-20 pb de comprimento e produzem vários fragmentos de DNA com diferentes tamanhos (Faleiro, 2007). Apresentam ampla utilização por serem universais, ou seja, não há a necessidade de conhecimento prévio de dados de sequência de DNA para o desenho do primer, geram alto conteúdo de informação genética e são altamente polimórficos; além de possuírem menor custo por serem dominantes; entretanto, não permitem a distinção entre indivíduos heterozigotos e homozigotos (Faleiro, 2007; Almeida *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). Os marcadores ISSR têm sido amplamente utilizados em estudos de avaliação da diversidade genética, estrutura populacional e relações genéticas entre genótipos em diversas espécies.

Para estudo de diversidade genética, o uso de marcadores ISSR apresentam muitas vantagens, como alta reprodutibilidade e simplicidade nas análises, sendo particularmente, indicados para uso em análises com muitos indivíduos amostrados (Tantasawat *et al.*, 2010). Asadova *et al.* (2024), avaliaram a diversidade genética de 28 acessos da coleção de feijão-caupi utilizando cinco marcadores ISSR, que apresentaram índice de polimorfismo de 75%. Com base na análise de coordenadas principais (PCoA) e no dendrograma, os autores concluíram que os marcadores ISSR foram eficientes para avaliar a diversidade genética, permitindo distinguir três grupos geneticamente distintos dentro da coleção e detectar amostras em duplicatas. Santos *et al.* (2025) avaliaram a diversidade genética de 10 acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de feijão-caupi da Universidade Federal do Ceará, utilizando marcadores ISSR. Os autores observaram um índice de polimorfismo de 67,62%. Além disso, por meio da análise de agrupamento, foram identificados quatro grupos de similaridade genética, concluindo que os marcadores ISSR demonstraram eficiência na detecção de variabilidade genética dentro dos acessos estudados.

3.3.3 Marcadores SSR (Simple Sequence Repeats)

Os marcadores SSR, ou microssatélites, são derivados de pequenas sequências repetidas em *tandem*, ou seja, uma após a outra, de 1 a 6 nucleotídeos (Borém, Miranda, 2013; Souza, 2015). Diferente dos ISSR, os marcadores SSR exigem conhecimento prévio da sequência de DNA que flanqueia o SSR, a fim de possibilitar o desenho dos primers específicos (Costa, 2015). Têm como principais vantagens a codominância, permitindo distinguir heterozigotos e homozigotos, o alto nível de polimorfismo, alta reprodutibilidade, além da possibilidade de detectar múltiplos microssatélites (realizando uma PCR multiplex), otimizando assim o trabalho laboratorial (Faleiro, 2007).

Os marcadores SSR têm sido amplamente empregados na avaliação da diversidade genética, construção de mapas genéticos e identificação de genótipos superiores, devido à sua alta capacidade discriminatória (Diallo *et al.*, 2024). Uma *et al.* (2011), avaliaram nove genótipos de feijão-caupi por meio de 36 marcadores SSR, para identificar genótipos resistentes à ferrugem do feijoeiro (*Uromyces appendiculatus*). Foram identificados 11 alelos polimórficos no total, sendo que cinco marcadores produziram bandas heterozigotas e um marcador gerou uma banda exclusiva para apenas um dos genótipos, tornando-o útil para estudos de introgressão assistida por marcadores. Por meio da análise do dendrograma, os genótipos foram agrupados em sete grupos, mostrando correlação com sua origem geográfica e distinguindo as cultivares das variedades locais. Com base nesses resultados, os autores concluíram que os marcadores SSR servem como base para trabalhos futuros de identificação de genes associados à resistência a doenças e a caracteres agrônômicos, bem como para a construção de mapas de ligação em feijão-caupi.

3.3.3.1 PCR multiplex e eletroforese capilar com marcadores SSR

A PCR multiplex é uma variação da PCR convencional desenvolvida em 1988, que se baseia na amplificação simultânea de diferentes regiões do DNA em uma única reação, sendo uma estratégia eficiente para otimizar análises com marcadores SSR, reduzindo custos, tempo e consumo de reagentes (Chamberlain *et al.*, 1988; Guichoux *et al.*, 2011). Para que não haja sobreposição no momento da amplificação e se obtenha êxito na análise, é preciso realizar uma seleção cuidadosa dos marcadores que serão utilizados, considerando a diferença na marcação com fluoróforos e tamanhos de fragmentos a serem amplificados (Guichoux *et al.*, 2011; Shen, 2023). Os marcadores também devem apresentar faixas de temperatura de anelamento

semelhantes (Shen, 2023), para serem utilizados concomitantemente.

A combinação da PCR multiplex com a eletroforese capilar torna-se uma ferramenta poderosa, pois permite a amplificação simultânea de múltiplos loci, aliada à elevada resolução na análise dos fragmentos (Guichoux *et al.*, 2011). A eletroforese capilar baseia-se na migração dos fragmentos de DNA em capilares preenchidos com polímeros, possibilitando a separação automatizada e precisa do tamanho dos alelos (Queiroz; Jardim, 2018). Em comparação com a eletroforese convencional, a eletroforese capilar apresenta maior sensibilidade, reprodutibilidade e capacidade de discriminar fragmentos que diferem em poucos pares de bases (Smith; Nelson, 2004). Assim, a combinação dessas estratégias tem a capacidade de reduzir tempo, custos, trabalho e mão de obra, auxiliando os melhoristas em todo o processo de seleção e caracterização nos programas de melhoramento.

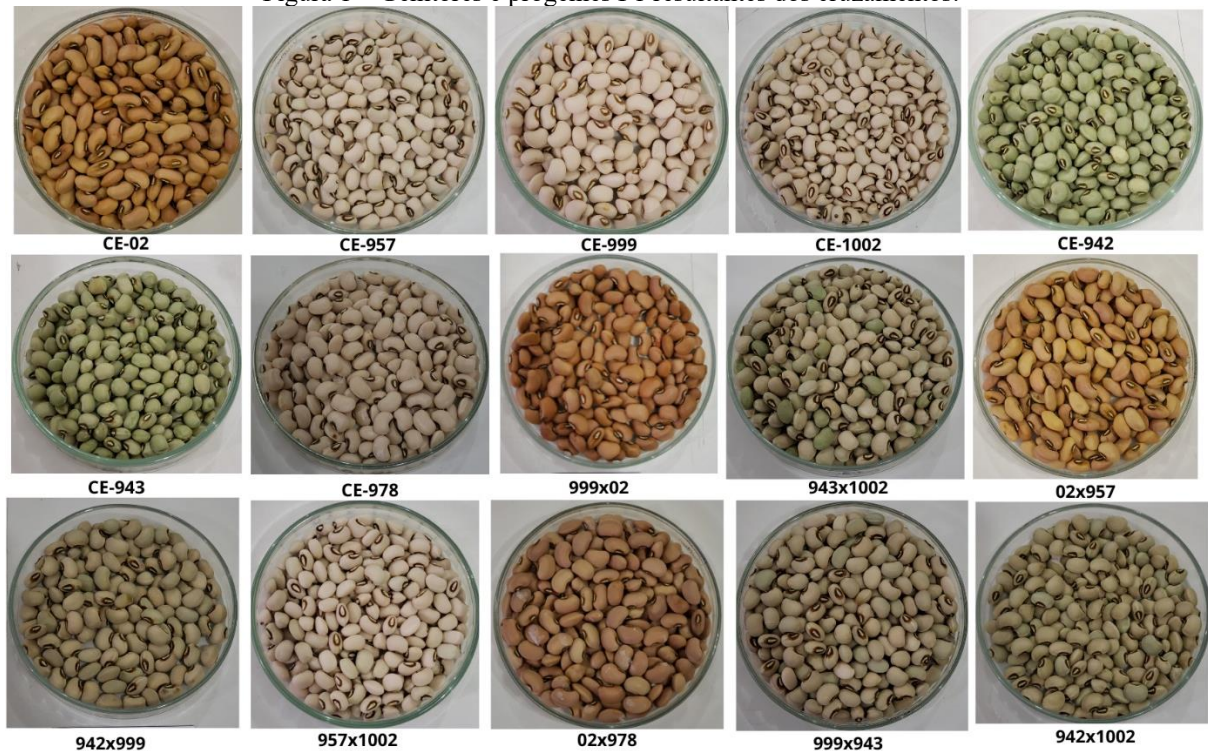
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização molecular e confirmação da hibridação das progênes F1

4.1.1 Material vegetal e cruzamentos

Foram avaliados sete genitores e oito progênes F1 (Figura 1). As progênes foram obtidas a partir de cruzamentos realizados pelo programa de melhoramento de feijão-caupi da Universidade Federal do Ceará (UFC), no período de agosto de 2020 a março de 2021, os quais foram realizados por meio de polinização manual, com sincronização do florescimento dos genitores mediante sementeiras em momentos diferentes, conforme metodologia descrita por Pessoa *et al.* (2025b). Dentre os genitores, três são cultivares desenvolvidas pela Embrapa Meio-Norte: CE-942, CE-943 e CE-978; as demais linhagens (CE-02, CE-957, CE-999, CE-1002) foram introduzidas no Banco Ativo de Germoplasma da UFC (BAG-UFC). Foram incluídas, como testemunhas, uma cultivar desenvolvida pela Embrapa Meio Norte (BRS Pujante) e duas variedades coletadas junto a produtores de feijão verde: Paulistinha e Pingo de Ouro, totalizando 18 indivíduos avaliados (Tabela 1).

Figura 1 – Genitores e progênes F1 resultantes dos cruzamentos.



Fonte: autora, 2021.

Tabela 1 – Informações gerais dos genótipos de feijão-caupi.

Nº Genótipos	Genitores e Populações	Identificação	Porte da planta	Classe/subclasse	Cor do grão
1	CE-02	Bengala	Semi-prostado	Cores/mulato	Marrom
2	CE-957	MNC-01-627D-65-1	Ereto	Branco/Branco liso	Branco
3	CE-999	MNC-03-720-C-31	Ereto	Branco/Fradinho	Branco
4	CE-1002	MNC-01-627F-14-5	Ereto	Branco/Branco	Branco
5	CE-942	BRS Juruá	Semi-prostado	Cores/Verde	Verde
6	CE-943	BRS Aracê	Semi-prostado	Cores/Verde	Verde oliva
7	CE-978	BRS Tumucumaque	Semi-ereto	Branco/Branco liso	Branco
População F1					
8	999 X 02	Cruzamento entre os genitores CE-999 e CE-02			
9	943 X 1002	Cruzamento entre os genitores CE-943 e CE-1002			
10	02 X 957	Cruzamento entre os genitores CE-02 e CE-957			
11	942 X 999	Cruzamento entre os genitores CE-942 e CE-999			
12	957 X 1002	Cruzamento entre os genitores CE-957 e CE-1002			
13	02 X 978	Cruzamento entre os genitores CE-02 e CE-978			
14	999 X 943	Cruzamento entre os genitores CE-999 e CE-943			
15	942 X 1002	Cruzamento entre os genitores CE-942 e CE-1002			
Testemunhas					
16	BRS Pujante	BRS Pujante (variedade comercial)			
17	Paulistinha	Paulistinha (variedade produtor)			
18	Pingo de ouro	Pingo de ouro (variedade produtor)			

Fonte: autora, 2025.

4.1.2 Coleta de folhas e extração de DNA

Foram semeadas três sementes de cada genótipo em vasos com capacidade de três litros, contendo substrato, onde permaneceram até a emissão do primeiro trifólio (Figura 2). Após quinze dias, realizou-se o desbaste, mantendo-se apenas duas plântulas por vaso. Em

seguida, realizou-se um bulk de quatro folhas, as quais foram coletadas das plântulas, armazenadas em sacos plásticos e mantidas em freezer a -80°C para posterior extração do DNA genômico.

Figura 2 – Semeadura dos genótipos de feijão-caupi.



Fonte: autora, 2024.

Para a extração de DNA, utilizaram-se aproximadamente 100 mg de tecido foliar de cada genótipo, seguindo o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990). Após a extração, a concentração foi verificada por meio do espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA), medindo-se a absorção em 260 e 280 nm, e a qualidade do DNA observada por eletroforese em gel de agarose a 1,0%, visualizadas em fotodocumentador L-PIX Chemi (Loccus). As amostras de DNA genômico, então, foram diluídas para uma concentração final de 10 ng/ μL e armazenadas a -20°C .

4.1.3 Seleção dos marcadores ISSR, PCR e eletroforese

Realizou-se a triagem inicial de um total de 37 marcadores, sendo mantidos apenas aqueles que apresentaram padrões de bandas nítidos, sem arrastes e sem ambiguidade na interpretação. A partir dessa etapa, 16 marcadores ISSR foram utilizados nas análises, selecionados por atingirem os critérios elencados acima.

As reações de PCR foram preparadas para um volume total de 20 μL contendo 1x do tampão de PCR; 2 mM de MgCl_2 ; 0,2 mM de dNTP; 1U de Taq DNA polimerase; 0,8 μM de primer; 30 ng de DNA; e água ultrapura até completar o volume final. As amostras foram amplificadas utilizando um termociclador (Applied Biosystems, modelo Veriti 96 – Well Thermal Cycler) nas etapas a seguir: (I) desnaturação inicial do DNA a 94°C por 5 minutos; (II) 40 ciclos a 94°C por 1 minuto; anelamento durante 30 segundos (variando de $39,6^{\circ}\text{C}$ – $58,2^{\circ}\text{C}$, de acordo com o primer); extensão por 1 minuto a 72°C ; e (III) extensão final do DNA por 10 minutos a 72°C . Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal, com

uma tensão de 120 V por 90 minutos, utilizando-se gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio em tampão 1X TBE (45 mM Tris-borato, pH 8,0 e 1 mM EDTA). A visualização de cada gel foi realizada em fotodocumentador L-PIX Chemi (Loccus).

4.1.4 Análise do polimorfismo e eficiência dos marcadores

A matriz de dados binários foi construída a partir da leitura dos perfis de amplificação obtidos em gel, atribuindo-se valores “1” para presença e “0” para ausência de bandas. Com base nessa matriz, foram estimadas as frequências necessárias às análises.

Para a análise do polimorfismo, foi estimado o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) para cada marcador ISSR, conforme proposto por Anderson *et al.* (1993). O cálculo baseou-se na frequência de presença (1) e ausência (0) das bandas, considerando o caráter dominante dos marcadores ISSR. O PIC foi obtido pela seguinte expressão:

$$PIC_i = 1 - \sum_j p_{ij}^2$$

Em que: p_{ij} corresponde à frequência do alelo (banda) j no marcador i .

A eficiência dos marcadores foi avaliada considerando o número total de bandas geradas, o número de bandas polimórficas e o percentual de polimorfismo obtido para cada primer. Esse percentual correspondeu à razão entre o número de bandas polimórficas e o total de bandas amplificadas, multiplicada por 100.

4.1.5 Análise da diversidade genética e confirmação dos híbridos

Para a caracterização genética dos indivíduos por meio de marcador ISSR, foi utilizada a matriz de dados binários previamente obtida a partir dos géis de eletroforese. Em seguida, foram estimadas as distâncias genéticas entre os indivíduos com base no complemento aritmético do coeficiente de similaridade de Jaccard (1901), conforme a expressão abaixo:

$$D_{ij} = 1 - \frac{a}{a + b + c}$$

Em que: a é presença de bandas em ambos os indivíduos i e j , b é a presença de bandas no indivíduo i e ausência no indivíduo j , e c é a ausência de bandas no indivíduo i e presença no indivíduo j .

A partir da matriz de distâncias, foi realizada análise de agrupamento pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages*), com a construção de

um dendrograma para representar as relações genéticas entre os indivíduos avaliados. A confiabilidade dos agrupamentos foi avaliada por meio do coeficiente de correlação cofenética (CCC). O ponto de corte no dendrograma foi definido segundo o critério de Mojena (1977), conforme a seguinte expressão:

$$Pc = m + k.Sd$$

Em que: m é a média, k é uma constante (1,25) e Sd é o desvio padrão.

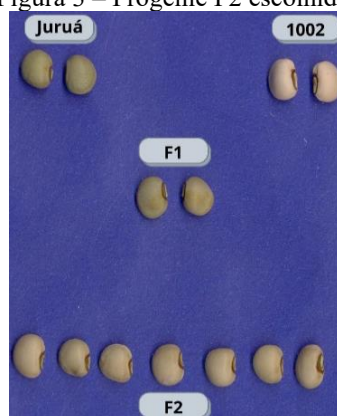
A confirmação da hibridação foi realizada por meio da identificação de bandas informativas nos perfis obtidos com marcadores ISSR, definidas como aquelas presentes no genitor masculino e ausentes no genitor feminino, confirmando o cruzamento, conforme descrito por Faleiro *et al.* (2003). Para essa análise, foram consideradas apenas as bandas com alta nitidez, assegurando maior confiabilidade na interpretação dos resultados.

4.2 Caracterização da progênie F2

4.2.1 Material vegetal e progênie F2

Foram avaliados 97 indivíduos da geração F2 (Figura 3), oriundos do cruzamento entre o cultivar BRS Juruá (CE-942), desenvolvida pela Embrapa Meio-Norte, e a linhagem 1002, introduzida no BAG-UFC, selecionado com base no potencial para a produção de feijão-verde, característica de grande importância para o estado do Ceará, onde se observa elevada demanda por esse produto por parte dos produtores. Também foram incluídos os dois genitores e três testemunhas. Como testemunhas, incluíram-se o cultivar BRS Pujante, desenvolvida pela Embrapa Meio-Norte, e duas variedades coletadas junto a produtores de feijão verde: Paulistinha e Pingo de Ouro, totalizando 102 indivíduos.

Figura 3 – Progenie F2 escolhida.



Fonte: autora, 2021.

A população F2 foi obtida a partir da autofecundação das plantas F1, realizada no primeiro semestre de 2021. O cultivo da geração F2 ocorreu no segundo semestre de 2023. Ambos os cultivos foram realizados no setor de Horticultura da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.2.2 Coleta de folhas e extração de DNA

Foram coletadas três folhas jovens dos 102 genótipos (97 indivíduos F2 do cruzamento 942 x 1002, os dois genitores e as três testemunhas), armazenadas em sacos plásticos e mantidas em freezer a -80°C para posterior extração e caracterização do DNA genômico.

Para a extração do DNA, foi utilizado o *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega, USA), seguindo as instruções do fabricante. Após a extração, a concentração e a qualidade do DNA foram avaliadas por meio do espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA), com leitura da absorção em 260 e 280 nm, e por eletroforese em gel de agarose a 1,0%, utilizando-se o fotodocumentador L-PIX Chemi (Loccus). As amostras de DNA genômico foram diluídas para uma concentração final de 10 ng/ μL e armazenadas a -20°C .

Após essa etapa, realizou-se a caracterização genética dos genótipos utilizando marcadores ISSR e SSR, por meio de PCR nas condições descritas a seguir.

4.2.3 Seleção dos marcadores ISSR, PCR e eletroforese

Foi realizada a triagem inicial de um total de 54 marcadores, sendo mantidos apenas

aqueles que apresentaram padrões de bandas nítidas, sem arrastes e sem ambiguidade na interpretação. A partir dessa etapa, foram utilizados nas análises 16 marcadores ISSR previamente selecionados com base na qualidade dos perfis de amplificação, caracterizados por fragmentos de alta intensidade e boa reprodutibilidade.

As reações de PCR foram preparadas em volume total de 20 μ L, contendo 1x de tampão de PCR; 2 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM de dNTP; 1 U de Taq DNA polimerase; 0,8 μ M de primer; 30 ng de DNA; e água ultrapura até completar o volume. A amplificação ocorreu em termociclador (Applied Biosystems, modelo Veriti 96 – Well Thermal Cycler), nas seguintes etapas: (I) desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos; (II) 40 ciclos a 94 °C por 1 minuto, anelamento por 30 segundos (variando de 39,6 °C a 58,2 °C, conforme o primer) e extensão por 1 minuto a 72 °C; e (III) extensão final por 10 minutos a 72 °C.

Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese horizontal, sob tensão de 110 V por 100 minutos, em gel de agarose a 1,4%. A visualização ocorreu em fotodocumentador L-PIX Chemi (Loccus).

4.2.4 Seleção dos marcadores SSR, PCR e eletroforese capilar

Inicialmente, foram selecionados 25 pares de marcadores SSR descritos por Li *et al.* (2001) e Sonker *et al.* (2019). Esses marcadores foram submetidos a uma triagem inicial, sendo selecionados para as análises apenas aqueles que apresentaram padrões de bandas nítidos, reprodutíveis, sem arrastes e sem ambiguidades na interpretação. Após essa etapa, foram selecionados quatro pares de marcadores SSR para avaliação da eficiência de amplificação em PCR multiplex e identificação de alelos por eletroforese capilar, considerando-se o tamanho esperado dos fragmentos amplificados, o potencial de polimorfismo e a compatibilidade das temperaturas de anelamento, a fim de evitar sobreposição entre os fragmentos amplificados. Para cada marcador, um dos primers, forward (F) ou reverse (R), foi marcado com fluoróforo para detecção dos fragmentos amplificados (Tabela 2).

Tabela 2 – Lista de marcadores SSR utilizados, suas sequências, temperatura de anelamento, cor do fluoróforo marcado e tamanho do fragmento esperado.

Marcador	Sequência forward/reverse	Ta	Fluoróforo	Tamanho do fragmento esperado
VM 36	5'-ACT TTC TGT TTT ACT CGA CAA CTC-3' 5'-GTC GCT GGG GGT GGC TTA TT -3'	60	6-FAM (azul)	150 pb
VM 37	5'-TGT CCG CGT TCT ATA AAT CAG C-3' 5'-CGA GGA TGA AGT AAC AGA TGA TC-3'	60	VIC (verde)	200 pb
VM 39	5'-GAT GGT TGT AAT GGG AGA GTC-3' 5'-AAA AGG ATG AAA TTA GGA GAG CA-3'	60	NED (amarelo)	280 pb
VM 94	5'-TCG AAC TTT GGC TTG AGG-3' 5'-TGT CGT TTT GTC CCC CAT TA-3'	60	PET (vermelho)	350 pb

Fonte: autora, 2025. Legenda: Ta: temperatura de anelamento °C; pb: pares de base.

Foi realizada uma PCR multiplex com os 4 pares de primers selecionados. As reações foram preparadas em volume total de 10 µL, contendo 1x de tampão de PCR; 2,5 mM de MgCl₂; 0,25 mM de dNTP; 1,2 U de Taq DNA polimerase; 1 µM de primer forward e 1 µM de primer reverse; 30 ng de DNA; e água ultrapura até completar o volume. A amplificação ocorreu em termociclador (Applied Biosystems, modelo Veriti 96 – Well Thermal Cycler), nas seguintes etapas: (I) desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos; (II) 38 ciclos a 94 °C por 1 minuto, anelamento por 30 segundos a 60 °C e extensão por 1 minuto a 72 °C; e (III) extensão final por 15 minutos a 72 °C.

Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese horizontal, sob tensão de 110 V por 80 minutos, em gel de agarose a 3,0%, com o objetivo de verificar os perfis de amplificação e confirmar a eficiência da PCR multiplex. A visualização ocorreu em fotodocumentador L-PIX Chemi (Loccus).

Em seguida, os produtos amplificados foram diluídos na proporção de 1:5. Posteriormente, preparou-se uma mistura contendo 1 µL da diluição da PCR, 8,7 µL de formamida e 0,3 µL do padrão molecular 600-Liz. A análise dos fragmentos de DNA foi realizada por eletroforese capilar, utilizando o sequenciador SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific).

4.2.5 Análise do polimorfismo e eficiência dos marcadores

A análise do polimorfismo dos marcadores moleculares foi realizada separadamente para os marcadores ISSR e SSR, levando em consideração as especificidades de cada marcador.

4.2.5.1 Polimorfismo utilizando marcadores ISSR

A matriz de dados binários foi construída a partir da leitura dos perfis de amplificação obtidos em gel, atribuindo-se valores “1” para presença e “0” para ausência de bandas. Com base nessa matriz, foram estimadas as frequências necessárias às análises.

Para a análise do polimorfismo, foi estimado o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) para cada marcador ISSR, conforme proposto por Anderson *et al.* (1993). O cálculo baseou-se na frequência de presença (1) e ausência (0) das bandas, considerando o caráter dominante desses marcadores. O PIC foi obtido conforme a seguinte expressão:

$$PIC_i = 1 - \sum_j p_{ij}^2$$

Em que: p_{ij} corresponde à frequência do alelo (banda) j no marcador i .

A eficiência dos marcadores foi avaliada considerando o número total de bandas geradas, o número de bandas polimórficas e o percentual de polimorfismo obtido para cada primer. Esse percentual correspondeu à razão entre o número de bandas polimórficas e o total de bandas amplificadas, multiplicada por 100.

4.2.5.2 Polimorfismo em SSR

A análise dos tamanhos dos fragmentos de DNA foi realizada por meio de eletroferograma gerado a partir dos picos obtidos na eletroforese capilar, utilizando o software Microsatellite Analysis (*Thermo Fisher Scientific*). Para os marcadores SSR, a avaliação baseou-se nos tamanhos dos fragmentos amplificados, correspondentes aos diferentes alelos observados em cada loco.

Foram registrados os alelos identificados e o número de indivíduos amplificados para cada marcador SSR, com o objetivo de verificar o desempenho dos primers selecionados e sua capacidade de amplificação na população avaliada.

4.2.6 Análise da diversidade genética

Para a caracterização genética da população F2, foi construída uma matriz de dados binários, considerando-se a presença (1) e ausência (0) de bandas obtidas pelos marcadores ISSR.

O número mínimo de fragmentos amplificados foi estimado por meio de

reamostragem, utilizando-se a correlação de Pearson entre a matriz de similaridade de Jaccard obtida com todos os fragmentos e as matrizes obtidas a partir de subconjuntos aleatórios de fragmentos, além do valor de estresse entre as matrizes de dissimilaridade, conforme Manly (1997).

A partir da matriz binária, foi calculada a distância genética utilizando o coeficiente de Jaccard. Com base na matriz de distância genética, realizou-se a análise de agrupamento pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages*), com a construção do dendrograma. O ponto de corte dos grupos foi definido segundo o critério de Mojena (1977), e o ajuste do dendrograma foi avaliado pelo coeficiente de correlação cofenética (CCC).

A estrutura genética da população F2 também foi avaliada por meio da análise de Coordenadas Principais (PCoA) e da análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA; $p < 0,05$), ambas realizadas com base na matriz de dissimilaridade genética de Jaccard.

A diversidade genética foi estimada por meio do índice de Shannon (I) e da diversidade genética de Nei (He), conforme as expressões:

$$I = -\sum p_i \ln(p_i)$$

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

Em que p_i corresponde à frequência do i-ésimo fragmento amplificado.

Todas as análises estatísticas e gráficas foram realizadas no software R (versão 2025-06-13), utilizando os pacotes “vegan” (OKSANEN *et al.*, 2025), “ade4” (Jombart, 2011), “factoextra” (Kassambara; Mundt, 2020), “proxy” (Meyer; Buchta, 2022) e “ggplot2” (Wickham, 2016).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização molecular e confirmação da hibridação das progênes F1

A análise dos marcadores ISSR revelou eficiência na detecção de polimorfismo entre os 18 indivíduos avaliados. Dentre os 37 marcadores previamente testados, 16 apresentaram polimorfismo, correspondendo a aproximadamente 54% de eficiência na avaliação. Em cada marcador, a quantidade de bandas polimórficas variou de 16% a 100%. A amplificação dos 16 marcadores resultou em um total de 131 bandas, na qual 71% destas foram polimórficas (Tabela 3). Abd El-Fattah *et al.* (2019), avaliando cinco parentais de feijão-caupi no Egito, obtiveram 68,67% de polimorfismo. Santos *et al.* (2020) encontraram um polimorfismo de 67,70% avaliando 20 variedades locais de feijão-caupi no México. Araujo *et al.* (2019), ao avaliarem a diversidade de 52 variedades locais do Brasil, obtiveram 76,25% de polimorfismo. Embora os estudos tenham sido conduzidos com indivíduos diferentes e em diferentes lugares, os valores de polimorfismo observados são próximos ao valor observado no presente estudo, indicando eficiência semelhante dos marcadores ISSR na detecção de variabilidade genética.

Tabela 3 – Sequências dos marcadores polimórficos selecionados para a caracterização de genótipos de feijão-caupi.

Marcador	Sequência (5'→ 3')	Pares de bases	Bandas geradas	Bandas polimórficas	Polimorfismo (%)	PIC
807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	200 - 1500	5	1	20,0	0,55
810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	300 - 850	6	1	16,6	0,85
811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	300 - 1500	9	4	44,4	0,54
818	CACACACACACACACAG	200 - 1000	10	10	100,0	0,92
825	ACACACACACACACACT	400 - 1500	15	14	93,3	0,81
826	ACACACACACACACACC	400 - 1500	6	5	83,3	0,54
827	ACACACACACACACACG	300 - 1000	8	4	50,0	0,94
829	TGTGTGTGTGTGTGTGC	650 - 850	3	3	100,0	0,44
840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	400 - 1500	8	6	75,0	0,74

(continua)

Tabela 3 – Sequências dos marcadores polimórficos selecionados para a caracterização de genótipos de feijão-caupi (conclusão).

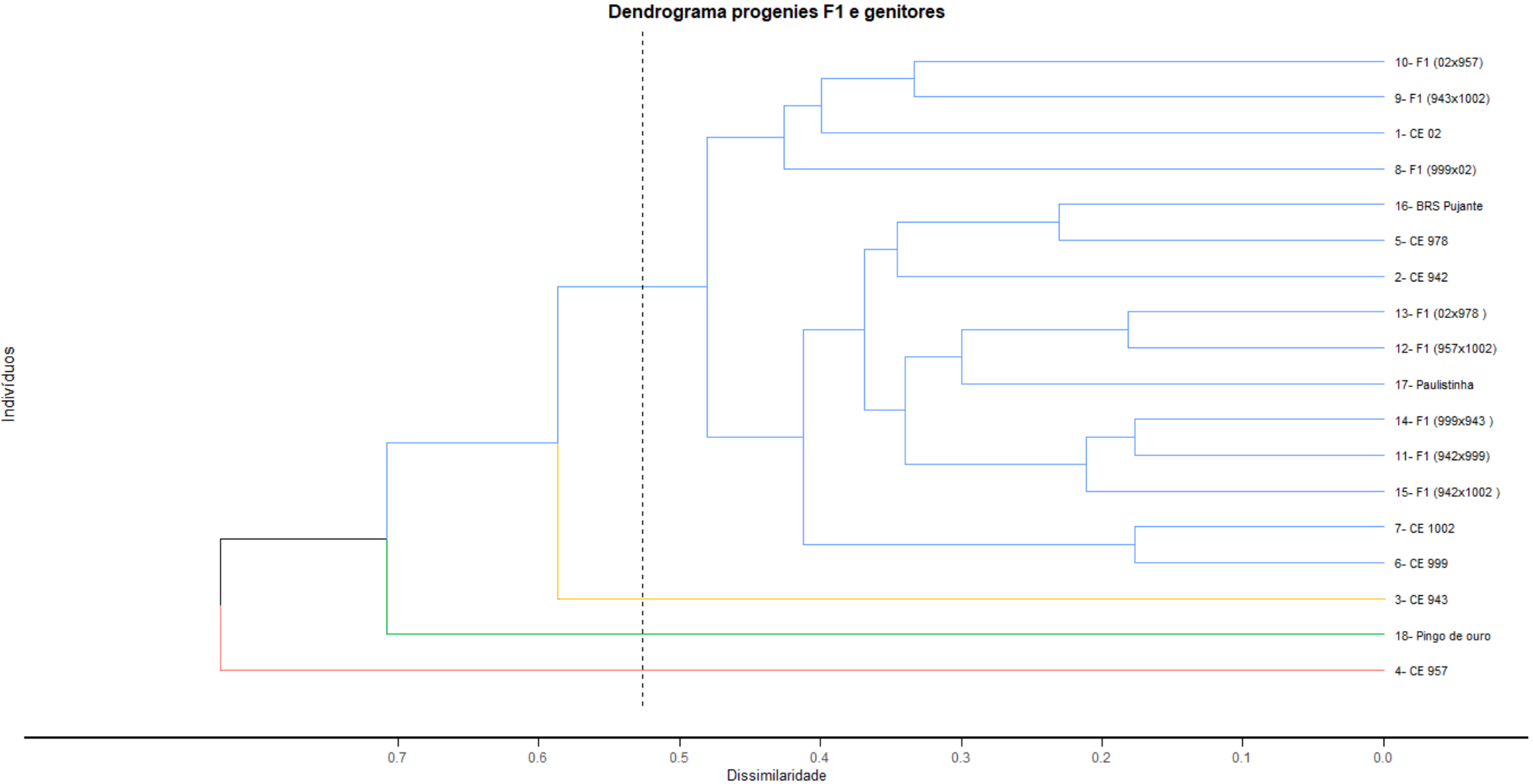
Marcador	Sequência (5'→ 3')	Pares de bases	Bandas geradas	Bandas polimórficas	Polimorfismo (%)	PIC
841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	200 - 1000	10	9	90,0	0,80
847	CACACACACACACARC	300 - 1000	8	7	87,5	0,79
858	TGTGTGTGTGTGTGTGRT	650 - 1500	8	8	100,0	0,77
873	GACAGACAGACAGACA	200 - 850	8	3	37,5	0,63
880	GGAGAGGAGAGGAGA	300 - 1500	10	7	70,0	0,75
889	DBDACACACACACAC	300 - 1500	8	4	50,0	0,42
891	HVHGTGTGTGTGTGTGT	200 - 850	9	7	77,7	0,64
TOTAL			131	93	71,0	0,70

Fonte: autora, 2024. Legenda: D = (A, G, T); H = (A, C, T); R = (A, G); V = (A, C, G); PIC: Conteúdo de Informação Polimórfica.

Os valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC) observados variaram de 0,42 a 0,94, com média de 0,70. Apenas dois marcadores foram classificados como razoavelmente informativos ($0,25 < \text{PIC} < 0,50$) e os 14 restantes com alto poder informativo ($\text{PIC} > 0,50$) (Botstein *et al.*, 1980) (Tabela 3). Esse resultado indica a alta eficiência dos marcadores utilizados para a avaliação da variabilidade genética entre os indivíduos (KUMAR *et al.*, 2020).

A partir da matriz de dissimilaridade genética, obtida pelo complemento aritmético do coeficiente de similaridade de Jaccard, os indivíduos foram agrupados pelo método hierárquico UPGMA, formando quatro grupos distintos (Figura 4). A distância genética média entre os indivíduos foi de 0,51. Os indivíduos mais similares foram 7 (CE 1002) e 6 (CE 999), com distância genética de 0,18, enquanto os mais divergentes foram 4 (CE 957) e 3 (CE 943), com distância genética de 0,92. Para a validação do dendrograma e adequação do método de agrupamento por meio do coeficiente de correlação cofenética (CCC), considerou-se o limite de 0,70 estabelecido por Rohlf (1970). O valor obtido no presente trabalho ($\text{CCC}=0,93$) confirma que o método de agrupamento escolhido foi adequado e consistente.

Figura 4 – Dendrograma de dissimilaridade genética entre os indivíduos de feijão-caupi, construído com uso do coeficiente de Jaccard algoritmo UPGMA.



Fonte: autora, 2024.

Observou-se que as progênies F1 foram agrupadas em um único grupo, juntamente com a maioria dos genitores. Esse comportamento é esperado, uma vez que a geração F1 resulta do cruzamento direto entre genitores, apresentando maior uniformidade genética. A presença de genitores no mesmo grupo pode ser explicada pelo compartilhamento de uma base genética comum, uma vez que muitos desses materiais derivam de linhagens relacionadas provenientes de programas de melhoramento (Freire Filho; Ribeiro, 2023).

O indivíduo 18 (Pingo de Ouro) formou um grupo isolado, indicando maior distância genética em relação aos demais, possivelmente por se tratar de uma variedade local ainda não incorporada a programas de melhoramento. Por outro lado, o indivíduo 4 (CE 957) também apresentou comportamento isolado, apesar de compartilhar os mesmos parentais com o indivíduo 7 (CE 1002) (Santos, 2025). Essa diferença no agrupamento pode ser explicada pelo processo de segregação e seleção ao longo das gerações, no qual diferentes plantas foram selecionadas, resultando em linhagens geneticamente distintas (Freire Filho; Ribeiro, 2023). Do ponto de vista do melhoramento genético, esse resultado evidencia que, mesmo a partir de um mesmo cruzamento, a seleção pode levar à formação de indivíduos divergentes. Além disso, os indivíduos 3 (CE 943), 18 (Pingo de ouro) e 4 (CE 957) podem ser selecionados como potenciais genitores, a fim de explorar e ampliar a variabilidade genética em programas de melhoramento.

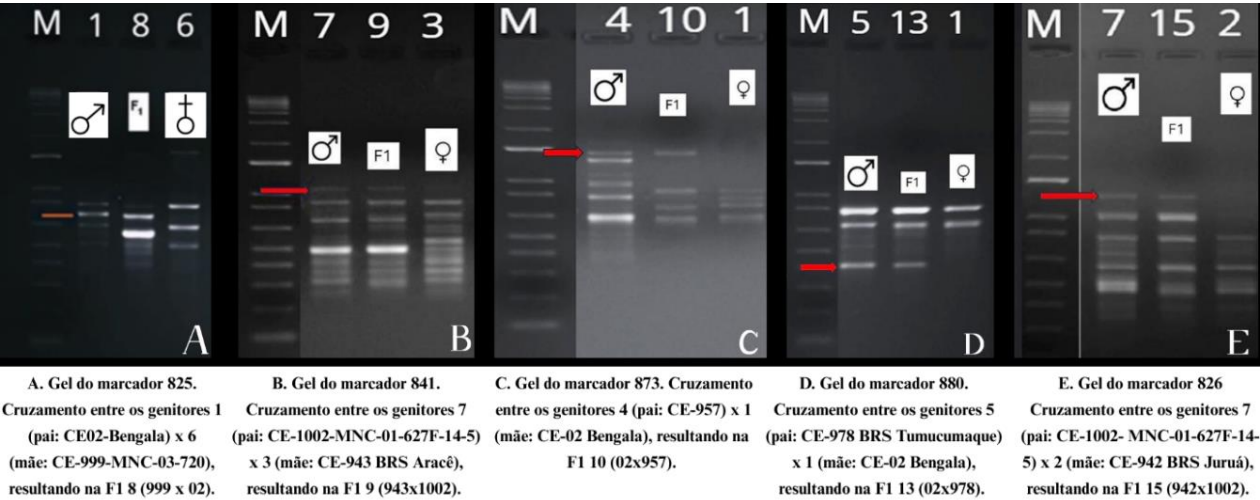
Das oito progênies F1, cinco foram selecionadas com base em características morfoagronômicas de interesse para feijão verde, como apresentar cor verde claro e formato ovoide nos grãos, correspondendo às progênies 8 (999x02), 9 (943x1002), 10 (02x957), 13 (02x978) e 15 (942x1002). Para confirmar as hibridações nas cinco progênies, foram utilizados sete marcadores ISSR (Tabela 4). Foram observados padrões de amplificação do DNA com bandas polimórficas entre os genitores, permitindo identificar a presença de fragmentos herdados do genitor masculino e confirmar as hibridações nas cinco progênies (Figura 5). A presença de bandas polimórficas compartilhadas entre genitores e progênies obtidas por meio de marcadores baseados em DNA permite distinguir híbridos verdadeiros de indivíduos autofecundados (Thakur; Sharma; Sharma, 2021). Khajudparn *et al.* (2012) utilizaram marcadores ISSR para confirmar híbridos F1 em feijão-mungo (*Vigna radiata*), espécie pertencente ao mesmo gênero do feijão-caupi, demonstrando a eficiência desses marcadores na identificação de hibridações.

Tabela 4 – Progênie F1 selecionadas com base em características morfoagronômicas de interesse e respectivos marcadores ISSR utilizados na confirmação das hibridações

Progênie F1	Marcador ISSR						
	811	818	825	826	840	880	889
8 (999x02)	x			x			
9 (943x1002)						x	x
10 (02x957)				x	x		
13 (02x978)		x	x				
15 (942x1002)			x	x			

Fonte: autora, 2024. Legenda: x: marcador que confirma a hibridação.

Figura 5 – Produtos de amplificação de amostras de DNA genômico dos genitores masculinos, possíveis F1 e dos genitores femininos, respectivamente.



Fonte: autora, 2024. Legenda: M: marcador molecular 1kb (Invitrogen); A seta vermelha indica a mesma banda formada no pai e no filho e ausente na mãe, confirmando a hibridação.

A confirmação molecular dos híbridos representa uma etapa importante em programas de melhoramento genético, pois aumenta a confiabilidade na condução das populações segregantes e reduz a possibilidade de avanços com indivíduos oriundos de autofecundação ou contaminações, otimizando as etapas de seleção em campo. De modo geral, os resultados obtidos evidenciam a eficiência dos marcadores ISSR tanto na caracterização da diversidade genética quanto na confirmação das hibridações, destacando o potencial desses marcadores para aplicações em programas de melhoramento genético, especialmente na seleção de genitores divergentes e na condução de populações segregantes, conforme também observado por Khajudparn *et al.* (2012).

5.2 Caracterização molecular de F2

5.2.1 Caracterização molecular por meio de marcador ISSR

Dos 54 marcadores ISSR avaliados, 16 foram selecionados para a caracterização genética dos 102 indivíduos de feijão-caupi. Os 16 marcadores amplificaram um total de 188 fragmentos, dos quais 166 foram polimórficos (88,30%), evidenciando a existência de variabilidade genética entre os 102 indivíduos de feijão-caupi. O número de fragmentos polimórficos variou de dois (807) a quinze (848), com uma média de 10,4 bandas por marcador. Exceto o marcador 807, todos os demais obtiveram polimorfismo acima de 77% (Tabela 5).

Tabela 5 – Sequência do marcador, bandas geradas e polimórficas dos marcadores ISSR utilizadas na caracterização dos 102 indivíduos de feijão-caupi.

Marcador	Sequência (5' → 3')	Pares de bases	Bandas geradas	Bandas polimórficas	Polimorfismo (%)	PIC
807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	200 - 1500	8	2	25,00	0,15
810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	200 - 850	12	11	91,67	0,75
816	CACACACACACACACAT	200 - 1000	12	10	83,33	0,86
818	CACACACACACACACAG	200 - 1500	13	13	100	0,85
825	ACACACACACACACACT	300 - 1500	9	7	77,78	0,75
834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	300 - 1000	11	10	90,91	0,99
835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	200 - 1000	10	9	90,00	0,94
840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	400 - 1500	12	12	100	0,69
841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	200 - 1000	13	13	100	0,85
846	CACACACACACACACART	200 - 1500	11	10	90,91	0,90
847	CACACACACACACACARC	200 - 1500	13	11	84,62	0,80
848	CACACACACACACACARG	200 - 850	17	15	88,24	0,92
856	ACACACACACACACACYA	200 - 850	8	7	87,50	0,48
857	ACACACACACACACACYG	200 - 1000	17	14	82,35	0,87
873	GACAGACAGACAGACA	300 - 1500	13	13	100	0,78
880	GGAGAGGAGAGGAGA	300 - 850	9	9	100	0,91
TOTAL			188	166	88,30	0,78

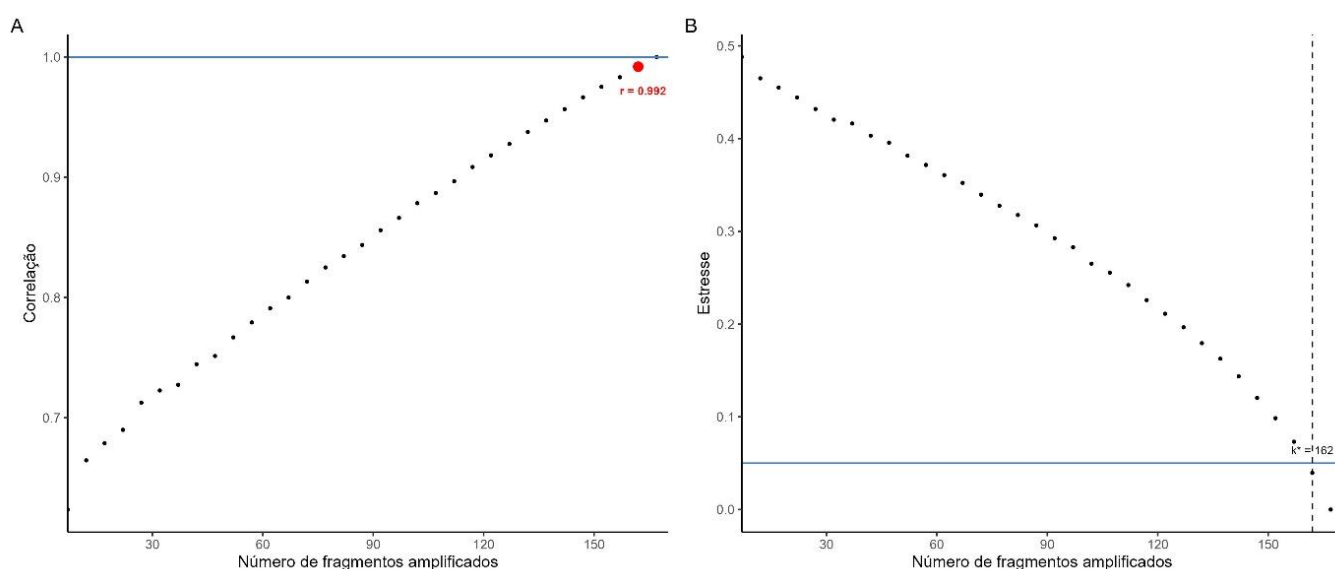
Fonte: autora, 2025. Legenda: D = (A, G, T); H = (A, C, T); R = (A, G); V = (A, C, G); Y = (C, T).

Os valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC) variaram de 0,15 a 0,99, com média de 0,78 (Tabela 5). Considerando que marcadores com valores de PIC superiores a 0,50 são apontados como altamente informativos (Botstein *et al.*, 1980), os resultados obtidos indicam que o conjunto de marcadores avaliados foi eficiente na detecção de polimorfismo

entre os indivíduos estudados, demonstrando potencial para aplicação em futuros estudos com a espécie.

O número mínimo de fragmentos amplificados necessários para uma análise confiável da diversidade genética entre os indivíduos estudados foi de 162 fragmentos, apresentando correlação de 0,992 e valor de estresse de 0,03 (Figura 6). Observou-se que a correlação aumentou gradualmente com o acréscimo de fragmentos, enquanto os valores de estresse diminuíram, estabilizando-se a partir de 162 fragmentos. No presente estudo, foram amplificados 166 fragmentos, valor superior ao mínimo necessário, evidenciando a robustez das análises realizadas. Segundo Kruskal (1964), valores de estresse iguais ou inferiores a 0,05 indicam excelente ajuste entre as matrizes, demonstrando que o número de fragmentos obtido foi suficiente para representar adequadamente a diversidade genética dos indivíduos de feijão-caupi avaliados.

Figura 6 – Estimativas das correlações entre similaridades genéticas obtidas com números crescentes de marcadores ISSR polimórficos (A) e valores de estresse, indicando o número mínimo ideal de fragmentos necessários para a análise genética dos 102 indivíduos de feijão-caupi avaliados (B).



Fonte: autora, 2025.

O índice de diversidade genética de Nei (He) apresentou valor médio de 0,201, com desvio padrão de 0,162. O índice de Shannon (I) apresentou média de 0,328 e desvio padrão de 0,215. Esses resultados demonstram a existência de variabilidade genética entre os indivíduos da população F2 e permitem a seleção de indivíduos superiores nas próximas gerações. Os valores observados estão dentro da faixa relatada para o feijão-caupi em estudos de diversidade genética utilizando marcadores ISSR. Valores próximos foram relatados por Santos *et al.* (2020)

($H_e = 0,190$ e $I = 0,300$), Hoogerheide *et al.* (2026) ($H_e = 0,265$ e $I = 0,418$) e Igwe *et al.* (2017) ($H_e = 0,320$ e $I = 0,489$). A menor diversidade genética observada na população F2 pode estar relacionada à natureza predominantemente autógama do feijão-caupi e à sua base genética estreita (Freire Filho *et al.*, 2011; Diallo *et al.*, 2024). Além disso, a menor divergência genética entre os genitores utilizados nos cruzamentos, evidenciada nas análises de similaridade genética realizadas com os parentais, pode ter contribuído para uma diversidade genética menos expressiva na população F2 (APÊNDICE A).

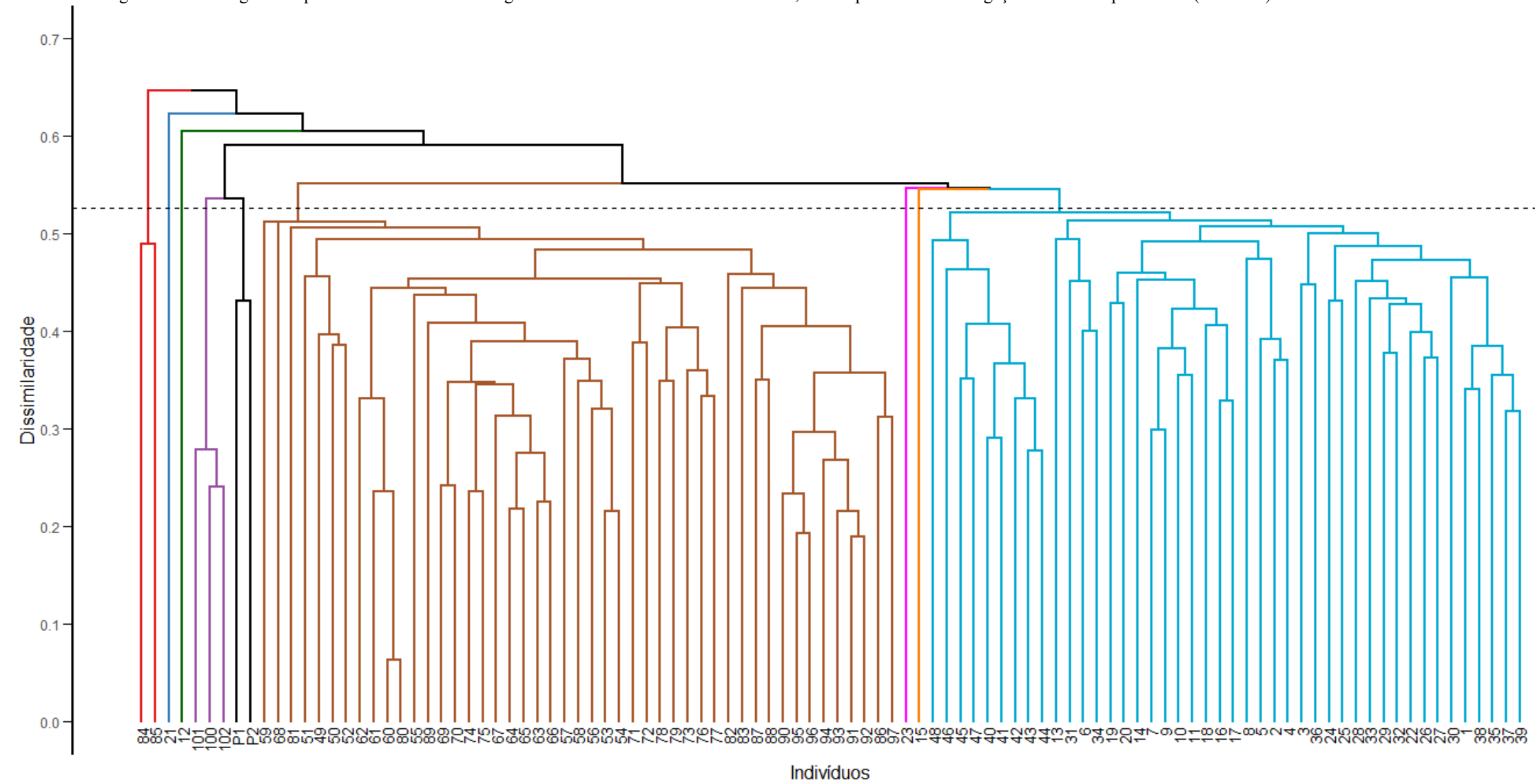
A partir do polimorfismo identificado foi possível determinar a matriz de distâncias genéticas, utilizada para a construção do dendrograma. O dendrograma obtido apresentou um coeficiente de correlação cofenética (CCC) de 0,75, valor considerado adequado, segundo Manly (1997), por indicar boa representatividade entre a matriz de distâncias e o agrupamento formado. Com base no ponto de corte (0,53), foi possível separar em nove grupos distintos os indivíduos avaliados (Figura 7). A distância genética média entre os indivíduos foi 0,53 e os indivíduos mais similares foram o 80 e 60, com distância genética de 0,06, enquanto os mais divergentes foram o 60 e P1 (942), com distância genética de 0,81.

Os parentais P1 (942) e P2 (1002) permaneceram agrupados no mesmo grupo, indicando similaridade genética entre eles, com distância genética de 0,43. Esse resultado reforça a hipótese levantada anteriormente para os índices de diversidade genética observados, em que a contribuição dos genitores não foi tão expressiva nos indivíduos da população F2 como era esperado. As testemunhas 100, 101 e 102, correspondentes à BRS Pujante, Paulistinha e Pingo de Ouro, respectivamente, também apresentaram proximidade genética, formando agrupamento próprio no dendrograma. Além disso, os indivíduos 84 e 85 apresentaram maior proximidade genética com as testemunhas.

Os indivíduos 12, 15, 21 e 23, formaram grupos isolados, indicando maior divergência genética em relação aos demais acessos, sendo estes de interesse para avançar nas próximas gerações. Observou-se a formação de grupos com grande número de indivíduos da população F2, especialmente os grupos 6 (marrom) e 9 (azul royal), indicando maior similaridade e proximidade genética entre esses indivíduos. Apesar disso, verificou-se a formação de subgrupos dentro desses agrupamentos, evidenciando variabilidade genética entre indivíduos da população F2, resultante da segregação e da recombinação gênica, que promoveram a formação de indivíduos geneticamente distintos. Resultados semelhantes têm sido relatados em estudos de diversidade genética em feijão-caupi utilizando marcadores ISSR. Araujo *et al.* (2019), ao avaliarem 57 genótipos de feijão-caupi, observaram a formação de seis grupos, sendo que o grupo 1 concentrou 51 indivíduos, evidenciando elevada similaridade

genética e reduzidas distâncias genéticas entre as variedades analisadas. Hoogerheide *et al.* (2026) verificaram a formação de cinco grupos distintos em 20 genótipos de feijão-caupi, além da presença de subgrupos dentro dos agrupamentos principais, indicando diferentes níveis de similaridade e divergência genética entre os materiais avaliados

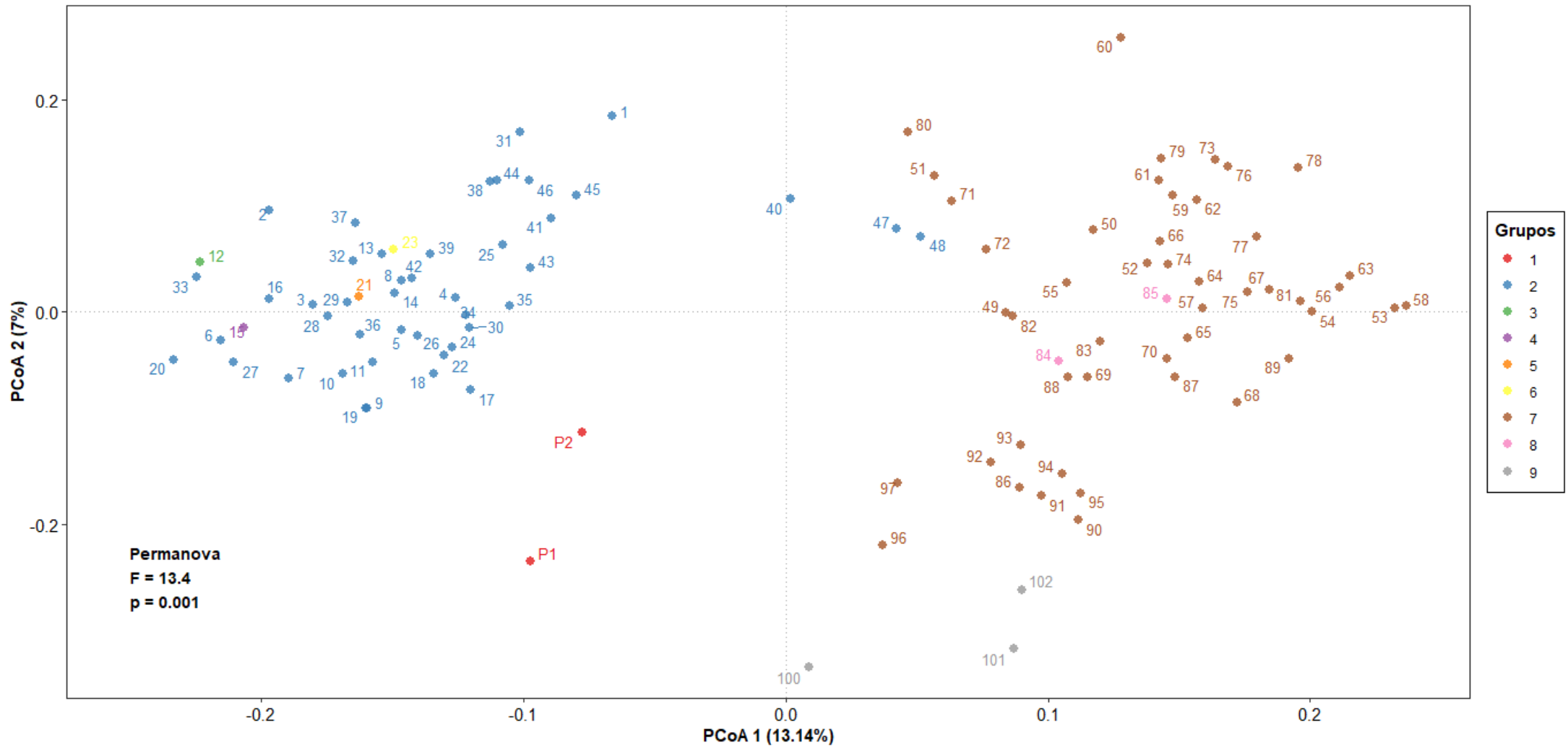
Figura 7 – Dendrograma representativo das distâncias genéticas dos 102 indivíduos estudados, obtido pelo método da ligação média não ponderada (UPGMA).



Fonte: autora, 2025.

A análise de coordenadas principais (PCoA; $p = 0,001$) explicou 20,14% da variação total, sendo 13,14% referentes ao eixo 1 e 7% ao eixo 2 (Figura 8). Observou-se uma separação espacial clara entre os indivíduos distribuídos nos extremos do eixo 1, indicando a presença de divergência genética entre os grupos formados. Os indivíduos agrupados no grupo 7 apresentaram distribuição mais concentrada e afastada dos demais grupos, evidenciando maior similaridade genética entre si. Por outro lado, os indivíduos localizados no lado esquerdo do gráfico apresentaram maior dispersão espacial, sugerindo maior variabilidade genética entre os indivíduos avaliados. A separação dos grupos pelo PCoA foi semelhante ao observado no dendrograma UPGMA (Figura 7), evidenciando estruturação genética significativa entre os indivíduos avaliados.

Figura 8 – Estrutura da diversidade genética dos 102 indivíduos de feijão-caupi com base na análise de coordenadas principais (PCoA).



Fonte: autora, 2026.

5.2.2 Amplificação e identificação de alelos com marcadores SSR

Os marcadores SSR avaliados apresentaram diferenças na eficiência de amplificação entre os indivíduos analisados. O marcador VM 36 apresentou maior eficiência, com amplificação em 92 dos 102 indivíduos avaliados, permitindo a identificação dos alelos 144 e 154 pb.

Os marcadores VM 37, VM 39 e VM 94 apresentaram menor número de indivíduos amplificados, com detecção em 23, 25 e 23 indivíduos, respectivamente. Os alelos identificados corresponderam a 276/278 pb para VM 37, 208/210 pb para VM 39 e 352/353 pb para VM 94 (Tabela 6).

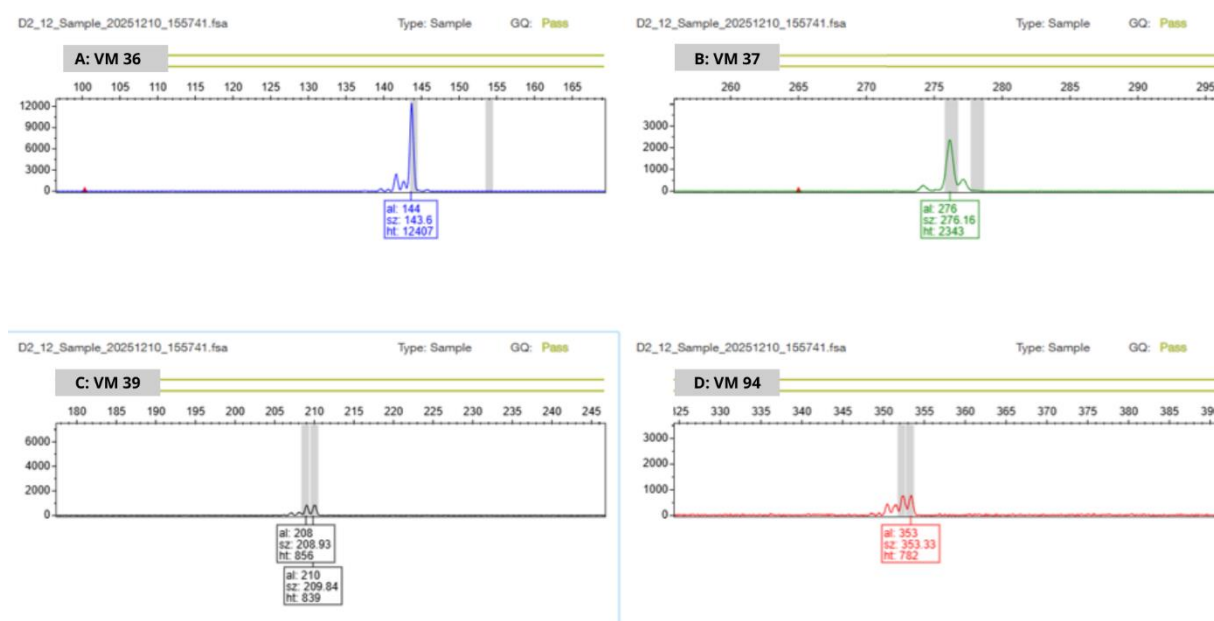
Tabela 6 – Número de indivíduos amplificados e alelos identificados para os marcadores SSR avaliados

Marcador	Nº de indivíduos amplificados	Alelos identificados (pb)
VM 36	92	144/154
VM 37	23	276/278
VM 39	25	208/210
VM 94	23	352/353

Fonte: autora, 2026. Legenda: pb: pares de base.

Os eletroferogramas obtidos por eletroforese capilar permitiram a visualização dos picos correspondentes aos alelos identificados nos marcadores SSR avaliados (Figura 9).

Figura 9 – Eletroferograma representativo dos picos correspondentes aos alelos identificados nos marcadores SSR avaliados.



Fonte: autora, 2026.

As diferenças observadas entre os marcadores SSR indicam que, embora tenha sido possível identificar alelos por meio da PCR multiplex associada à eletroforese capilar, alguns primers ainda necessitam de ajustes nas condições da reação para obtenção de resultados mais satisfatórios.

O melhor desempenho observado para o marcador VM 36 sugere maior estabilidade nas condições utilizadas, enquanto os marcadores VM 37, VM 39 e VM 94 apresentaram menor eficiência, possivelmente em função da especificidade dos primers, competição entre locos durante a multiplexagem ou necessidade de ajustes metodológicos nas condições da PCR.

Apesar dessas limitações, os resultados demonstram o potencial da técnica para identificação de alelos microssatélites em feijão-caupi, podendo subsidiar estudos futuros após otimização das condições experimentais.

6. CONCLUSÃO

Os marcadores ISSR foram eficientes na caracterização molecular dos indivíduos de feijão-caupi avaliados nas gerações F1 e F2, permitindo a confirmação dos híbridos e a avaliação da variabilidade genética entre os indivíduos analisados

Os indivíduos 12, 15, 21 e 23 da geração F2 destacaram-se por apresentarem maior divergência genética em relação aos demais genótipos avaliados, demonstrando potencial para avanço nas próximas gerações e possível utilização em estratégias de seleção visando à ampliação da variabilidade genética. A variabilidade observada na população F2 evidencia o potencial dessa geração para a seleção de genótipos superiores em programas de melhoramento genético.

A técnica de PCR multiplex associada à eletroforese capilar demonstrou potencial para identificação de alelos microssatélites em feijão-caupi, podendo subsidiar estudos futuros após a otimização das condições experimentais e padronização das análises.

De forma geral, os resultados obtidos contribuem para o conhecimento da diversidade genética em feijão-caupi e fornecem informações relevantes para programas de melhoramento genético da cultura, especialmente na identificação de indivíduos geneticamente divergentes e promissores para avanço nas próximas gerações.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-FATTAH, B. E. S.; HARIDY, A. G.; EL-RAWY, M. A. Relationships between hybrid performance and genetic distance revealed by morphological and molecular markers in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). **Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology**, Mansoura, v. 10, n. 4, p. 89-101, 2019.
- ALMEIDA, C. M. A. de. *et al.* Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. spe., p. 1771–1776, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542009000700012>. Acesso em: 20 out. 2024.
- ANDERSON, J. A. *et al.* Optimizing parental selection for genetic linkage maps. **Genome**, Ottawa, v. 36, p. 181-186, 1993. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18469981/>. Acesso em: 16 ago. 2025.
- ARAÚJO, L. B. R. *et al.* Agronomic potential and genetic diversity of landraces of cowpea of the state of Ceará. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 32, n. 3, p. 698-708, 2019. Disponível: <https://doi.org/10.1590/1983-21252019v32n314rc>. Acesso em: 05 jan. 2026.
- ASADOVA, A. *et al.* Molecular Characterization of *Vigna unguiculata* (L.) Walp Collection based on ISSR Markers. **Agricultural Reviews**, Índia, v. 45, n. 2, p. 354-359, 2024. DOI: 10.18805/ag.RF-241. Disponível em: <https://arccjournals.com/journal/agricultural-reviews/RF-241>. Acesso em: 15 jan. 2025.
- BERED, F. *et al.* Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 3, p. 513–520, 1997.
- BONETT, L. P. *et al.* Divergência genética em germoplasma de feijoeiro comum coletado no Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 547-560, 2006. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/4457/445744082005.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2024.
- BORÉM, A; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 6. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2013.
- BOUKAR, O. *et al.* Cowpea (*Vigna unguiculata*): Genetics, genomics and breeding. **Plant Breeding**, Estados Unidos, v. 138, n. 4, p. 415-424, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pbr.12589>. Acesso em: 05 maio 2024.
- BOUKAR, O. *et al.* Introgression Breeding in Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 11, art. 567425, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2020.567425/full>. Acesso em: 08 jul. 2024.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Oxford, v. 32, n.3, p. 314-331, 1980. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6247908/>. Acesso em: 15 fev. 2026.
- CARVALHO, L. C. B. *et al.* Genotype x environment interaction in cowpea by mixed models.

Revista Ciência Agronômica, Fortaleza, v. 48, n. 5, p. 872-878, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20170103>. Acesso em: 17 out. 2024.

CHHEDA, H. R.; FATOKUN, C. A. Numerical analysis of variation patterns in okra (*Abelmoschus esculentus* [L.] Moench). **Botanical Gazette**, Chicago, v. 143, n. 2, p. 253-261, 1982. Disponível em: <https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/337298>. Acesso em: 20 out. 2024.

CHAMBERLAIN, J. S. *et al.* Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 16, n. 23, p. 11141-11156, 1988. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/16/23/11141/1142578>. Acesso em: 07 jan. 2025.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**: safra 2022/23. Brasília, DF, v. 10, n. 12, décimo segundo levantamento, 2023. Disponível em: www.conab.gov.br. Acesso em: 12 jun. 2024.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**: safra 2024/25. Brasília, DF, v. 12, n. 12, décimo segundo levantamento, 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/conab/pt-br/atuacao/informacoes-agropecuarias/safras/safra-de-graos/boletim-da-safra-de-graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: 15 dez. 2025.

COSTA, G. *et al.* Chemical composition, dietary fiber and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. **Food Chemistry**, Oxford, v. 94, n.3, p. 327-330, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814604008519>. Acesso em: 05 maio 2024.

COSTA, D. F. *et al.* Genetic diversity and selection of ISSR primers in a natural mangaba population (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 37, n. 4, p. 970-976, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0100-2945-246/14>. Acesso em: 23 maio 2024.

DIALLO, S. *et al.* Genetic diversity and population structure of cowpea mutant collection using SSR and ISSR molecular markers. **Scientific Reports**, Londres, v. 14, n. 1, art. 31833, 2024. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-024-83087-y>. Acesso em: 10 dez. 2025.

EMBRAPA. **Feijão-caupi**: Melhoramento genético para o avanço da cultura feijão-caupi. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2016. 11 p. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1047752>. Acesso em: 12 jun. 2024.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. 1. ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p. ISBN 978-85-7075-035-8.

FAOSTAT. **Food and agriculture organization of the United Nations**. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Acesso em: 29 maio 2026.

- FEITOSA, F. R. C.; GARITA, S. A.; ARAÚJO, R. B.; GUIMARÃES, M. A. Feijão de metro: hortaliça-leguminosa indicada para climas quentes. **Revista Campo & Negócios Hortifruti**, v. 4, p. 32-35, 2015. Disponível em: <https://camponegocios.com/feijao-de-metro-e-uma-hortalica-leguminosa-indicada-para-climas-quentes/>. Acesso em: 29 ago. 2025.
- FELIX, F. C. *et al.* Aplicações de marcadores ISSR em estudos de diversidade genética de *Pityrocarpa moniliformis*. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 33, n. 4, p. 1017-1024, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1983-21252020v33n417rc>. Acesso em: 07 jul. 2024.
- FREIRE FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi. In: ARAÚJO, J. P. P. de; WATT, E. E. **O caupi no Brasil**. Goiânia: EMBRAPA-CNPAF, 1988. p. 26-46.
- FREIRE FILHO, F. R. *et al.* Melhoramento Genético. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológicas, 2005. cap. 1, p. 29-92.
- FREIRE FILHO, F. R. *et al.* **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011.
- FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q. Cultivares de feijão-caupi disponibilizadas no Brasil no período de 1968 a 2020. In: FREIRE FILHO, Francisco Rodrigues; RIBEIRO, Valdenir Queiroz. **Feijão-Caupi na Embrapa Meio-Norte: melhoramento, cultivares lançadas, genealogias e base genética**. Brasília, DF: Embrapa, 2023. p. 465-523.
- HOOGERHEIDE, E. S. S. *et al.* Seleção de genitores de feijão-caupi com base em marcadores moleculares e produtividade de grãos. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 39, e14073, 2026. DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-21252026v39i14073rc>. Disponível em: <https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/caatinga/article/view/14073>. Acesso em: 20 maio 2026.
- IGWE, D. O. *et al.* Assessment of genetic diversity in *Vigna unguiculata* L. (Walp.) accessions using inter-simple sequence repeat (ISSR) and start codon targeted (SCoT) polymorphic markers. **BMC Genetics**, Londres, v. 18, n. 1, 2017. DOI: 10.1186/s12863-017-0567-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29149837/>. Acesso em: 17 maio 2026.
- IPGRI. Descriptors for banana (*Musa spp.*). **International Plant Genetic Resources Institute**, 1996. 55 p.
- JAYATHILAKE, C. *et al.* Cowpea: an overview on its nutritional facts and health benefits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Londres, v. 98, n. 13, p. 4793-4806, 2018. DOI: 10.1002/jsfa.9074. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29656381/>. Acesso em: 02 fev. 2025.
- JOMBART, T.; AHMED, I. Adegnet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 27, n. 21, p. 3070-3071, 2011. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr521. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21926124/>. Acesso em: 13 mar. 2026.
- KALLURU, S. *et al.* Study of Genetic variability parameters in F3 generation of interspecific

hybrids in cowpea [*Vigna spp.*]. **Biological Forum – an International Journal**, Índia, v. 14, n. 3, p. 1444-1450, 2022. Disponível em:

[https://www.researchtrend.net/bfij/pdf/253%20Study%20of%20Genetic%20Variability%20Parameters%20in%20F3%20Generation%20of%20Interspecific%20Hybrids%20in%20Cowpea%20\[Vigna%20spp.\]%20Sudhamani%20Kalluru.pdf](https://www.researchtrend.net/bfij/pdf/253%20Study%20of%20Genetic%20Variability%20Parameters%20in%20F3%20Generation%20of%20Interspecific%20Hybrids%20in%20Cowpea%20[Vigna%20spp.]%20Sudhamani%20Kalluru.pdf). Acesso em: 08 nov. 2025.

KASSAMBARA, A.; MUNDT, F. factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. **Vienna: R Foundation for Statistical Computing**, 2020. R package version 1.0.7. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>. Acesso em: 19 abr. 2026.

KHAJUDPARN, P. *et al.* Application of ISSR markers for verification of F1 hybrids in mungbean (*Vigna radiata*). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 3, p. 3329-3338, 2012. DOI: doi: 10.4238/2012.September.17.3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23079826/>. Acesso em: 15 set. 2024.

KULKARNI, K. P. *et al.* Harnessing the potential of forage legumes, alfalfa, soybean, and cowpea for sustainable agriculture and global food security. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 9, art. 3114, 2018. DOI: 10.3389/fpls.2018.01314. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2018.01314/full>. Acesso em: 15 out. 2024.

KUMAR, S. *et al.* Identification of polymorphic SSR markers in elite genotypes of pearl millet and diversity analysis. **Ecological Genetics and Genomics**, Amsterdã, v. 14, art. 100051, 2020. DOI: 10.1016/j.egg.2019.100051. Disponível em: <https://oar.icrisat.org/11396/1/main.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2026.

KRUSKAL, J. B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. **Psychometrika**, Cambridge, v. 29, n. 1, p. 1-27, 1964. Disponível em: http://cda.psych.uiuc.edu/psychometrika_highly_cited_articles/kruskal_1964a.pdf. Acesso em: 20 maio 2026.

LI, C. D. *et al.* Determining genetic similarities and relationships among cowpea breeding lines and cultivars by microsatellite markers. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 1, p. 189-197, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.2135/cropsci2001.411189x>. Acesso em: 15 mar. 2025.

LONARDI, S. *et al.* The genome of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). **The Plant Journal**, Oxford, v. 98, n. 5, p. 767-782, 2019. DOI: 10.1111/TPJ.14349. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31017340/>. Acesso em: 10 maio 2026.

MAFAKHERI K. *et al.* Assessment of genetic diversity in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) germplasm using morphological and molecular characterisation. **Cogent Food Agriculture**, v. 3, n. 1, 2017. DOI: 10.1080/23311932.2017.1327092. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23311932.2017.1327092>. Acesso em: 19 set. 2024.

MANLY, B. F. J. **Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in Biology**. 2. ed. Londres: Chapman and Hall, 1997. 339 p. ISBN: 9780429329203.

MEDEIROS, C. da F. L.; CARDOSO, M. A.; FERREIRA, P. C. G. Uso de microssatélites em estudos de biologia da conservação. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, p. 25-36, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/floram/a/965x4z6g8HsxWKksXsr3Kgs/?lang=pt>. Acesso em: 14 abr. 2025.

MEYER, D.; BUCHTA, C. proxy: Distance and Similarity Measures. **Vienna: R Foundation for Statistical Computing**, 2022. R package version 0.4-27. DOI: 10.32614/CRAN.package.proxy. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=proxy>. Acesso em: 10 mar. 2026.

NASCIMENTO, F. S. S *et al.* Estimativa da diversidade de variedades tradicionais de feijão-caupi do Acre com marcadores SSR. **Scientia Naturalis**, Rio Branco, v. 5, n. 1, p. 287-302, 2023. DOI: <https://doi.org/10.29327/269504.5.1-20>. Disponível em: <https://periodicos.ufac.br/index.php/SciNat/article/view/6529>. Acesso em: 18 nov. 2024.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973. DOI: 10.1073/pnas.70.12.3321. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4519626/>. Acesso em: 16 mar 2026.

OKSANEN, J. *et al.* vegan: Community Ecology Package. **Vienna: R Foundation for Statistical Computing**, 2025. R package version 2.7-1. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>. Acesso em: 19 abr. 2026.

OLIVEIRA, A. J. *et al.* Principais marcadores moleculares. **Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, v. 10, n. 15, p. 1-7, 2021. DOI:10.33448/rsd-v10i15.23633. Disponível em: <https://rsdjournal.org/rsd/article/download/23633/20295/277083>. Acesso em: 05 set. 2025.

OUBORG, N. J.; PIQUOT, Y.; VAN GROENENDAEL, J. M. Populations genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. **Journal of Ecology**, Londres, v.87, n. 4, p. 551-568, 1999. Disponível em: <https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2745.1999.00389.x>. Acesso em: 01 dez. 2024.

PADULOSI, S.; NG, N. Q. Origin, taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SINGH, B. B. *et al.* **Advances in cowpea research**. Ibadan, 1997. p. 1-12.

PESSOA, A. M. D. S. *et al.* Genetic divergence among cowpea accessions using phenotypic, molecular, and nutritional traits. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 72, n. 5, p. 5163-5177, 2025a. DOI: 10.1007/s10722-024-02267-x. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/386047908_Genetic_divergence_among_cowpea_accessions_using_phenotypic_molecular_and_nutritional_traits. Acesso em: 20 jan. 2026.

PESSOA, A. M. D. S. *et al.* Selection of hybrids of *Vigna unguiculata* (L.) Walp for snap bean production. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, São Cristovão, v. 25, n. 2, p. 57-64, 2025b. Disponível em: <https://revistabioterra.blogspot.com/>. Acesso em: 12 jan. 2026.

QUEIROZ, S. C. N.; JARDIM, I. C. S. F. Eletroforese capilar. **Revista Chemkeys**, Campinas,

SP, n. 8, p. 1-9, 2018. DOI: 10.20396/chemkeys.v0i8.9649. Disponível em: <https://econtents.sbu.unicamp.br/inpec/index.php/chemkeys/article/view/9649>. Acesso em: 18 mar. 2026.

R Core Team. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2025. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 29 mar. 2026.

RICK, C. M.; YODER, J. I. Classical and molecular genetics of the tomato highlights and perspectives. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 22, p. 281-300, 1988. DOI: doi: 10.1146/annurev.ge.22.120188.001433. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3071250/>. Acesso em: 10 jun. 2024.

SAHU, M. *et al.* Molecular characterization of cowpea genotypes for genetic diversity using RAPD and ISSR techniques. **Legume Research**, Karnal, v. 49, n. 4, p. 566-574, 2026. DOI: 10.18805/LR-5619. Disponível em: <https://arccjournals.com/journal/legume-research-an-international-journal/LR-5619>. Acesso em: 18 maio 2026.

SANTHY, V.; SANDRA, N.; RAVISHANKAR, K. V.; CHIDAMBARA, B. Molecular techniques for testing genetic purity and seed health. *In*: DADLANI, M.; YADAVA, D. K. (eds.). **Seed science and technology: biology, production, quality**. Singapura: Springer Nature Singapore, 2023. p. 365-389. DOI: 10.1007/978-981-19-5888-5_15.

SANTOS, L. F. C. *et al.* Genetic diversity and structure analysis of *Vigna unguiculata* L. (Walp.) landraces from southeastern Mexico using ISSR markers. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, Cambridge, v. 18, n. 4, p. 201-210, 2020. DOI:10.1017/S147926212000026X. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/plant-genetic-resources/article/abs/genetic-diversity-and-structure-analysis-of-vigna-unguiculata-l-walp-landraces-from-southeastern-mexico-using-issr-markers/5095645CBBF85D86970E1ACF91491A96>. Acesso em: 04 maio 2026.

SANTOS, V. O. *et al.* Non-destructive method for extracting DNA from cowpea seeds. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 55, e82648, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-40632025v5582648>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pat/a/C97TQzkGXnSzdCf8VTvcnPm/?lang=en>. Acesso em: 20 maio 2026.

SARR, A. *et al.* Genetic diversity and population structure analyses of wild relatives and cultivated cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) from Senegal using simple sequence repeat markers. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 39, n.1, p. 112-124, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11105-020-01232-z>. Acesso em: 02 fev. 2025.

SHEN, C. H. Amplification of nucleic acids. *In*: SHEN, C. H. **Diagnostic Molecular Biology**. 2. ed. Cambridge, MA: Academic Press, 2023. p. 259-293.

SILVA, M. R. DA. *et al.* Seleção de primers ISSR para uso em genomas de camucamuzeiro. *In*: **Seminário de iniciação científica e seminário de pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental**, 17., 2013, Belém, PA. **Anais [...]**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2013.

SMITH, A.; NELSON, R. J. Capillary Electrophoresis of DNA. **Current Protocols in Molecular Biology**, Nova York, v. 68, n. 1, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18428903/>. Acesso em: 08 dez. 2024.

SONKER, S.; SHARMA, T.; TANDAN, N. SSR based molecular characterization and diversity analysis of cowpea. **Plant Archives**, Índia, v. 19, n. 1, p. 995-1001, 2019.

SOUZA, D. C. L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: Uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Vila Clementino, v. 17, n. 3, p. 495-503. 2015. DOI: https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_071. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpm/a/jpTYbQCsxDLdKGjttM6TNmF/?format=html&lang=pt>. Acesso em: 02 fev. 2025.

SOUZA, T. L. P. O. de. Uso de marcadores moleculares no melhoramento de plantas para resistência a nematoides. In: **XXXVI Congresso Brasileiro de Nematologia**, 2019, Caldas Novas. **Anais [...]**. Nematoides: da Ciência ao Campo. Campinas: Infobibos, 2019.

TANTASAWAT, P. *et al.* Variety identification and comparative analysis of genetic diversity in yardlong bean (*Vigna unguiculata* spp. *sesquipedalis*) using morphological characters, SSR and ISSR analysis. **Scientia Horticulturae**, Amsterdã, v. 124, n. 2, p. 204-216, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423809005688>. Acesso em: 07 ago. 2025.

THAKUR, S.; SHARMA, J. D.; SHARMA, K. D. Confirmation of hybridity using DNA-based markers is essential in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **The Pharma Innovation Journal**, Índia, v. 10, n. 12, p. 3022-3025, 2021. Disponível em: <https://www.thepharmajournal.com/archives/2021/vol10issue12/PartAP/11-1-468-675.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2026.

TOMAZ, F. L. DE. S. *et al.* Indication of cowpea cultivars for the production of dry grain in the state of Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 53, e20207802, p. 1-12, 2022. DOI: <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20220023>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rca/a/PSnpPG5DKhnBtkf8RrLjTJ/?format=html&lang=en>. Acesso em: 03 jun. 2025.

TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J. O uso de marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 12, n. 1, p. 1-5, 2013. Disponível em: https://e-revista.unioeste.br/index.php/scientiaagraria/pt_BR/article/view/4552. Acesso em: 08 out. 2024.

UMA, M. S. *et al.* SSR marker aided parental polymorphic survey for rust resistance in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). **Electronic Journal of Plant Breeding**, Índia, v. 2, n. 3, p. 326-333, 2011. Disponível em: <https://www.ejplantbreeding.org/index.php/ejpb/index>. Acesso em: 20 abr. 2024.

WANG, H.-Z. *et al.* Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Scientia Horticulturae**,

Amsterdã, v. 122, n. 3, p. 440-447, 2009. DOI: 10.1016/j.scienta.2009.06.005. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/222537345_Phylogenetic_study_and_molecular_identification_of_31_Dendrobium_species_using_inter-simple_sequence_repeat_ISSR_markers. Acesso em: 03 mar. 2025.

WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**. Nova York: Springer-Verlag, 2016. Cham: Springer International Publishing, 2016. DOI: 10.1007/978-3-319-24277-4.

WOLFE, A. D. ISSR techniques for evolutionary biology. **Methods in Enzymology**, v. 395 n.1, 134–144. 2005.

WOLFE, A. D. ISSR techniques for evolutionary biology. *In*: ZIMMERMAN, E.; KIMMEL, A. R. (ed.). **Methods in Enzymology**. Amsterdã: Elsevier Academic Press, 2005. v. 395, p. 134-144. DOI: 10.1016/S0076-6879(05)95009-X.

APÊNDICE A – MATRIZ DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE AS PROGÊNIES F1 E SEUS GENITORES

Indivíduos	1- CE 02	6- CE 999	8- F1 (999x02)	3- CE 943	7- CE 1002	9- F1 (943x1002)	4- CE 957	10- F1 (02x957)	2- CE 942	11- F1 (942x999)	12- F1 (957x1002)	14- F1 (999x943)	15- F1 (942x1002)	5- CE 978	13- F1 (02x978)	16- BRS Pujante	17- Paulistinha	18- Pingo de ouro
1- CE 02	1																	
6- CE 999	0,52	1,00																
8- F1 (999x02)	0,54	0,47	1,00															
3- CE 943	0,42	0,37	0,33	1,00														
7- CE 1002	0,52	0,82	0,57	0,38	1,00													
9- F1 (943x1002)	0,64	0,50	0,63	0,41	0,52	1,00												
4- CE 957	0,24	0,18	0,18	0,08	0,13	0,14	1,00											
10- F1 (02x957)	0,57	0,63	0,55	0,41	0,60	0,67	0,14	1,00										
2- CE 942	0,52	0,56	0,38	0,38	0,55	0,46	0,17	0,52	1,00									
11- F1 (942x999)	0,48	0,53	0,39	0,33	0,57	0,48	0,30	0,55	0,65	1,00								
12- F1 (957x1002)	0,64	0,67	0,57	0,50	0,68	0,59	0,20	0,67	0,61	0,64	1,00							
14- F1 (999x943)	0,57	0,50	0,41	0,41	0,60	0,58	0,19	0,58	0,60	0,82	0,75	1,00						
15- F1 (942x1002)	0,52	0,53	0,43	0,36	0,63	0,53	0,20	0,53	0,72	0,77	0,70	0,81	1,00					
5- CE 978	0,50	0,65	0,42	0,48	0,59	0,44	0,17	0,57	0,67	0,70	0,65	0,65	0,60	1,00				
13- F1 (02x978)	0,52	0,77	0,44	0,50	0,68	0,52	0,15	0,59	0,68	0,64	0,82	0,67	0,62	0,73	1,00			
16- BRS Pujante	0,59	0,47	0,44	0,50	0,53	0,57	0,15	0,75	0,64	0,62	0,56	0,57	0,62	0,77	0,56	1,00		
17- Paulistinha	0,46	0,53	0,36	0,43	0,55	0,45	0,14	0,53	0,63	0,58	0,70	0,71	0,65	0,60	0,70	0,62	1,00	
18- Pingo de ouro	0,21	0,25	0,20	0,33	0,25	0,28	0,20	0,28	0,32	0,33	0,22	0,28	0,29	0,37	0,27	0,50	0,29	1,00

Fonte: autora, 2026.