

**SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE
CULTIVARES DE FEIJÃO DO GRUPO
CARIOCA POR MEIO DE MARCADORES
MORFOLÓGICOS E MOLECULARES
VISANDO A CERTIFICAÇÃO DA PUREZA
GENÉTICA**

ELISA SERRA NEGRA VIEIRA

2000

49286

MFN 34562

ELISA SERRA NEGRA VIEIRA

**SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE CULTIVARES DE FEIJÃO DO
GRUPO CARIOCA POR MEIO DE MARCADORES MORFOLÓGICOS
E MOLECULARES VISANDO A CERTIFICAÇÃO DA PUREZA
GENÉTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras, como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em Agronomia,
área de concentração Fitotecnia, para obtenção
do título de "Mestre".

Orientadora

Édila Vilela de Resende Von Pinho

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2000

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Vieira, Elisa Serra Negra

Similaridade genética entre cultivares de feijão do grupo carioca por meio de marcadores morfológicos e moleculares visando a certificação da pureza genética / Elisa Serra Negra Vieira. -- Lavras : UFLA, 2000.

84 p. : il.

Orientadora: Édila Vilela de Resende Von Pinho.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Semente. 2. *Phaseolus vulgaris*. 3. Identificação de cultivar. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.65221

ELISA SERRA NEGRA VIEIRA

**SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE CULTIVARES DE FEIJÃO DO
GRUPO CARIOCA POR MEIO DE MARCADORES MORFOLÓGICOS E
MOLECULARES VISANDO A CERTIFICAÇÃO DA PUREZA GENÉTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras, como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em Agronomia,
área de concentração Fitotecnia, para obtenção
do título de "Mestre".

Aprovada em 16 de março de 2000

Prof.^a Maria das Graças G. C. Vieira - UFLA

Prof.^a Dulcinéia de Carvalho - UFLA


Prof.^a Edila Vilela de Resende Von Pinho
UFLA
(Orientadora)

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

**" Nada me perturbe. Nada me amedronte. Tudo passa. A paciência tudo alcança.
A quem tem Deus, nada falta. Só Deus basta ."**

(Santa Tereza D'Ávila)

**Aos meus pais, Jairo e Gilda
Às minhas irmãs, Sílvia e Gina**

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua ação e bondade em toda a minha vida.

Aos meus pais e irmãs, pela confiança depositada em mim, pelo carinho e compreensão.

À orientadora Édila Vilela de Resende Von Pinho, pela grande amizade, exemplo de coragem e incentivo em todo o tempo em que temos convivido.

À grande amiga Maria das Graças G. C. Vieira, pela co-orientação, exemplo de luta e determinação e por ter-me acompanhado ao longo de minha vida.

À amiga Renata Silva Mann, pela co-orientação, troca de experiência, incentivo e grande amizade.

À amiga Dulcinéia de Carvalho, pelas sugestões, ajuda e amizade durante a realização deste trabalho.

Aos demais professores do Setor de Sementes, Maria Laene Moreira de Carvalho e Renato Guimarães, pelos ensinamentos, amizade e convívio.

Aos professores Magno Antônio Patto Ramalho, João Bosco dos Santos e Daniel Furtado, pelas sugestões para o trabalho.

Aos colegas de curso Ana Lúcia, Ângelo, Anderson, Brandão, Ebert, Jairo, João Almir, Kalinka, Lillian, Antônio Rodrigues, Reginaldo, Solange e Ulisses, pela grande amizade.

Aos funcionários do Setor de Sementes, Andréia, Dinara, D. Elza e Maria de Lourdes, pela ajuda e amizade.

Ao amigo Glauber, pela disponibilidade e ajuda.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade concedida.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO	03
2.1 Feijoeiro: origem, disseminação, domesticação e variabilidade	03
2.2 Certificação da pureza genética	09
2.2.1 Marcadores moleculares de proteínas e enzimas	10
2.2.2 Marcadores moleculares de DNA	16
2.3 Coeficientes de similaridade e métodos de agrupamento	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Avaliação da qualidade fisiológica	23
3.2 Avaliação das características morfológicas	25
3.3 Extração de proteínas e análise eletroforética	29
3.4 Extração de enzimas e análise eletroforética	32
3.5 Extração do DNA	33
3.6 Comparação entre os marcadores morfológicos e moleculares de proteína, enzimas e DNA	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Qualidade fisiológica das sementes	37
4.2 Características morfológicas	38
4.3 Marcadores moleculares de proteínas e enzimas	49
4.4 Marcadores moleculares de DNA	61
4.5 Correlação entre marcadores morfológicos e moleculares de proteínas, enzimas e DNA	67
5 CONCLUSÕES	69
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXOS	81

RESUMO

VIEIRA, Elisa Serra Negra. **Similaridade genética entre cultivares de feijão do grupo carioca por meio de marcadores morfológicos e moleculares visando a certificação da pureza genética.** Lavras: UFLA, 2000. 84p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia)*

A necessidade de descritores estáveis, homogêneos e distintos, os quais possam ser usados tanto na certificação como na identificação de cultivares de feijão tem aumentado significativamente com a lei de proteção e registro de cultivares. Com o objetivo de estudar marcadores para a certificação da pureza genética de sementes de feijão do grupo carioca, foi realizada a caracterização das cultivares de feijão Carioca, Carioca MG, Aporé, Pérola, IAPAR 57 e IAPAR 81, por meio de um estudo de similaridade genética. O trabalho foi conduzido na área experimental e no Laboratório de Análise de Sementes da Universidade Federal de Lavras. As características morfológicas estudadas foram as descritas na Lei de Proteção de Cultivares. Para as características morfológicas quantitativas foi estimada a distância Euclidiana Média e construído um dendrograma (UPGMA), o qual separou as cultivares em três grupos: I) Carioca, Carioca MG; II) Aporé, IAPAR 57; III) Pérola, IAPAR 81. O peso de 1000 sementes discriminou as seis cultivares. Com os dados referentes às características morfológicas qualitativas, a similaridade genética foi estimada pelo coeficiente de Jaccard e construído um dendrograma, obtendo-se os grupos: I) Carioca, Carioca MG, Aporé, Pérola e IAPAR 57; II) IAPAR 81. A cultivar IAPAR 57 apresentou cotilédones e caule com antocianina, a cultivar IAPAR 81 apresentou caule com antocianina e vagens no ponto de colheita com ápice afilado e dente apical reto, a cultivar Aporé apresentou sementes com halo amarelo. Os padrões eletroforéticos de proteínas de reserva obtidos pela modalidade eletroforética SDS-PAGE revelaram similaridade entre as cultivares Aporé e Pérola. Pelos dados obtidos pela focalização isoeétrica foi estimada a similaridade genética pelo coeficiente de Jaccard e construído um dendrograma, sendo obtidos os grupos: I) Carioca, Carioca MG, IAPAR 57; II) Aporé, Pérola IAPAR 81. Os sistemas enzimáticos peroxidase, glutamato oxaloacetato transaminase, diaforase, álcool desidrogenase e esterase foram estudados pela modalidade eletroforética Nativa-PAGE, sendo estimada a similaridade genética

*Comitê Orientador: Édila Vilela de Resende Von Pinho (Orientadora), Maria das Graças G. C. Vieira - UFLA e Renata Silva Mann - UFLA.

pelo coeficiente de Jaccard e construído um dendrograma obtendo-se os grupos: I) Carioca, Carioca MG; II) Pérola; III) IAPAR 81; IV) Aporé, IAPAR 57. Os sistemas enzimáticos esterase e diaforase distinguiram as cultivares Aporé e Carioca, respectivamente, enquanto o sistema álcool desidrogenase distinguiu as cultivares Carioca e Carioca MG, Aporé e IAPAR 57, Pérola e IAPAR 81. Com base nos marcadores RAPD, quatro das seis cultivares de feijão foram diferenciadas pelos iniciadores OP-B04, OP-B08 e OP-B11. A correlação entre os marcadores, estudada pelo método de Spearman, foi não significativa, indicando a baixa variabilidade genética entre os materiais estudados.

ABSTRACT

VIEIRA, Elisa Serra Negra. Genetic similarity among carioca bean cultivars by morphological and molecular markers for genetic purity certification. Lavras: UFLA, 84p. (Dissertation - Master Program in Agriculture)*

The need of stable, homogeneous and distinct descriptors which can be used in certification and identification of bean cultivars, increased significantly with cultivar protection and register law. With the aim of studying markers for genetic purity certification of carioca bean seeds the characterization of six cultivars of beans were realized, Carioca, Carioca MG, Aporé, Pérola, IAPAR 57 and IAPAR 81 by genetic similarity study. The project was conducted at experimental area and seed analysis laboratory at the Federal University of Lavras. The studied morphological traits were described in Cultivars Protection Law. For the quantitative morphological traits, the Media Euclidiane distance was estimated and a dendrogram (UPGMA) was constructed, which separated the cultivars in three groups: I) Carioca, Carioca MG; II) Aporé, IAPAR 57; III) Pérola, IAPAR 81. The weigh of 1000 seeds discriminated the six cultivars. With the data regarding qualitative morphological traits, the genetic similarity was estimated Jaccard coefficient and a dendrogram was constructed with the groups: I) Carioca, Carioca MG, Aporé, Pérola and IAPAR 57; II) IAPAR 81. The cultivar IAPAR 57 showed cotiledons and stem with antocianine, the cultivar IAPAR 81 showed stem with antocianine and dry pods with sharp tops and straight apical tooth, the cultivar Aporé showed seeds with yellow halo. Electrophoretic patterns of storage proteins obtained by SDS-PAGE showed similarities between Aporé and Pérola cultivars. The data obtained by isoelectric focusing estimated the genetic similarity by Jaccard coefficient and a dendrogram was constructed with the groups: I) Carioca, Carioca MG, IAPAR 57; II) Aporé, Pérola, IAPAR 81. The enzymatic systems peroxidase, glutamate oxilacethate transaminase, diaphorase, sterase and alchool desidrogenase were studied by Native-PAGE, estimated the genetic similarity by Jaccard coefficient and a dendrogram was constructed with groups: I) Carioca, Carioca MG; II) Pérola; III) IAPAR 81; IV) Aporé, IAPAR 57.

*Guidance Committee: Édila Vilela de Resende Von Pinho (Major Professor), Maria das Graças G. C. Vieira - UFLA and Renata Silva Mann - UFLA.

Sterase and diaphorase discriminated Aporé and Carioca cultivars, respectively. Alchool desidrogenase discriminated the cultivars Carioca and Carioca MG, Aporé and IAPAR 57, Pérola and IAPAR 81. From RAPD markers, four of the six bean cultivars were discriminated by OP-B04, OP-B08 and OP-B11. The correlation among the markers, studied by Spearman method, was non-significant, showing a low genetic variability among the studied materials.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de sementes melhoradas e com qualidade é de fundamental importância para o sucesso do cultivo, uma vez que a semente é responsável por grande parte do rendimento da cultura. A qualidade das sementes pode ser analisada sob os aspectos físicos, fisiológicos, sanitários e genéticos.

As características de uma cultivar, desenvolvida pelo melhorista, devem ser mantidas para garantir maior segurança aos agricultores na instalação de suas lavouras. Sabe-se que a pureza genética pode interferir na homogeneidade, no potencial de rendimento, na resistência a moléstias e insetos e na qualidade final do produto. Assim, nos programas de controle de qualidade das instituições produtoras de sementes, há uma preocupação cada vez maior quanto a certificação da pureza genética que, nas sementes de feijão tem sido realizada principalmente por meio de marcadores morfológicos de sementes, plântulas e plantas nas fases de florescimento e maturação. No entanto, o emprego de marcadores morfológicos apresenta limitações como a interferência de fatores ambientais e condições de solo, entre outras. Além disso, a maior parte das cultivares de feijão comercializada no Brasil é do tipo Carioca, as quais possuem caracteres morfológicos semelhantes, o que tem dificultado a distinção destas durante a produção no campo e na análise das sementes no laboratório.

Assim, com a abertura da economia acirrando a concorrência no mercado de sementes, e com o advento da Lei de Proteção de Cultivares (LPC), há a necessidade da utilização de descritores estáveis, homogêneos, herdáveis e distintos, os quais possam ser utilizados com precisão tanto na certificação como na identificação de cultivares.

Os marcadores moleculares de enzimas, proteínas e DNA têm sido recomendados como ferramentas mais seguras na caracterização de espécies de plantas. Dentre estas a técnica de RAPD (DNA polimórfico amplificado ao

acaso) tem sido largamente utilizada (Haley et al., 1994; Vilarinhos, 1994; Silva, 1996; Duarte, 1998), além de possuir várias vantagens sobre as outras como simplicidade, versatilidade e custos mais baixos (McDonald, 1994), o que torna essa técnica uma ferramenta potencial para a certificação da pureza genética.

Mediante tal situação, faz-se necessário estudar os graus de similaridade entre as cultivares de feijão do tipo carioca, o que contribuirá para o levantamento de marcadores que poderão ser utilizados como descritores para a LPC e para a certificação da pureza genética pelas empresas produtoras de sementes.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1) Feijoeiro: origem, disseminação, domesticação e variabilidade:

O gênero *Phaseolus* possui cerca de 50 espécies, distribuídas exclusivamente nas Américas, provavelmente onde se originou (Singh, 1989; Singh, Gepts e Debouck, 1991; Gepts e Debouck, 1991). Dentre estas há de quatro a cinco espécies economicamente cultivadas: *Phaseolus vulgaris*, *P. lunatus* L., *P. coccineus* L. subespécie *coccineus*, *P. coccineus* subespécie *polyanthus* e *P. acutifolius* A. Gray, que diferem entre si quanto ao ciclo de vida, sistema reprodutivo, distribuição geográfica dos ancestrais selvagens e grau de domesticação (Gepts, 1988).

Singh, Gepts e Debouck (1991), Gepts et al. (1986), Koenig, Singh e Gepts (1990), Gepts (1988), Gepts e Bliss (1985), Sprecher (1988) e Koenig e Gepts (1989), com base em informações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, estabeleceram a hipótese da existência de três centros de origem para o feijoeiro: um no México e América Central (Mesoamericano), um segundo na região Andina, e um terceiro, de menor importância, na Colômbia. Para a determinação desses centros de origem, os autores se basearam em características como o tipo de faseolina, a principal proteína de reserva em sementes de feijoeiro cultivados e selvagens, bem como na relação desta com características morfológicas como o tamanho das sementes. Dessa maneira, ficou estabelecido que no centro de origem Mesoamericano as sementes de feijão são pequenas e com faseolina dos tipos "S" e "M", no centro Andino estas são grandes e com faseolina dos tipos "T", "A", "C" e "H", e no centro Colombiano são pequenas e com faseolina do tipo "B".

Dentro dos centros de domesticação, os genótipos de feijão puderam ser divididos em raças, baseando-se em análises de características agrônômicas,

morfológicas, bioquímicas e informações sobre adaptação (Singh, Gepts e Debouck, 1991).

Estudos de variantes aloenzimáticos de vários sistemas enzimáticos realizados com espécies de feijoeiro de diversas procedências, confirmaram a distribuição dos centros de domesticação baseada no tipo de faseolina. Koenig & Gepts (1989), estudando 83 acessos selvagens de *Phaseolus vulgaris*, concluíram que as duas principais regiões geográficas (Mesoamericana e Andina) podem ser delimitadas por acessos que exibiam padrões aloenzimáticos para as enzimas leucina amino-peptidase (Lap3), glicose 6-fostato desidrogenase (Diap1) e xiquemato desidrogenase (Skdh). Os mesmos autores concluíram também que a variabilidade genética é mais elevada na região mesoamericana, mas, por outro lado genótipos da região andina apresentaram maior número de locos polimórficos para os 14 sistemas enzimáticos estudados, provavelmente por causa da ocorrência de alelos raros para as aloenzimas Gpi2 e Mdh1 das enzimas glicose fosfato isomerase e malato desidrogenase, respectivamente.

Estudos dos variantes aloenzimáticos também indicam a transferência de genes de feijões selvagens para os cultivados da espécie *Phaseolus vulgaris*, e dividem o "pool" de genes Mesoamericano em cinco subgrupos e o Andino em quatro subgrupos (Singh, Gepts e Debouck, 1991).

As cultivares da região Mesoamericana têm sido introduzidas na região Andina e vice-versa (Gepts et al., 1986). A Colômbia parece ser um ponto de encontro das cultivares dessas duas origens, pois apresenta cultivares Mesoamericanas mais abundantes no nordeste da região de cultivo, enquanto as cultivares Andinas aparecem numa frequência relativamente mais elevada no sudoeste da região de cultivo (Gepts e Bliss, 1986). As cultivares Mesoamericanas e Andinas têm se dispersado para muitos continentes, entretanto, os feijões mesoamericanos predominam nas planícies da América do Sul (Brasil e Venezuela) e no sudoeste dos Estados Unidos, enquanto as

cultivares andinas se dispersaram no nordeste dos Estados Unidos, Europa e África (Gepts e Bliss, 1988; Gepts et al., 1988).

Os centros de origem correspondem aos centros de domesticação, já que cultivares de feijão apresentam o mesmo tipo de faseolina, específica de cada centro de origem, de seus ancestrais selvagens (Gepts et al., 1986).

Os tipos de faseolina "S", "T", "C", "H" e "A" permaneceram nas espécies domesticadas, que correspondem às espécies cultivadas atualmente, por possuírem um elevado valor biológico, sendo assim favorecidas pela seleção. Outra razão que explica a permanência desses tipos de faseolina nas espécies cultivadas é a provável existência de uma ligação gênica ou associação entre os alelos que codificam tais tipos de faseolina com um gene ou grupo de genes determinantes de aspectos essenciais às formas cultivadas como o atraso ou a diminuição na deiscência das vagens (Gepts et al., 1986).

As formas cultivadas se apresentam bastante modificadas em relação às formas silvestres graças ao processo de domesticação. As atuais plantas de feijão apresentam crescimento restrito e forma mais compacta das plantas, o que as torna de menor altura e mais eretas; folhas maiores; caule mais robusto; flores, sementes e vagens maiores; menor número de sementes por vagem; sementes com maior permeabilidade à água; supressão do mecanismo de dispersão das sementes; grande número de cores das sementes, incluindo diversas manchas e estrias; diminuição do conteúdo de fibras nas vagens; ocorrência de neutralidade ao comprimento do dia, permitindo o cultivo do feijão em zonas temperadas (Evans, 1980 e Smartt, 1988, citados por Borém, 1999).

Houve um aumento da variabilidade no feijoeiro em relação às características morfológicas por causa do processo de domesticação realizado pelos agricultores e a ampla variação no ambiente de cultivo (Gepts e Debouck, 1991). Entretanto, esta mesma domesticação reduziu a variabilidade genética principalmente dos feijões de origem mesoamericana, o que é comprovado pelos

estudos com faseolina em feijões selvagens e cultivados (Gepts et al., 1986). Os resultados desses estudos revelaram que, de 16 padrões de genótipos selvagens dessa região, somente um está presente entre os cultivados. Na região Andina, a redução na diversidade genética foi bem menor pelo fato de os feijões selvagens já apresentarem baixa variabilidade de tipos de faseolina (Gepts et al. 1986; Koenig, Singh e Gepts, 1990)

Este aumento da variabilidade morfológica e diminuição da variabilidade genética pode ser explicado pelo fato de características morfológicas, que diferem feijões cultivados de feijões selvagens, serem controladas por um número limitado de genes, com exceção para a característica tamanho da semente, as quais apresentam grande efeito fenotípico, enquanto características bioquímicas e moleculares raramente têm efeito marcante no fenótipo, sendo menos prováveis de serem selecionadas (Gepts, 1991).

Outra evidência da redução da diversidade genética em função da domesticação é a susceptibilidade das cultivares ao caruncho durante o armazenamento, já que a resistência é conferida pela presença da proteína arcelina, que é encontrada em um pequeno número de espécies selvagens (Romero-Andreas, Yandell e Bliss, 1986). Mesmo havendo diferenças morfológicas, o atual genoma do feijão tem uma reduzida diversidade genética (Gepts, 1991).

Com o processo de domesticação e a conseqüente diminuição da variabilidade genética, as cultivares de feijão atualmente plantadas no Brasil apresentam uma base genética muito estreita, o que é comum entre variedades comerciais. Dessa forma, todas essas cultivares mostram características morfológicas muito semelhantes.

O tamanho e o tipo de grão da cultivar Carioca, ou seja, tamanho médio e cor creme com estrias marrons, são características que os melhoristas procuram preservar dentro de todo programa de melhoramento de feijão no país,

tendo em vista a preferência do mercado consumidor por este tipo de grão (Vieira, Trazilbo e Borém, 1998).

Em relação à cor dos grão de feijão, segundo Leakey (1988), pelo menos dez genes estão envolvidos na expressão desse caráter. Ainda segundo este mesmo autor, a cor do halo das sementes de feijão, é codificada pelo gene J, que também está ligado à expressão de características como o brilho das sementes e a qualidade culinária.

Em uma revisão do mapa de ligação de cultivares de feijoeiro realizada por Basset (1991), são citadas as seguintes ligações entre genes responsáveis pela produção de cor e outras características: genes Aeq e tri distantes 39 cM, sendo Aeq considerado por alguns autores como um dos alelos do gene C, e responsável pelo estandarte escuro e o alelo tri por produzir três cotilédones; gene fin distante do alelo No de 31 cM, sendo o alelo fin responsável pelo hábito de crescimento determinado e o alelo No por flores rosas; gene V distante 10 cM de rf, sendo o alelo V responsável pela cor violeta das flores e o alelo rf pela folhagem reclinada; gene t distante 36 cM de cl, onde o alelo t condiciona sementes parcialmente coloridas e o alelo cl determina uma linha circundando cada região colorida do tegumento, incluindo mancha pequenas; gene P distante 12 cM de *Est-2*, sendo que o alelo p determina tegumento brando e impede a expressão de outros padrões de cores e o alelo *Est-2* é responsável pela formação da isoenzima esterase-2.

Todas as cultivares do grupo comercial carioca possuem a cultivar Carioca como progenitor em alguma das etapas dos cruzamentos que lhes deram origem. Conseqüentemente, todas essas cultivares possuem grandes semelhanças com a cultivar Carioca, que foi descrita por Almeida, Leitão Filho e Mivasaka (1971).

Segundo estes autores essa cultivar apresenta plantas de crescimento indeterminado, de ciclo vegetativo ao redor de 90 dias e muito pouco ou não

pigmentadas de antocianina. Apresenta também folíolos de coloração verde esmeralda na face superior e verde oliva na face inferior, ligeiramente pubescentes, com maior incidência de pêlos ao longo das nervuras primárias e secundárias. O limbo foliar mede aproximadamente 10,5cm de comprimento por 7,2cm de largura (medida do folíolo central). Apresenta poucas flores, dispostas em inflorescências axilares, sendo que cada flor apresenta na base do cálice duas bractéolas pequenas, de forma oval-lanceolada, com 0,6cm a 0,7cm de comprimento e de coloração verde-oliva. O cálice tem coloração verde-clara, com cerca de 0,5cm de comprimento, sendo ligeiramente piloso na sua parte externa. A flor mede aproximadamente 1,6cm a 1,7cm de comprimento (medida tomada da base do cálice ao ápice do estandarte). O estandarte na flor jovem é de coloração branca, com ligeiras nuances de amarelo na porção basal. Após a fecundação, sua coloração tende a uniformizar-se numa tonalidade amarelo-descorada. As asas na flor jovem têm cor branca, e após a fecundação tomam uma coloração amarelo descorada. A quilha é de cor ligeiramente esverdeada na base, com nuances de amarelo no ápice. Essa coloração é constante em todos os estádios da flor. As vagens são de coloração amarelo palha na maturação, ocorrendo esporadicamente manchas rosadas de intensidades variadas, sendo este um caráter raro. As linhas das suturas dorsal e ventral são de coloração verde amarela. As vagens são septadas parcialmente entre as sementes cujas medições do tamanho da vagem indicaram a medida de 10,59cm para o comprimento e 0,88cm para a largura. O número médio de sementes por vagem foi de 5,78.

As sementes são foscas, castanho claras, apresentando estrias de coloração havana, características da cultivar. O hilo é branco, apresentando ao redor um halo de coloração creme e o comprimento das sementes é, em média, de 0,96cm, 0,60cm de largura e 0,51cm de espessura e forma oblonga.

Ainda segundo Almeida, Leitão Filho e Mivasaka (1971), a cultivar Carioca se revela resistente ao ataque de vírus e ferrugem.

2.2) Certificação da pureza genética:

A pureza genética é um dos requisitos para a comercialização de sementes, garantindo aos agricultores cultivares com as mesmas características desenvolvidas pelos melhoristas. A presença de sementes de outras cultivares em um lote resulta em efeitos negativos na produção de grãos e na uniformidade. Assim, companhias de sementes e órgãos oficiais certificam a pureza genética das sementes para posterior comercialização. Os testes para certificação da pureza genética devem produzir resultados reproduzíveis, não devem ser tecnicamente complexos, devem ser rápidos e de baixo custo (Payne, 1987).

Segundo as regras da ISTA (International Seed Testing Association, 1996) e o manual da AOSA (Association of Official Seed Analysis, 1991), a certificação da pureza genética pode ser realizada por meio de características morfológicas, fisiológicas, citológicas e bioquímicas (McDonald, 1994). Segundo as regras para análise de sementes (BRASIL, 1992), a verificação de espécies e cultivares pode ser realizada em sementes, plântulas ou plantas desenvolvidas em casa de vegetação, câmara de crescimento ou campo.

No Brasil, nos programas de controle de qualidade, a certificação da pureza genética de sementes de feijão tem sido realizada por meio de marcadores morfológicos de sementes, plântulas e plantas nas fases de florescimento e maturação. Dessa forma, com a instituição da Lei de Proteção de Cultivares, que protege materiais genéticos e garante os direitos de seu criador, os descritores mínimos requeridos para que uma cultivar seja protegida baseiam-se em características morfológicas de plântulas, plantas e sementes.

A lista de descritores mínimos publicada na Lei de Proteção de Cultivares no Brasil considera os seguintes para o feijoeiro: presença de

antocianina nos cotilédones e hipocótilo e dimensão da folha primária na fase de plântula; hábito de crescimento, presença de antocianina no caule, cor, dimensões, índice comprimento/largura e rugosidade do folíolo central do quarto nó na fase de planta; uniformidade da cor da flor, cor da asa e do estandarte e posição da inflorescência terminal durante o florescimento; uniformidade da cor, cor primária e secundária, forma da secção transversal, presença de fio e textura da superfície nas vagens no ponto de maturidade fisiológica; uniformidade da cor, cor primária e secundária, perfil, ápice, forma e posição do dente apical nas vagens no ponto de colheita; uniformidade da cor, cor primária e secundária, presença de variação no testa, peso de 1000 sementes, forma, grau de achatamento, brilho, presença e cor do halo nas sementes. Na lei também é considerado o grupo comercial ao qual a cultivar pertence (Brasil, 1997).

Porém, o emprego desses marcadores para a certificação da pureza genética de cultivares de feijão com características morfológicas semelhantes apresenta limitações, podendo ser de pouca precisão, além de essas características serem afetadas pelo ambiente.

2.2.1) Marcadores moleculares de proteínas e enzimas:

A eletroforese de proteínas e enzimas é uma ferramenta importante para a distinção e identificação de cultivares e sua utilização vem crescendo nos programas de controle de qualidade das empresas produtoras de sementes (Cooke, 1988). Na certificação da pureza genética, essa técnica tem sido utilizada na distinção de espécies similares e na identificação de contaminantes nos lotes de sementes, principalmente pelas empresas produtoras de sementes da Europa e América do Norte (Cooke, 1988; Stuber et al., 1988).

✕Apesar das grandes vantagens oferecidas pela eletroforese de proteínas e enzimas, como a obtenção de resultados num prazo de 24-48 horas, essa técnica ainda é pouco utilizada rotineiramente em laboratórios de análises de sementes

no Brasil, provavelmente em razão da falta de metodologias padronizadas e pessoal treinado.

Segundo Hussain et al., (1986) e Bassiri & Adams (1978), o uso de marcadores bioquímicos de proteínas e enzimas proporciona uma discriminação mais rápida e confiável entre amostras de feijão quando comparados com características morfológicas e fisiológicas.

Para a certificação da pureza genética de cultivares de feijão têm sido indicadas análises dos perfis eletroforéticos de proteínas em sementes, como a faseolina (Driedger et al., 1994; Gepts, 1988; Gepts e Bliss, 1986 e 1988; Gepts et al., 1988; Koenig, Singh e Gepts, 1990; Pereira e Souza, 1992).

→ * A faseolina, a mais importante proteína de reserva do grão do feijoeiro (Osborn, 1988), consiste em uma globulina solúvel somente em altas concentrações salinas, responsável por 35 a 56% do nitrogênio total da semente (Ma e Bliss, 1978) e é detectada nos cotilédones 14 dias após o florescimento, sendo seu armazenamento estendido por mais 12 a 14 dias (Sun et al., 1979). Por meio de técnicas eletroforéticas foram identificadas, inicialmente, três tipos de faseolina que receberam a designação de "S", "T" e "C", presentes nas cultivares Sanilac, Tendergreen e Contender, respectivamente (Brown, Bliss e Hall, 1981; Bliss e Blown, 1983).

Bollini e Chrispeels (1978) isolaram e caracterizaram as duas principais frações protéicas do grão de feijão, vicilinas e fitohemaglutininas (lectinas). A faseolina pertence à família "7S" ou vicilina, família das proteínas de reserva das sementes das leguminosas (Derbyshire, Wright e Boulter, 1976), sendo composta por três unidades polipeptídicas glicosiladas.

Estudos genéticos feitos por Brown, Bliss e Hall (1981), com base na eletroforese bi-dimensional IEF-SDS/PAGE, mostraram que os tipos "S" e "T" de faseolina aparentemente não possuem polipeptídeos em comum, enquanto o tipo "C" possui polipeptídeos em comum com os outros tipos de faseolina, o que

sugere que este último é um recombinante. A faseolina é codificada por uma família multigênica constituída por, aproximadamente, sete genes para a faseolina do tipo "T", oito genes para a faseolina do tipo "S" e nove genes para o tipo "C" (Talbot et al., 1984).

No Brasil os feijões Carioca, Enxofre, Rosinha, Chumbinho e Preto Vagem Roxa apresentam sementes pequenas e faseolina do tipo "S", enquanto as cultivares Manteigão Fosco, Jalo, Amendoin, Goiano Precoce e Pintado apresentam sementes graúdas e faseolina do tipo "T" (Vieira, Borém e Ramalho, citados por Borém, 1999).

Em trabalho realizado por Pereira e Souza (1992) com "raças crioulas" de feijão encontradas no Brasil, foi constatada, por eletroforese, a ocorrência somente dos tipos "T" e "S" de faseolina, com predominância desta última em todos os estados brasileiros, mesmo havendo variações morfológicas entre as sementes. Esse estudo confirmou a predominância de materiais de origem mesoamericana no Brasil.

As cultivares de feijão brasileiras do tipo carioca apresentam o tipo "S" de faseolina, o que indica que o uso dessa proteína é restrito para a identificação de genótipos de feijão desse grupo comercial. Apesar disso, Vasconcelos et al. (1996) conseguiram separar 28 cultivares de feijão utilizadas no Brasil em dois grandes grupos: 18 cultivares com sementes pequenas e faseolina tipo "S" e 10 com sementes maiores e faseolina tipo "T".

Driedger et al. (1994) diferenciaram seis cultivares de feijão preto oriundas da Guatemala por diferenças nos padrões eletroforéticos de proteínas de reserva por meio da combinação entre dois tipos de eletroforese: PAGE-ácida e SDS-PAGE. As proteínas de reserva que separaram as seis cultivares estavam compreendidas numa faixa de peso molecular que variava de 19.000 a 34.000 daltons, não correspondendo ao peso molecular da faseolina, que é de 43.000 a 47.000 daltons. As bandas presentes nessa faixa de peso molecular apresentaram

intensidade e valores de mobilidade relativa similares. Os mesmos autores obtiveram também perfis eletroforéticos das enzimas peroxidase e esterase, os quais, combinados com os perfis protéicos, confirmaram a identidade das cultivares.

Um terceiro tipo de eletroforese conhecido como focalização isoelétrica (IEF), também tem sido utilizado para a separação de cultivares e considera o efeito do ponto isoelétrico sobre a mobilidade das moléculas de proteína. Essa técnica de eletroforese tem sido recomendada pela ISTA para a verificação da pureza genética de híbridos de milho, baseada na análise da proteína zeína.

Em um grande número de estudos têm sido utilizadas enzimas para determinar a diversidade genética e relações filogenéticas em espécies do gênero *Phaseolus*.

Bassiri & Adams (1978) examinaram a variabilidade isoenzimática dos sistemas esterase, fosfatase ácida e peroxidase de 13 espécies dentro do gênero *Phaseolus*. A maior parte das espécies mostrou padrões de bandas únicos em cada sistema enzimático, com exceção de *P. vulgaris* cultivados e selvagens e *P. coccineus*, os quais apresentaram padrões de banda similares.

As enzimas peroxidase e esterase foram marcadores úteis para a identificação e estimativa da relação genética entre 34 cultivares de *P. vulgaris* pertencentes a 19 classes comerciais (Bassiri e Adams, 1978).

Um estudo da variação evolucionária das enzimas aspartato amino transferase e superóxido dismutase em 14 espécies cultivadas e selvagens de *Phaseolus* e *Vigna*, realizado por Jaaska e Jaaska (1988), revelou que no gênero *Phaseolus* as espécies *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. lunatus* e *P. acutifolius*, formam um grupo homogêneo com poucas variações isoenzimáticas.

Weeden (1984), estudando um número limitado de feijões de semente branca (snap bean), utilizaram dez sistemas enzimáticos, incluindo a esterase e

peroxidase, e obtiveram somente uma discriminação parcial entre as 90 cultivares testadas.

Acquaah, Isleib e Ferguson (1994), estudaram o polimorfismo das enzimas diaforase, xiquimato desidrogenase enzima málica e malato desidrogenase em vários acessos de *Phaseolus vulgaris* L. Esses autores concluíram que o uso de isoenzimas como marcadores em feijão é limitado pela existência de baixa variabilidade de alelos isoenzimáticos dentro dos "pools" de genes Mesoamericano, Andino e Colombiano.

O controle genético do polimorfismo detectado por enzimas e a relação deste com características agronômicas desejadas também tem sido estudada. Weeden (1984) e Weeden e Liang (1985), determinaram que o polimorfismo das enzimas ribulose bisfosfato carboxilase, xiquimato desidrogenase, enzima málica, glucose fosfato isomerase e adenilato quinase, era controlado pelos genes de herança simples *Rbcs*, *Skdh*, *Me*, *Gpi-cl* e *Adk*, respectivamente. Sprecher (1988) determinou que o polimorfismo da enzima diaforase era controlado por dois genes fortemente ligados: *Dial* e *Dia2*. Koenig & Gepts (1989) concluíram que os genes *Lap3* e *Mdh1* codificavam o polimorfismo gerado pelas enzimas leucina aminopeptidase e malato desidrogenase.

Gepts et al. (1986) e Valejos e Chase (1991), estudando a atividade dos sistemas enzimáticos glutamato-oxalacetato transaminase e álcool desidrogenase, concluíram que os locos *Got2* e *Adh1* deveriam estar ligados a um gene ou grupo de genes que codificassem alguma característica essencial às espécies cultivadas; nesse caso tais locos são responsáveis por 50% da variabilidade no tamanho da semente. Contrariamente, Brothers e Kelly (1993), estudando a relação do porte ereto de plantas de *Phaseolus vulgaris* com a aloenzima *dia2*¹⁰⁵ do loco *DIA2* da enzima diaforase, demonstraram que essa aloenzima não estava ligada ao tipo de arquitetura das plantas.

Driedger et al. (1994) mostraram que as diferenças nos padrões eletroforéticos de proteínas e enzimas de sementes de feijão foram consequência primeiramente do genótipo e não da influência ambiental. Nesse estudo foram testados vários métodos de extração e diferentes ambientes de cultivo para as linhagens de feijão e mesmo assim os padrões protéicos foram altamente reproduzíveis. Essa evidência da consistência da expressão de proteínas sobre diferentes regimes climáticos e agrônômicos sustenta a validade dos métodos eletroforéticos para a identificação de cultivares.

Ainda segundo Driedger et al. (1994), a rapidez, simplicidade, o requerimento de pouca quantidade de amostra e o poder de discriminação tornam a análise eletroforética de proteínas de sementes, em detrimento a de enzimas, como o método a ser escolhido para a identificação de genótipos de feijão.

Pelo exposto, observamos que nos últimos anos, marcadores bioquímicos como enzimas e proteínas de reserva, têm sido utilizados em muitas espécies (Driedger et al., 1994). No entanto, os perfis de bandas de tais marcadores podem ser afetados pelo ambiente e demonstram baixo nível de polimorfismo entre cultivares estreitamente relacionadas (Ferreira e Grattapaglia, 1995; Alfenas, 1998; Abdelnoor, Barros e Moreira, 1995).

✧ De acordo com Silva (1997), os padrões eletroforéticos das enzimas álcool desidrogenase, malato desidrogenase, peroxidase, esterase e glutamato oxaloacetato transaminase de sementes de milho, apresentaram-se bastante alterados principalmente em função da presença de microrganismos, devendo ser utilizados com restrições nos testes de identificação de cultivares e certificação da pureza genética, apesar da rapidez na obtenção dos resultados. Ainda segundo o mesmo autor, os padrões eletroforéticos dos coleótilos foram menos alterados pela presença de microrganismos.

* Determinadas enzimas em algodão, como fosfatase ácida, catecol oxidase, hexoquinase, enzima málica e esterase, tiveram seus zimogramas alterados em função da associação fungo/semente, devendo ser evitadas em programas de identificação de cultivares (Vieira, 1996). Segundo a mesma autora, as enzimas glutamato desidrogenase e glutamato oxaloacetato transaminase mantiveram seus padrões inalterados, sendo recomendadas para a identificação e certificação de cultivares de algodão.

Para Cherry (1983), a diminuição de intensidade de algumas proteínas, intensificação de outras e a produção de múltiplas formas moleculares são causadas pela presença de microrganismos em sementes.

Para Koenig & Gepts (1989), a limitação da utilização de isoenzimas como marcadores para avaliar a diversidade genética em culturas autógamas como *Phaseolus vulgaris*, é que o número de polimorfismo e alelos por loco são limitados.

Ainda segundo Acquah, Isleib e Ferguson (1994), para a obtenção de marcadores moleculares em feijão devem ser utilizadas técnicas que analisam diretamente a molécula de DNA, como RFLP (polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição) e PCR (reação em cadeia da polimerase), pois o polimorfismo é mais elevado que os marcadores isoenzimáticos.

Sendo assim, faz-se necessário o uso de técnicas moleculares empregando DNA para um maior entendimento da diversidade genética existente em culturas autógamas como *Phaseolus vulgaris*.

2.2.2) Marcadores moleculares de DNA:

A utilização de marcadores moleculares de DNA para a caracterização de genótipos tem-se destacado muito na última década, gerando excelentes resultados.

Os marcadores moleculares surgiram recentemente, com o advento da biologia molecular. Marcadores baseados no DNA apresentam várias vantagens sobre os outros tipos de marcadores. Dentre essas estão: o número elevado, o alto grau de polimorfismo, a não-influência do meio ambiente e de microrganismos, e a não-apresentação de efeito pleiotrópico. Dentre esses marcadores destacam-se os RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism"), o RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"), os microssatélites ou SSRs ("Simple Sequence Repeat") e o AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism").

O ano de 1990 marcou o início de um grande avanço na área de marcadores moleculares, com a publicação de dois trabalhos que descreveram a técnica de RAPD (Williams et al., 1990) ou AP-PCR (Welsh e McClelland, 1990), que é derivada da técnica PCR ("Polymerase Chain Reaction"). Essa técnica foi desenvolvida com base na observação de que um pequeno oligonucleotídeo de sequência aleatória, quando misturado com o DNA genômico, mais uma DNA polimerase termo-estável e em seguida submetidos a um ciclo de temperaturas sob condições semelhantes às utilizadas para a reação em cadeia da polimerase (PCR), promove a amplificação de diversos fragmentos de DNA. Os produtos dessa reação, ou seja, os fragmentos amplificados, podem então ser separados e visualizados, quando analisados por eletroforese em gel de agarose. Esses fragmentos são, em geral, constituídos por 200 a 2.000 pares de bases, podendo atingir, ocasionalmente, 5.000 pares de bases, e quando são específicos de um genótipo, se tornam úteis para a identificação de cultivares (McDonald, 1995). O que difere a técnica RAPD da técnica PCR é o uso de primers mais curtos e aleatórios e não é necessário o conhecimento prévio do genoma em estudo.

Desde sua descrição, o uso de marcadores RAPD na análise genética tem tido uma difusão muito rápida, sendo atualmente o marcador molecular mais

utilizado para vegetais. O desenvolvimento da técnica tem produzido outros marcadores moleculares baseados em PCR, como os marcadores SCARs ("Sequenced Characterized Amplified Regions") e os marcadores ASAPs ("Allele-Specific Associated Primers") (Staub e Serquen, 1996).

Dentre as várias aplicações dessa técnica, pode-se citar a construção de mapas genéticos para localização de genes de interesse econômico, a obtenção de "fingerprints" genômicos, a análise da divergência genética em populações e germoplasmas e o estabelecimento de relações filogenéticas (Ferreira e Grattapaglia, 1995). Esses marcadores têm sido muito úteis no estudo da diversidade genética de várias espécies de feijão (Vilarinhos, 1994; Graham et al., 1994; Vasconcelos, 1995; Alzate-Marin, 1996; Duarte, 1998; Machado, 1999).

Duarte (1998), trabalhando com 27 cultivares de feijão, obteve a separação destas de acordo com os centros de domesticação propostos pelo marcador RAPD. O mesmo autor conseguiu também a separação das cultivares do grupo Mesoamericano em raças, o que não ocorreu com as cultivares do grupo Andino. Skroch, Tivang e Nienhuis (1992), estudando as relações genéticas dentro de uma população contendo 77 genótipos de *Phaseolus vulgaris*, também identificaram por marcador RAPD a existência de dois subgrupos entre as cultivares Mesoamericanas pela técnica de RAPD.

Em estudo realizado com 12 cultivares de feijão, sendo 11 pertencentes ao grupo carioca, Machado (1999), por meio de distâncias genéticas baseadas em marcador RAPD, classificou as referidas cultivares em cinco grupos distintos: Grupo I) Esal 693; Grupo II) Ouro Negro; Grupo III) IAC Carioca Aruã; Grupo IV) PF-9029975 e Grupo V) CI-21, CI-128, H-4-7, Aporé, Pérola, Carioca 300V, A-285, Rudá e Carioca MG.

Abdelnoor, Barros e Moreira (1995), avaliando a divergência genética entre 38 cultivares de soja brasileiras por marcador RAPD, obtiveram a

separação destas em cinco grupos distintos. Com isso provaram que a técnica é uma eficiente ferramenta no estudo da diversidade genética entre indivíduos de uma mesma espécie, sendo preferida em relação ao uso de marcadores enzimáticos e protéicos devido ao baixo nível de polimorfismo gerado por estes.

O marcador RAPD oferece vantagens como simplicidade, rapidez na obtenção de resultados, requerimento de pequenas quantidades iniciais de DNA, que pode ser extraído diretamente da semente, gerando economia de tempo para a realização das análises, entre outras. Por outro lado, tem como desvantagem ser de caráter dominante, não detectando os indivíduos heterozigóticos, e ser altamente sensível a mudanças mínimas no protocolo de condução da técnica (Staub e Serquen, 1996). Fatores como a qualidade e concentração da amostra de DNA como também dos reagentes da reação de PCR (tampão da reação, Mg^{+2} , Taq DNA polimerase, dNTP e primer), temperatura do termociclador e efeitos ambientais, podem gerar resultados inconsistentes e, conseqüentemente, diminuir a reprodutibilidade do marcador RAPD (Weeden et al., 1990; Lorenz, Weihe e Boerner, 1994; Ferreira e Grattapaglia, 1995; Staub e Serquem, 1996).

Pesquisas vêm sendo realizadas para estudar a influência da qualidade fisiológica das sementes nos perfis de marcadores RAPD. Entre esses estudos, Harrington (1972) sugeriu que a degradação do DNA constitui o primeiro evento que leva à perda da qualidade na semente. Shatters et al. (1995) concluíram que as diferenças nos perfis de marcadores RAPD obtidos de amostras de sementes de soja com diferentes níveis de envelhecimento natural e artificial, dependeram do primer utilizado na amplificação. Contrariamente, Zhang, McDonald e Sweeney (1996) mostraram que a deterioração natural ou artificial não afetaram a estabilidade dos marcadores RAPD em sementes de soja. Analogamente, Marcos-Filho et al. (1997) provaram que a deterioração não influenciou a expressão dos fragmentos RAPD, havendo mudanças nos fragmentos de DNA somente em termos quantitativos. Sendo assim, os mesmos autores indicam a

técnica RAPD, padronizada, como útil nos testes de identificação de cultivares de soja.

2.3) Coeficientes de similaridade e métodos de agrupamento:

Nos últimos anos, um grande número de coeficientes tem sido formulado, como medida de similaridade para a diferenciação entre genótipos (Krzanowsky, 1988).

Existem vários coeficientes de similaridade, mas os mais indicados para a análise de dados binários, como marcadores do tipo RAPD, enzimas e proteínas, são aqueles que relacionam variáveis dicotômicas, ou seja, aquelas que possuem somente dois valores (Sokal e Sneath, 1963; Gower, 1985).

A escolha de um determinado coeficiente envolve uma certa subjetividade. No entanto, segundo Krzanowsky (1988), nessa escolha deverão ser consideradas a natureza e propósitos do estudo. Para Gower e Legendre (1986) não há um completo entendimento das conseqüências da escolha de determinado coeficiente de similaridade.

Coeficientes idênticos têm sido propostos sob diferentes nomes, como por exemplo, o coeficiente de Jaccard, também chamado de coeficiente de Gower, ou mesmo o coeficiente de Sorensen-Dice, também conhecido como coeficiente de Nei e Li (Mumm e Dudley, 1995).

Um dos aspectos a se considerar nessa escolha é a inclusão ou não das co-ocorrências negativas no coeficiente, estando essa inclusão muito relacionada aos tipos de características com que se está trabalhando. Para algumas delas, pode ser que a ausência da característica, em ambos os indivíduos, indique similaridade, mas para outras, isto não acontece. Levando-se em consideração a base genética dos marcadores RAPD (Williams et al., 1990), observa-se que a ausência da amplificação de uma determinada banda em dois genótipos não representa, necessariamente, semelhança genética entre estes, o que faz com que

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido na área experimental e no Laboratório de Análise de Sementes da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizado no município de Lavras, na região sudoeste do estado de Minas Gerais.

Foram utilizadas seis cultivares de feijão do tipo Carioca pertencentes ao centro de domesticação Mesoamericano: Carioca, Carioca MG, Aporé, Pérola, IAPAR 57 e IAPAR 81, cuja genealogia está apresentada na Tabela 1.

TABELA 1. Genealogia das seis cultivares de feijão analisadas. UFLA, Lavras-MG, 1999. Fonte: Carneiro, J.E.S. (trabalho a ser publicado).

Cultivar	Genealogia
Carioca	Seleção dentro de lavoura de produtores
Carioca MG	Car.80 ¹ /Rio Tibagi
Aporé	(Car. / México 168) // (Car. / Bat 76 ²)
Pérola	Seleção Aporé
IAPAR 57	(Porrilo Sintético / Aeté 1-38) // [(CENA 83-1 / IAPAR BAC 32) // (CENA 83-2 / CENA 83-1)]
IAPAR 81	BAT 93 ³ / [(Carioca 80 / G. N. Nebraska 1 Sel. 27) // Sel. Aroana] /5/ A 176 ⁴ /4/ A 259

¹Car. 80: Carioca / Cornell 49-242.

²BAT 76: Carioca / México 168 /4/ Carioca /// [(Porrillo n.º 1 / Gentry 21439) / (Gentry 21439 // 51052 / Cornell 49-242)].

³BAT 93: (Veranic 2 / Tlalnepantla 64) // (Jamapa / Tara).

⁴A176: Aroana /// [(Veranic 2 / Tlalnepantla 64) // (Jamapa / Tara)].

As sementes foram multiplicadas na área experimental da Universidade Federal de Lavras, em parcelas contendo quatro linhas de 2,5m de comprimento para cada cultivar, o que permitiu serem produzidas sob as mesmas condições

climáticas, visando à obtenção de sementes com qualidades fisiológicas semelhantes.

A colheita manual das plantas foi realizada no estágio de desenvolvimento R9, do qual foram transferidas para um galpão a fim de complementar a secagem e a trilha foi realizada manualmente quando as sementes apresentavam 13% de teor de água.

Posteriormente foram realizados os testes para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes das diferentes cultivares, assim como a avaliação dos caracteres morfológicos, dos padrões protéicos, enzimáticos e de DNA de plântulas e sementes.

3.1) Avaliação da qualidade fisiológica:

Teste de germinação:

O teste de germinação foi realizado com 200 sementes de cada cultivar distribuídas em quatro repetições de 50 sementes, cuja semeadura foi realizada em papel de germinação previamente umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel. Em seguida, as sementes foram transferidas para germinador previamente regulado à temperatura constante de 25°C, sendo realizada a avaliação cinco dias após a instalação do teste, quando foi computado o número de plântulas normais de acordo com as prescrições contidas nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

Emergência de plântulas em canteiro:

Foram semeadas em canteiros 200 sementes de cada cultivar, divididas em quatro repetições de 50 sementes. A profundidade de semeadura foi a recomendada para a cultura do feijão e a irrigação efetuada sempre que

necessário. A contagem das plântulas emersas foi feita aos 21 dias após a semeadura, segundo as recomendações de Vieira e Carvalho (1994).

Índice de velocidade de emergência (IVE):

Esse teste foi estabelecido conjuntamente com o teste de emergência em canteiro, conforme metodologia descrita por Vieira e Carvalho (1994). No início da emergência, avaliações diárias foram realizadas e o número de plântulas emergidas foi computado até a estabilização. O índice de velocidade de emergência foi calculado por meio da fórmula proposta por Edmond & Drapala (1958), citado por Vieira e Carvalho (1994).

Envelhecimento acelerado:

Amostras de 200 sementes, divididas em duas repetições de 100 sementes para cada cultivar, foram colocadas sobre telas de alumínio adaptadas a caixas plásticas tipo "gerbox", contendo 40ml de água destilada no fundo. Estas foram transferidas para câmara tipo BOD à 42°C por 72 horas (Vieira e Carvalho, 1994). Em seguida foi realizado o teste de germinação e posterior avaliação segundo os critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso para os testes de germinação e envelhecimento acelerado, e o de blocos casualizados para emergência de plântulas em canteiro e índice de velocidade de emergência, cujos dados foram analisados pelo programa SISVAR (Sistema de Análise de Variância) (Ferreira, 1990), sendo a comparação das médias realizada pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

3.2) Avaliação das características morfológicas:

Para a avaliação das características morfológicas, cinco sementes de cada cultivar foram semeadas em vasos de plástico contendo 9kg da mistura terra e areia na proporção de 2:1, os quais foram colocados em casa de vegetação e irrigados sempre que necessário.

No momento da semeadura foi realizada a adubação em solução com macro e micronutrientes. Foram utilizados 35g de nitrato de potássio como fonte de potássio e nitrogênio, e 27,71g de sulfato de magnésio como fonte de magnésio e 0,53g de sulfato de cobre, 0,26g de ácido bórico, 0,17g de molibdato de amônio, 1,98g de sulfato de zinco e 1,16g de sulfato de manganês como fontes de cobre, boro, molibdênio, zinco e manganês, respectivamente. Como fonte de fósforo, foi utilizado 20,65g de super simples por vaso.

A adubação foi feita antes da semeadura, quando foram colocados 20ml da solução de macronutrientes e 20ml da solução de micronutrientes juntamente com 6g de super simples em cada vaso. Após 30 dias foi realizada a adubação de cobertura com 20 ml de solução por vaso, contendo 35g de nitrato de potássio em 200ml de água.

As características morfológicas avaliadas, as quais são citadas como descritores mínimos do feijoeiro na Lei de Proteção de Cultivares (Brasil, 1997), foram as seguintes:

Plântula - (avaliação realizada aos oito dias após a semeadura, correspondendo ao estágio V2 de desenvolvimento):

- presença de antocianina nos cotilédones,
- presença de antocianina no hipocótilo,
- dimensão da folha primária.

Planta - (avaliação realizada aos 30 dias após a semeadura, correspondendo ao estágio V4 de desenvolvimento):

- hábito de crescimento,
- presença de antocianina no caule.

Folha - (época de avaliação e estágio de desenvolvimento idem ao anterior):

- cor do folíolo central do quarto nó (verde muito claro, verde claro, verde médio, verde escuro, verde muito escuro),
- dimensões (pequena, média ou grande),
- índice comprimento/largura,
- rugosidade.

Flor - (avaliação realizada aos 42 dias após a semeadura, correspondendo ao estágio R6 de desenvolvimento):

- uniformidade da cor,
- cor da asa (branca, rosa ou roxa),
- cor do estandarte (branca, rosa ou roxa),
- posição da inflorescência terminal - somente para hábito de crescimento determinado (em meio à cobertura, ao nível da cobertura, acima da cobertura).

Vagem:

Maturidade fisiológica - (avaliação realizada aos 60 dias após a semeadura, correspondendo ao estágio R8 de desenvolvimento):

- uniformidade da cor,
- cor primária (amarela, verde, roxa),
- cor secundária (vermelho, roxo),
- forma da secção transversal (achatada, periforme, elíptica, octomorfa, circular),
- presença de fio,

- **textura da superfície (lisa ou rugosa).**

Maturação de colheita (avaliação realizada aos 75 dias após a semeadura, correspondendo ao estágio R9 de desenvolvimento):

- **uniformidade da cor,**
- **cor primária e secundária (para cultivares com vagem bicolor),**
- **perfil (reto, semi-arqueado, arqueado, recurvado),**
- **ápice (abrupto, afilado),**
- **forma do dente apical (reto ou arqueado),**
- **posição do dente apical (marginal ou não marginal).**

Semente - (avaliação realizada após a colheita):

- **uniformidade da cor,**
- **cor primária e secundária (para cultivares com semente bicolor),**
- **presença de variação na testa**
- **peso de 1000 sementes (< 210, 211-220, 221-230, 231-240, 241-250, 251-260, 261-270, 271-280 ou > 280),**
- **forma - coeficiente J = comprimento/largura (esférica: 1,16 a 1,42; elíptica: 1,43 a 1,65; oblonga/reniforme curta: 1,66 a 1,85; oblonga/reniforme média: 1,86 a 2,00; oblonga/reniforme longa: > 2,00),**
- **grau de achatamento - coeficiente H = espessura/largura (achatada: < 0,69; semi-cheia: 0,7 a 0,79; cheia: >0,8),**
- **brilho (opaco, intermediário ou brilhoso),**
- **presença de halo,**
- **cor do halo.**

Cultivar:

- grupo comercial (branco, carioca, jalo, mulatinho, preto, rosinha, roxo, outros).

Para as características morfológicas quantitativas como a largura, comprimento e índice comprimento/largura referentes ao foliolo central do quarto nó das plantas, bem como o peso de 1000 sementes, os genótipos foram avaliados calculando-se a distância Euclidiana Média, que é definida pela seguinte expressão (Cruz e Regazzi, 1994):

$$D_{ii'} = \left[\frac{1}{n} \sum_j (x_{ij} - x_{i'j})^2 \right]^{0,5}; \text{ onde:}$$

- $D_{ii'}$: distância Euclidiana Média entre os genótipos i e j ;
- n : número de caracteres analisados;
- x_{ij} : observação no i -ésimo progenitor em referência ao j -ésimo caráter.

O programa GENES (Cruz, 1997) foi utilizado para a obtenção das distâncias Euclidiana Média, sendo requerido, para tanto, um arquivo de dados com as médias de cada genótipo em relação aos caracteres estudados.

Calculada a distância Euclidiana Média, os genótipos foram agrupados pelo método UPGMA, o qual foi realizado no programa Statistica (Statsoft, 1996) sendo construído um dendrograma para simplificar a representação das dissimilaridades (Rohlf, 1992).

A análise das características morfológicas qualitativas foi realizada por intermédio do software NTSYS-PC (Rohlf, 1992). Às características morfológicas qualitativas foram atribuídos valores 0 e 1 para a ausência e presença de cada característica. A partir daí foi construída uma matriz de 0 e 1 e

a estimativa de similaridade genética (S_{gij}) entre cada par de genótipos foi calculada pelo coeficiente de Jaccard, pela seguinte expressão:

$$\text{Coeficiente de Jaccard: } S_{gij} = \frac{a}{(a+b+c)}$$

As variáveis foram obtidas como demonstrado no esquema abaixo:

		Genótipo i	
		1	0
Genótipo j	1	a (1,1)	b (0,1)
	0	c (1,0)	d (0,0)

As letras a, b, c e d assumiram as seguintes representações:

- a: presença da característica em ambos os genótipos,
- b: ausência da característica no genótipo i e presença em j,
- c: presença da característica no genótipo i e ausência em j,
- d: ausência da característica em ambos os genótipos.

Os genótipos foram agrupados pelo método UPGMA (unweighted pair-group method), obtendo-se desta forma, um dendrograma (Rohlf, 1992).

Os erros associados a cada similaridade foram estimados segundo Skroch, Tivang e Nienhuis (1992), utilizando as seguintes expressões:

$$\text{Variância (s)} = (1-s) / (n-1)$$

$$\text{Erro padrão estimado} = (\text{vars} / n)^{1/2}, \text{ onde:}$$

- s : similaridade genética obtida por meio do coeficiente de similaridade;
- n : número total de bandas.

3.3) Extração de proteínas e análise eletroforética:

Para as análises eletroforéticas de proteínas pelo método SDS-PAGE, foram utilizadas 100mg de sementes moídas em moinho refrigerado.

Foram utilizados dois tampões de extração, NaCl 0,5M e tampão borato 0,02M pH 9 + tampão desnaturante (0,02M de tris-HCl pH 8,6, 1% de SDS, 0,3% de β -mercaptoetanol, 8,3% de glicerol) , na quantidade de 1000 μ l por 100mg de semente moída.

Após a adição do tampão NaCl 0,5M, as amostras permaneceram em agitação por 30 minutos e foram centrifugadas a 16.000 xg por três minutos.

As amostras extraídas com tampão borato foram agitadas por 10 minutos e centrifugadas a 16.000 xg por três minutos. O sobrenadante de cada amostra foi retirado, a ele adicionados 750 μ l de tampão desnaturante (20mM de Tris-HCl pH 8,6; 1% de SDS; 0,3% de 2- β -mercaptoetanol; 8,3% de glicerol) e então as amostras foram aquecidas a 90°C por dois minutos seguindo as prescrições de Lioi (1991).

Feitas as extrações, a concentração de proteínas de todos os sobrenadantes foi medida seguindo os procedimentos de quantificação de microproteínas (Bio-Rad), modificados com base nos métodos previamente descritos por Lowry, Rosebrough e Randal (1951) e Bradford (1976), usando soro albumina bovina (BSA) como padrão.

Uma vez calculada a concentração de proteínas para cada amostra, as mesmas foram diluídas para uma concentração correspondente ao menor valor observado entre as concentrações de todas as amostras, o qual foi de 4 μ g de proteína/ μ l de solução, com tampão de amostra (0,125M de Tris-HCl pH 6,8; 4% de SDS; 30% de glicerol; 0,05% de azul de bromofenol).

Em seguida foram aplicados 60 μ l de extrato de cada amostra e 20 μ l do padrão de peso molecular de 213.000 a 8.000 daltons, em gel de poliacrilamida 12,5% (gel separador) e 6%(gel concentrador).

O tampão de corrida utilizado foi Tris-glicina + SDS pH 8,9 e a corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical, à temperatura ambiente e voltagem constante de 150V por quatro horas.

Terminada a corrida, os géis foram corados em solução de Coomassie Brilliant Blue a 0,05% por 24 horas e descorados em solução de etanol 5%, ácido acético 10% e água 85%, conforme Alfenas (1998). As proteínas também foram separadas pelo método eletroforético de isofocalização, o qual foi conduzido em aparelho PhastSystem (Amersham Pharmacia Biotech).

Para tal foram utilizados 100mg de sementes moídas de cada cultivar, aos quais foi adicionado 1ml de tampão de extração borato 0,02M pH 9. Em seguida, as amostras foram agitadas por 10 minutos e centrifugadas a 16.000 xg por três minutos. A concentração de proteínas no sobrenadante de cada amostra foi medida seguindo os procedimentos de quantificação de micro-proteínas (Bio-Rad) mencionado acima. Conhecidas estas concentrações, as amostras foram diluídas em água ultra-pura para uma concentração fixa de 0,5µg de proteína/µl de solução. Após o que foram aplicados 2µl de cada amostra em gel do tipo ExcelGel SDS gradient 8-18 da marca Amersham Pharmacia Biotech.

O método de separação consistiu de três passos: pré-focalização a 2000V, aplicação das amostras a 200V e focalização a 2000V. O tempo total de corrida foi de aproximadamente 35 minutos após a qual o gel foi corado com um kit de coloração com prata da marca Amersham Pharmacia Biotech.

A avaliação dos géis de SDS-Page constou da observação da presença e ausência de bandas em cada genótipo.

Na avaliação do gel de isofocalização, a ausência e presença de bandas foi designada por 1 e 0, respectivamente. Foi construída uma matriz de 0 e 1 e a estimativa de similaridade genética (S_{gij}) entre cada par de genótipos foi calculada pelo coeficiente de Jaccard. Estimadas as similaridades genéticas, os genótipos foram agrupados pelo método UPGMA (unweighted pair-group

method), obtendo-se desta forma, um dendrograma (Rohlf, 1992). Os erros associados a cada similaridade foram estimados segundo Skroch, Tivang e Nienhuis (1992).

3.4) Extração de enzimas e análise eletroforética:

As análises eletroforéticas foram realizadas considerando de 100mg de epicótilo das plântulas de cada cultivar. As sementes foram colocadas em papel de germinação à 25°C, e, após cinco dias os epicótilos foram retirados, macerados sobre gelo, sendo adicionados 2,5 vezes o seu peso de tampão de extração e cerca de 2g do antioxidante PVP 40 (polivinilpirrolidone). Esses tampões foram Tris-HCl 0,2M + 0,001% de β -mercaptoetanol pH 8 e tampão fosfato (0,034M de fosfato de sódio bi-básico; 0,2M de sacarose; 2,56% de PVP40; 3 M de DTT; 5,7 mM L ácido ascórbico; 2,5 mM de borato de sódio; 1% de PEG 6000, 0,002% de β -mercaptoetanol). Este último foi utilizado somente para a extração da enzima peroxidase.

Após a maceração, as amostras foram deixadas a uma temperatura de 4°C por uma noite e então centrifugadas a 16.000 xg por 60 minutos a 4°C, sendo, em seguida aplicados 100 μ l do sobrenadante de cada amostra em gel de poliacrilamida 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O tampão de corrida utilizado foi Tris-glicina pH 8,9 e a corrida eletroforética foi realizada a 4°C por quatro horas a uma voltagem de 150V, após a qual, os géis foram revelados para os sistemas enzimáticos esterase (EST-EC 3.1.1.1), peroxidase (PO-EC 1.11.1.1), glutamato-oxalacetato transaminase (GOT-EC 2.6.1.1), diaforase (DIA- EC 1.8.1.4) e álcool desidrogenase (ADH-EC 1.1.1.1), seguindo as prescrições de Alfenas (1998).

A avaliação dos géis constou da observação da presença e ausência de bandas em cada genótipo, designadas por 1 e 0, respectivamente. Foram

construídas matrizes de 0 e 1 e a estimativa de similaridade genética (S_{gij}) entre cada par de genótipos foi calculada pelo coeficiente de Jaccard. Estimadas as similaridades genéticas, os genótipos foram agrupados pelo método UPGMA (unweighted pair-group method), obtendo-se um dendrograma (Rohlf, 1992). Os erros associados a cada similaridade foram estimados segundo Skroch, Tivang e Nienhuis (1992).

3.5) Extração do DNA:

Foram coletadas, nas horas mais frescas do dia, folhas jovens das plantas de cada cultivar para a extração de DNA. Estas foram lavadas e 3g trituradas em almofariz com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Após, foram adicionados, a uma temperatura de 65°C, 10ml de tampão de extração CTAB (2% de CTAB; 100mM de Tris pH 8; 20mM de EDTA pH 8; 1,4M de NaCl e 1% de PVP) pré-aquecido à 65°C, mais 20µl de β-mercaptoetanol em cada amostra, as quais foram deixadas em banho-Maria a 65°C por 30 minutos. Foram, então, adicionados em cada amostra 10ml da mistura clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1 sendo as mesmas vertidas 20 vezes e centrifugadas por 10 minutos a 2.000 xg em centrífuga Eppendorf 5402. O sobrenadante foi colocado em outro tubo, o volume medido, e adicionados 0,1 volume de CTAB 10% (10% de CTAB; 5M de NaCl).

A extração com clorofórmio mais álcool isoamílico foi repetida, sendo, em seguida, adicionado 1 volume de tampão de precipitação CTAB (1% de CTAB; 1M de Tris-HCl pH 7,5; 0,5M de EDTA). Após essa mistura, o material foi deixado em repouso por 15 minutos e então, as amostras foram centrifugadas por quatro minutos a 8.000 xg, o sobrenadante descartado e o sedimento dissolvido em banho-Maria a 65°C em 400µl de TE (1M de Tris-HCl pH 7,5; 0,5M de EDTA; 5M de NaCl).

A partir desse ponto foi realizada uma série de lavagens, sendo o DNA precipitado em 2 volumes de etanol absoluto e centrifugado por cinco minutos a 11.600 xg, o sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com 700µl de etanol 70% e, após outra centrifugação, com 400 µl de etanol 100%.

O precipitado foi colocado para secar e depois dissolvido em 250µl de TE 1/10 (1M de Tris-HCl pH 7,5; 0,5M de EDTA). Em seguida, foi determinada a quantidade de DNA em cada amostra por meio de um fluorímetro Hoefer DyNA Quant 200 , utilizando alíquotas de 2µl de amostra para cada 2ml de solução teste (0,01% de solução estoque do corante Hoechst; 10% tampão TNE 10x).

Amplificação do DNA e eletroforese:

Cada reação de RAPD constou de um volume final de 13µl, sendo seus componentes: 5,29µl de água ultra pura; 1,2µl de tampão de reação (1M de Tris-HCl pH 8; 1M de MgCl₂; 125mg.ml⁻¹ de soro albumina bovina; 1M de KCl); 0,96µl de nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 2,4µl de primer; 0,15µl da enzima taq DNA polimerase (Pharmacia) e 3µl de DNA na concentração de 10ng/µl.

Foram utilizados 128 primers com dez bases de seqüência arbitrária, obtidos da "Operon Technologies" (Califórnia - EUA).

As reações de PCR foram realizadas em termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9700, programado para 45 ciclos nas seguintes condições: um primeiro ciclo a 94°C por cinco minutos, 45 ciclos com temperatura de desnaturação de 94°C por 15 segundos, temperatura de anelamento de 36°C por 30 segundos e temperatura de alongação de 72°C por um minuto, e um último ciclo de manutenção a 72°C por cinco minutos.

Após a amplificação, os produtos de cada reação foram acrescidos de 3µl de tampão de corrida contendo azul de bromofenol, e aplicados em gel de agarose 1% para sua separação por eletroforese. O tampão do tanque utilizado foi TBE 0,5x (0,045M de Tris-borato; 0,001µl de EDTA pH 8) e as condições de corrida foram 50V por três horas.

Terminada a corrida, os géis foram corados com brometo de etídeo (0,5µg/ml), visualizados em transluminador de luz ultra-violeta e fotografados com filme polaróide 667.

A avaliação dos géis constou da observação da presença e ausência de bandas em cada genótipo, designadas também por 1 e 0, respectivamente. Foi construída uma matriz de 0 e 1 e a estimativa de similaridade genética (S_{gij}) entre cada par de genótipos foi calculada pelo coeficiente de Sorence-Dice, como recomendado por Duarte (1998). A seguinte expressão representa o referido coeficiente:

$$\text{Coeficiente de Sorence-Dice: } S_{gij} = \frac{2a}{(2a + b + c)}$$

As variáveis foram obtidas como demonstrado anteriormente.

Os genótipos foram agrupados pelo método UPGMA (unweighted pair-group method), obtendo-se dessa forma, um dendrograma (Rohlf, 1992). Os erros associados a cada similaridade foram estimados segundo Skroch, Tivang e Nienhuis (1992).

3.6) Comparação entre os marcadores morfológicos e moleculares de proteínas, enzimas e de DNA:

Para avaliar a relação existente entre os quatro tipos de marcadores estudados neste trabalho, foram estimadas as correlações de Spearman (Duarte,

1998; Machado, 1999) entre as distâncias genéticas obtidas pelas características morfológicas quantitativas e as similaridades genéticas obtidas com base nas características morfológicas qualitativas e marcadores moleculares de proteínas, enzimas e DNA. Os cálculos de correlação foram realizados com o auxílio do programa Mapgen (Ferreira e Zambalde, 1997).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1) Qualidade fisiológica das sementes:

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados dos testes utilizados para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes das seis cultivares de feijão utilizadas neste estudo.

TABELA 2. Resultados médios de germinação (G-%), envelhecimento acelerado (EA-%), emergência aos 21 dias (E-%) e índice de velocidade de emergência (IVE) das seis cultivares de feijão. ULFA, Lavras-MG, 1999.

Cultivar	G	EA	E	IVE
Carioca	97a	97a	97a	10,2a
Carioca MG	99a	96a	95a	10,6a
Aporé	97a	91a	93a	9,8a
Pérola	98a	96a	95a	9,5a
IAPAR 57	100a	96a	94a	9,6a
IAPAR 81	96a	93a	97a	10,3a

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1%.

Não foram observadas diferenças estatísticas nos valores de germinação e vigor das sementes das cultivares utilizadas na pesquisa. Diante disso, como as sementes de todas as cultivares utilizadas apresentaram elevados níveis de qualidade fisiológica, e não havendo diferença entre elas, as diferenças encontradas nos padrões eletroforéticos de proteínas e enzimas foram devidas provavelmente aos próprios genótipos.

A qualidade fisiológica é um fator que tem afetado os padrões eletroforéticos de proteínas e de enzimas, levando a erros em sua interpretação. Com isso, a veracidade dos resultados dos testes de certificação da pureza genética e identificação de cultivares fica comprometida.

Nos últimos anos, estudos realizados por Silva (1997), Vieira (1996), Brandão Júnior (1996) e Cherry (1983), mostraram alterações dos padrões eletroforéticos de proteínas e enzimas em razão de fatores como a presença de microrganismos e envelhecimento, os quais afetam diretamente a qualidade fisiológica das sementes.

Em relação ao efeito da qualidade fisiológica nos padrões eletroforéticos de DNA, parece ocorrer alterações qualitativas, como demonstrado em sementes de soja envelhecidas e avaliadas pela técnica RAPD (Marcos Filho et al., 1997). Sendo assim, como a técnica RAPD emprega pequenas quantidades de DNA, mesmo se houvesse diferenças na qualidade fisiológica das sementes das cultivares de feijão utilizadas neste estudo, estas não afetariam os resultados, sendo as diferenças encontradas nos padrões eletroforéticos de DNA atribuídas, mais uma vez, aos genótipos.

4.2) Características Morfológicas:

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados médios observados para comprimento, largura e índice comprimento/largura do folíolo central do quarto nó e avaliadas no estágio de desenvolvimento V4, e do peso de 1000 sementes.

TABELA 3. Valores médios do comprimento (cm), largura (cm), índice comprimento/largura (Ic/l) (cm) e peso de 1000 sementes (g) das seis cultivares de feijão. UFLA, Lavras-MG, 1999.

Cultivar	Comprimento	Largura	Ic/l	Peso de 1000 sementes
Carioca	5,3a	5,0a	1,69a	204,16e
Carioca MG	5,6a	4,9a	1,77a	196,70f
Aporé	5,6a	4,9a	1,65a	235,37b
Pérola	5,4a	4,7a	1,98a	248,55a
IAPAR 57	6,0a	5,0a	1,68a	208,91d
IAPAR 81	5,1a	4,3a	1,74a	231,76c
Média	5,5	4,8	1,75	220,90

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott a 1%.

Foram observadas diferenças estatísticas entre as cultivares apenas quanto ao peso de 1000 sementes (Tabela 3). Maiores valores de peso de 1000 sementes foram observados para a cultivar Pérola e menores para a cultivar Carioca MG. Além de o fator genético influenciando os fenótipos, características como comprimento, largura, índice comprimento/largura e peso de 1000 sementes são quantitativas, ou seja, controladas por um grande número de genes e acentuadamente afetadas pelo ambiente (Ramalho, Santos e Pinto, 1990). Mesmo assim, a heterogeneidade quanto ao peso de 1000 sementes, observada entre as cultivares, pode ser explicada pelo efeito dos próprios genótipos, uma vez que as sementes foram multiplicadas sobre as mesmas condições ambientais e na mesma época.

A distância genética entre as cultivares, considerando as quatro características morfológicas quantitativas, estimada pelo cálculo da distância Euclidiana Média, encontra-se na Tabela 4.

TABELA 4. Distância genética entre as cultivares de feijão Carioca (1), Carioca MG (2), Aporé (3), Pérola (4), IAPAR 57 (5) e IAPAR 81 (6), estimada pela distância Euclidiana Média em relação as quatro características morfológicas quantitativas. UFLA, Lavras-MG, 1999.

Cultivar	1	2	3	4	5	6
1	-	1,118	0,969	1,536	1,255	1,791
2		-	1,406	1,347	0,925 ¹	1,697
3			-	1,163	1,017	1,726
4				-	1,525	1,090
5					-	2,061 ²
6						-

¹: par de genótipos menos divergente; ²: par de genótipos mais divergente.

As cultivares mais divergentes pelas características morfológicas quantitativas foram IAPAR 57 e IAPAR 81, e as semelhantes as cultivares Carioca MG e IAPAR 57, com valores de similaridade de 1,061 e 0,075, respectivamente (Tabela 4). A distância média entre cada par de genótipos foi de 1,375.

A semelhança entre as cultivares Carioca MG e IAPAR 57 é explicada pela existência de progenitores que apresentam sementes com o tegumento de cor preta, como a cultivar Cornell 49-242 na genealogia da cultivar Carioca MG, e a cultivar Porrilo na genealogia da cultivar IAPAR 57 (Tabela 1). Sabe-se que o caráter cor do tegumento é codificado pelo menos por 10 genes e que existem interações complexas entre esses genes e aqueles que codificam outras

características (Basset, 1989; Leakey, 1988). Dessa forma, os genes que codificam a cor preta do tegumento das sementes das cultivares Cornell 49-242 e Porrilo devem afetar outras características, que provavelmente foram transferidas para as cultivares Carioca MG e IAPAR 57 ao longo dos cruzamentos que lhes deram origem.

Baseando-se nos coeficientes de distância genética gerados pela distância Euclidiana Média, foi construído um dendrograma pelo método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA), o que permitiu visualizar com maior facilidade o relacionamento das cultivares (Figura 1).

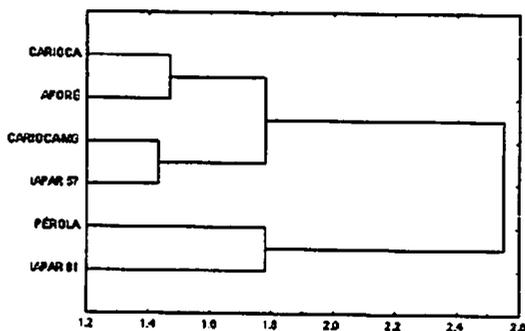


FIGURA 1. Dendrograma de distâncias genéticas entre as seis cultivares de feijão, referente às características morfológicas quantitativas, obtido pelo método UPGMA. UFLA, Lavras-MG, 1999.

Como observado na Figura 1, foram formados dois grupos: I) contendo as cultivares Carioca, Carioca MG, Aporé e IAPAR 57, e II) contendo as cultivares IAPAR 81 e Pérola.

O agrupamento das cultivares Carioca, Carioca MG e Aporé em um mesmo grupo está de acordo com os resultados obtidos por Machado (1999), já que as cultivares Carioca MG e Aporé foram obtidas por meio de cruzamentos com 50% ou mais de alelos da cultivar Carioca.

A similaridade genética existente entre as cultivares Pérola e IAPAR 81 provavelmente foi devida à presença, nos cruzamentos que as originaram, de materiais com sementes de tegumento preto. Na genealogia da cultivar IAPAR 81 (Quadro 1), encontra-se a variedade Jamapa, que possui sementes de cor preta, como progenitor. A cultivar Pérola foi obtida com base em uma seleção de linhas puras realizada dentro da cultivar Aporé. Esta por sua vez, possui progenitores que apresentam sementes com o tegumento preto como as cultivares Porrillo e Cornell 49-242. A presença de progenitores com tal característica pode explicar a similaridade genética entre as cultivares Pérola e IAPAR 81, uma vez que a característica cor do tegumento estão ligadas a outras, as quais podem ter sido transmitidas para estas cultivares ao longo dos cruzamentos.

Em relação às características morfológicas qualitativas, na fase em que as plântulas apresentavam dois folíolos (V2), determinadas cultivares diferiram quanto a presença de antocianina nos cotilédones, a exemplo, pode-se citar a cultivar IAPAR 57 que apresentou cotilédones pigmentados com antocianina (Figura 2)

Na avaliação das plantas antes do florescimento (V4), a única diferença encontrada foi a presença de antocianina no caule das cultivares IAPAR 57 e IAPAR 81 (Figura 3) cuja ocorrência em partes da planta de feijoeiro está relacionada com um dos genes que codificam a cor preta das sementes, o gene P. Como já mencionado, os genes responsáveis pela cor das sementes possuem complexa relação com outros genes (Basset, 1989). Sendo assim, a presença de antocianina nos cotilédones e nos caules das plântulas da cultivar IAPAR 57 e da cultivar IAPAR 81, são características que foram herdadas das cultivares progenitoras Porrillo e Jamapa que possuem sementes com tegumento preto (Quadro 1).

Ainda na avaliação realizada no estágio de desenvolvimento V4, todas as cultivares apresentaram hábito de crescimento indeterminado, folíolo central do quarto nó na cor verde médio, ausência de rugosidade e dimensão média. Essas características apresentaram-se de pouca contribuição para a diferenciação das cultivares; assim, o uso de tais características como descritores mínimos para a certificação da pureza genética e identificação de cultivares de feijão é muito limitado.

Da mesma forma, no florescimento não foram detectadas diferenças entre as seis cultivares estudadas, uma vez que as mesmas apresentaram flores de coloração uniforme além de asas e estandartes de cor branca.

Em relação às características das vagens, estas quando ainda verdes, apresentaram diferenças, sendo que todas elas mostraram-se com cor verde uniforme, secção transversal periforme, presença de fio e superfície lisa. No entanto, foram observadas diferenças entre as cultivares com relação às características das vagens no ponto de colheita (maturação de colheita - R9). As cultivares se diferenciaram quanto à forma do perfil, do ápice e do dente apical. As cultivares Aporé e IAPAR 57, Carioca e Pérola, Carioca MG e IAPAR 81, apresentaram vagens com perfis arqueado, semi-arqueado e reto, respectivamente (Figura 4). As características relacionadas à forma do ápice e do dente apical, também apresentaram-se diferentes no estágio R9. A cultivar IAPAR 81 apresentou vagens com ápice afilado e dente apical reto, enquanto as demais cultivares apresentaram vagens com ápice abrupto e dente apical arqueado (Figura 4). No entanto, durante as avaliações dessas características foi observada certa subjetividade, o que dificulta a utilização dessas para a certificação da pureza genética.

Entre as características avaliadas nas sementes, somente foi observada diferença na cor do halo para a cultivar Aporé, que apresentou coloração amarela (Figura 5).



FIGURA 2. Cotilédones das plântulas de feijão das seis cultivares de feijão, indicando a presença de antocianina (IAPAR 57).



FIGURA 3. Plantas de feijão não apresentando (Carioca MG) e apresentando antocianina no caule (IAPAR 57 e IAPAR 81).

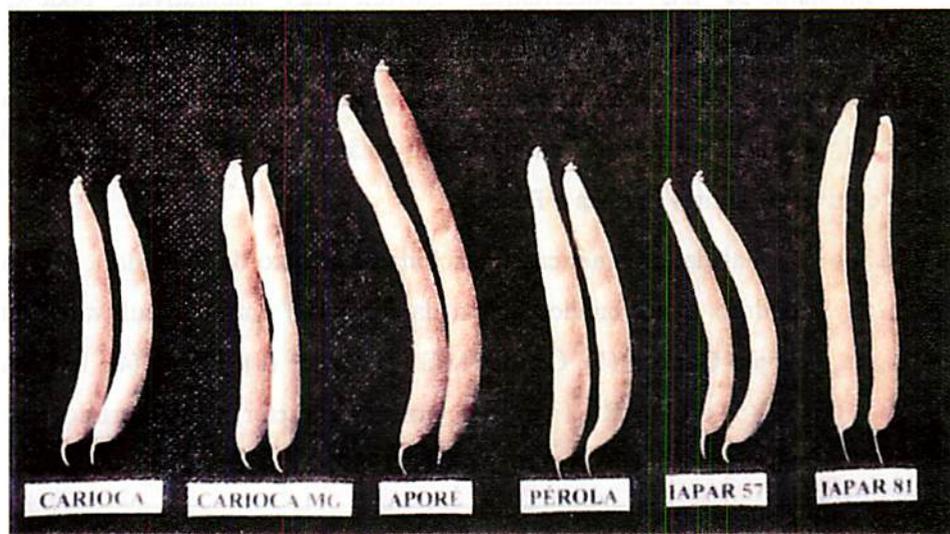


FIGURA 4. Vagens de feijão das seis cultivares no ponto de colheita.

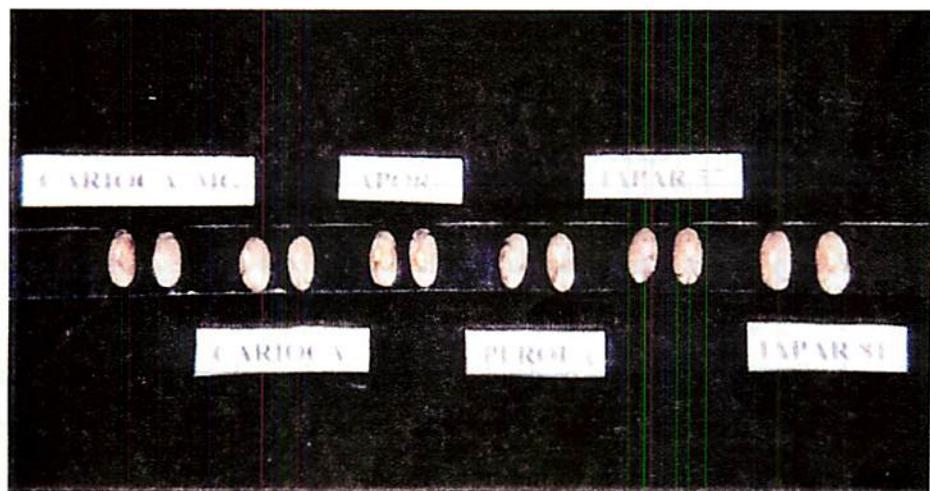


FIGURA 5. Cor do halo das sementes de feijão das seis cultivares de feijão.

Baseando-se nas características morfológicas qualitativas, pode-se observar pela matriz de similaridade apresentada na Tabela 4, que a maior similaridade genética está entre as cultivares Carioca e Carioca MG e Carioca e IAPAR 57, enquanto as menores similaridades estão entre a cultivar IAPAR 81 com as cultivares Aporé, Carioca e Pérola.

TABELA 4. Similaridades genéticas (posicionadas abaixo da diagonal) e erro padrão (posicionados acima da diagonal) entre as cultivares de feijão Carioca (1), Carioca MG (2), Aporé (3), Pérola (4), IAPAR 57 (5) e IAPAR 81 (6), referentes às características morfológicas qualitativas. UFLA, Lavras-MG, 1999.

Cultivar	1	2	3	4	5	6
1	-	0,094	0,096	0,096	0,094	0,068
2	0,600 ¹	-	0,096	0,096	0,090	0,090
3	0,500	0,500	-	0,090	0,078	0,000
4	0,500	0,500	0,333	-	0,096	0,078
5	0,600 ¹	0,333	0,200	0,500	-	0,090
6	0,143	0,333	0,000 ²	0,200	0,333	-

¹: par de genótipos menos divergente ²: par de genótipos mais divergente

Podem-se observar ainda na Tabela 4 os baixos valores referentes aos erros, o que comprova a veracidade dos dados de similaridade genética.

A Figura 6 mostra o dendrograma obtido pelo agrupamento das cultivares pelo método UPGMA, no qual se pode observar a similaridade genética entre as cultivares de forma simplificada.

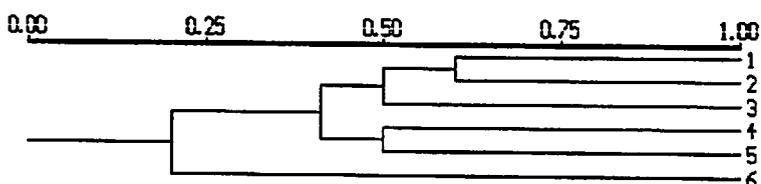


FIGURA 6. Dendrograma de similaridade genética entre as cultivares de feijão Carioca (1), Carioca MG (2), Aporé (3), Pérola (4), IAPAR (5) e IAPAR 81 (6), referente às características morfológicas qualitativas, obtido pelo método UPGMA. UFLA, Lavras-MG, 1999.

As seis cultivares foram separadas em dois grupos: I) Carioca, Carioca MG, Aporé, Pérola e IAPAR 57, e II) IAPAR 81. O grupo I ainda pode ser subdividido, sendo as cultivares Carioca e Carioca MG e Aporé mais semelhantes entre si, o que está de acordo com os resultados obtidos por Machado (1999), pois, como já mencionado, essas cultivares se originaram de cruzamentos com 50% ou mais de alelos da cultivar Carioca.

Ainda dentro do grupo I, a cultivar IAPAR 57 foi considerada como sendo a mais divergente. Tal fato pode ser explicado por esta cultivar ter como progenitor a cultivar Porrillo que apresenta sementes com tegumento preto. Além disso, a cultivar IAPAR 57 possui também como progenitores os materiais CENA 83-1 e CENA 83-2, os quais foram obtidos de linhagens de feijão Carioca submetidas à radiação, o que originou novos alelos e conseqüentemente maior variabilidade genética. Tal fato, provavelmente, contribuiu para tornar a cultivar IAPAR 57 divergente das demais agrupadas no grupo I.

A cultivar IAPAR 81 foi a que apresentou menor grau de similaridade em relação às demais quando se consideraram características morfológicas qualitativas. Vale ressaltar que para sua obtenção foram utilizados progenitores obtidos do cruzamento de *P. vulgaris* com *P. acutifolius*, como as variedades G.N. Nebraska e Tara (Tabela 1).

As cultivares Aporé e Pérola foram classificadas em grupos diferentes, apesar de esta última ter sido originada de uma seleção dentro da cultivar Aporé, que é considerada uma mistura de linhas puras, e conseqüentemente produzir materiais mais heterogêneos, a exemplo da ausência do halo amarelo na cultivar Pérola, que é característico na cultivar Aporé (Figura 5).

A diferenciação das cultivares dentro dos grupos não pôde ser efetuada com base nas características morfológicas. Diante disso, a certificação da pureza genética nos programas de controle de qualidade de empresas produtoras de sementes, bem como na identificação de cultivares, baseadas na observação de tais características não é suficiente para a separação de materiais com elevado grau de parentesco, como é o caso das cultivares de feijão do grupo carioca.

Neste trabalho não foi encontrada nenhuma característica morfológica qualitativa que separasse todos os materiais. Das seis cultivares de feijão estudadas somente três foram separadas com base nas características morfológicas: cultivar IAPAR 57, por apresentar cotilédones e caule com antocianina, cultivar IAPAR 81 apresentando antocianina no caule e vagens no ponto de maturidade de colheita com dente apical reto e ápice afilado, e cultivar Aporé por apresentar sementes com halo amarelo.

Algumas características, como as observadas nas vagens, apareceram no final do ciclo da cultura, o que mostra que, em algumas situações, a avaliação de características morfológicas requer um período maior e as sementes já estariam sendo comercializadas. A cultivar Aporé pode ser separada das demais pela observação do halo amarelo nas sementes secas. Quanto à cultivar IAPAR 57, esta pode ser separada ainda na fase de plântula pela ocorrência de antocianina nos cotilédones.

Sendo assim, se fazem necessários estudos das características morfológicas recomendadas como descritores mínimos para o feijão em outros

genótipos, empregando um maior número de repetições, e a associação destas características com outros marcadores mais eficientes.

4.3) Marcadores moleculares de proteínas e enzimas:

Pela análise de proteínas de reserva das sementes das seis cultivares de feijoeiro por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, foram observados resultados diferentes quanto aos tampões de extração utilizados. Proteínas extraídas com o tampão borato + tampão desnaturante apresentaram perfis de bandas de peso molecular entre 213.000 a 47.000 daltons e mais nítidos do que aqueles obtidos com os extratos provenientes das amostras extraídas com NaCl (Figuras 7A e B).

Pode ser observado pela Figura 7A, onde foi utilizado extrato proveniente da extração com tampão borato, que diferenças nos padrões das proteínas entre as seis cultivares em estudo não foram detectadas. Os perfis de bandas compreendidos na faixa de peso molecular de 44.000 daltons, o qual corresponde à proteína de reserva faseolina, apresentaram a mesma intensidade e estavam presentes em todas as cultivares. Esse resultado está de acordo com o obtido por Driedger et al. (1994) e Pereira & Souza (1992), que também não conseguiram diferenciar cultivares de feijão pela utilização da faseolina, quando estas pertencem a um mesmo centro de domesticação, pois dentro deste há predomínio de um tipo de faseolina. As cultivares estudadas pertencem ao centro de domesticação Mesoamericano e, portanto, possuem faseolina do tipo "S".

No método de extração com NaCl 0,5M, foi observada a presença de duas bandas polimórficas na faixa de peso molecular de 32.400 a 18.500 daltons. As cultivares Aporé e Pérola apresentaram um padrão de bandas único e diferente do padrão das outras cultivares, e que não se diferenciaram entre si (Figura 6B).

O padrão de bandas único apresentado pelas cultivares Aporé e Pérola reflete o grau de parentesco existente entre elas, já que esta última se originou de uma seleção de linhas puras feita nas lavouras da cultivar Aporé. A ausência de halo amarelo nas sementes da cultivar Pérola, que é a característica morfológica qualitativa da cultivar Aporé, sugere, como já mencionado, que os genes que codificam a cor do halo em sementes de feijão, podem estar ligados também à expressão de outras características como a expressão de proteínas na faixa de peso molecular de 32.400 a 18.500 daltons, característica esta responsável pela semelhança observada entre as cultivares Aporé e Pérola neste trabalho. Tal resultado está de acordo com Basset (1989) e Leakey (1988) que sugerem a ligação dos genes que codificam a cor do halo com outros genes.

O baixo nível de polimorfismo protéico obtido pelo método SDS-PAGE neste estudo sugere o uso de técnicas eletroforéticas mais refinadas, a exemplo da focalização isoelétrica, visando à separação de indivíduos de uma mesma espécie quanto a sua variabilidade em proteínas.

Na Figura 8 estão apresentados os perfis de proteína das sementes das cultivares, obtidos pela técnica de isofocalização. Pode ser observado que essa técnica gerou maior grau de polimorfismo e as seis cultivares puderam ser separadas em quatro grupos: I) Carioca e Carioca MG; II) Aporé e Pérola; III) IAPAR 57. IV) IAPAR 81.

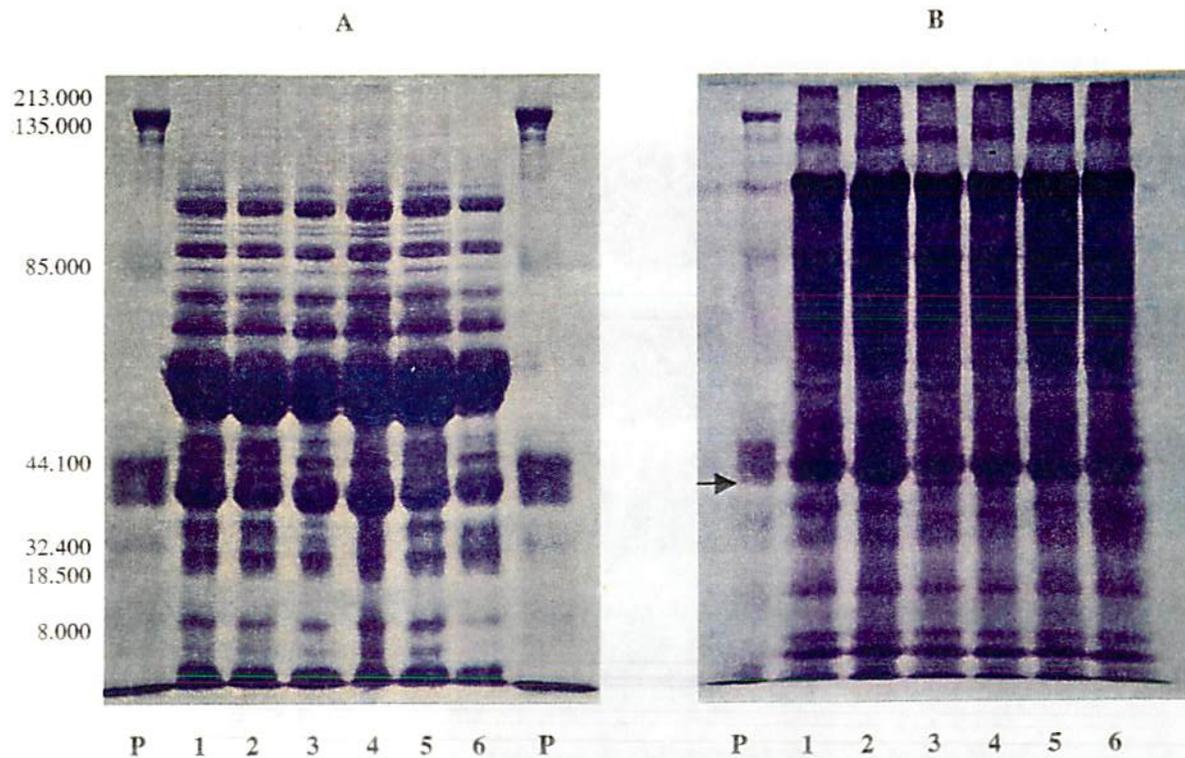


FIGURA 7. Perfis de bandas de proteínas das sementes das cultivares de feijão Carioca (1), Carioca MG (2), Aporé (3), Pérola (4), IAPAR 57 (5) e IAPAR 81 (6), extraídas com tampão borato + tampão desnaturante (A) e tampão NaCl (B), obtidos por eletroforese SDS-Page. P corresponde ao perfil de bandas gerado pelo padrão de Peso Molecular (daltons).

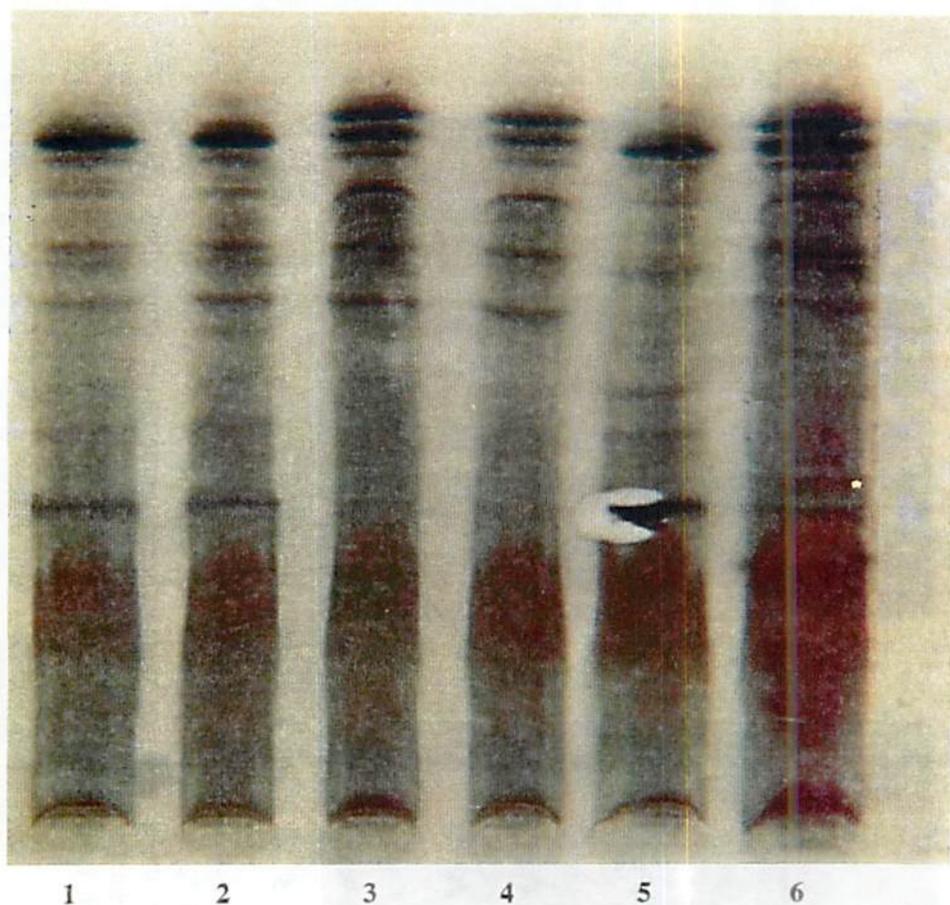


FIGURA 8. Perfil de bandas de proteína das sementes das cultivares de feijão Carioca (1), Carioca MG (2), Aporé (3), Pérola (4), IAPAR 57 (5) e IAPAR 81 (6), obtido pela técnica eletroforética de isofocalização.

TABELA 6. Similaridades genéticas (posicionadas abaixo da diagonal) e erro padrão (posicionados acima da diagonal) entre as cultivares de feijão Carioca (1), Carioca MG (2), Aporé (3), Pérola (4), IAPAR 57 (5) e IAPAR 81 (6), referentes aos dados protéicos obtidos pela técnica eletroforética de isofocalização. UFLA, Lavras-MG, 1999.

Cultivar	1	2	3	4	5	6
1	-	0,082	0,133	0,107	0,133	0,138
2	0,900 ¹	-	0,124	0,079	0,138	0,138
3	0,364	0,273	-	0,136	0,127	0,125
4	0,182	0,091 ²	0,600	-	0,115	0,137
5	0,636	0,545	0,300	0,222	-	0,139
6	0,545	0,455	0,714	0,429	0,500	-

¹: par de genótipos menos divergente ²: par de genótipos mais divergente

Pode ser observado pela Tabela 6, que a similaridade média entre as seis cultivares foi de 0,61 e os valores máximo de 0,900 entre as cultivares Carioca e Carioca MG, e mínimo de 0,091 Pérola e Carioca MG. Ainda nesta tabela, podem-se observar os baixos valores referentes aos erros, o que comprova a veracidade dos dados de similaridade genética.

A similaridade genética, representada de forma simplificada pelo dendrograma obtido pelo método UPGMA, mostra a separação das cultivares em dois grupos: I) Carioca, Carioca MG e IAPAR 57; grupo II) Aporé, IAPAR 81 e Pérola, havendo dentro de cada grupo uma subdivisão (Figura 9).

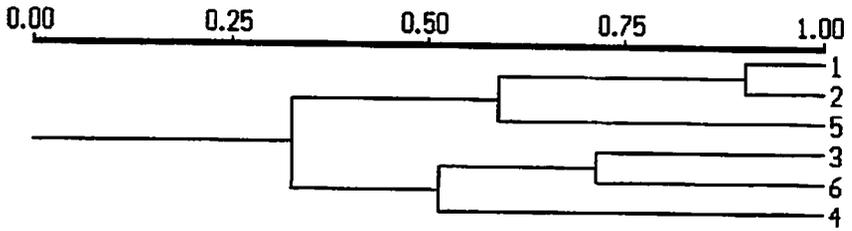


FIGURA 9. Dendrograma de similaridade genética entre as cultivares de feijão Carioca (1), Carioca MG (2), Aporé (3), Pérola (4), IAPAR 57 (5) e IAPAR 81 (6), referentes ao perfil de bandas protéicas gerado por isofocalização, obtido pelo método UPGMA. UFLA, Lavras-MG, 1999.

O grupo I foi dividido em dois subgrupos: I) Carioca e Carioca MG; II) IAPAR 57, e grupo II nos subgrupos I) Aporé e IAPAR 81 e II) Pérola.

O agrupamento das cultivares Carioca e Carioca MG num mesmo subgrupo reforça os resultados de Machado (1999), como já mencionado. A presença da cultivar IAPAR 57 neste mesmo subgrupo provavelmente seja por causa da existência de progenitores oriundos da cultivar Carioca, mesmo sendo submetida a alterações do genótipo por meio de radiação. A exposição à radiação pode ter sido responsável pela divergência apresentada entre esta cultivar e as cultivares Carioca e Carioca MG (0,663 e 0,545, respectivamente).

A similaridade genética entre as cultivares Aporé e IAPAR 81 provavelmente seja em razão da existência em suas genealogias de progenitores com sementes apresentando tegumento da cor preta. No caso da cultivar Aporé, esses progenitores estão representados pelas cultivares Porrillo e Comell 49-242, e na cultivar IAPAR 81 pela cultivar Jamapa. Parece que o controle genético da cor do tegumento afeta outros genes os quais devem ser responsáveis por outras características agrônômicas, conforme abordado por Basset (1989) e Leakey (1988).

Pelo agrupamento das cultivares, considerando-se a homogeneidade dentro dos grupos e a heterogeneidade entre os grupos, as cultivares Aporé e Pérola se mostraram semelhantes, apesar de esta última ter sido selecionada visando à eliminação do halo amarelo, uma vez que os genes responsáveis por esta característica estão ligados a características indesejáveis como o aumento do tempo de cozimento, escurecimento e diminuição da digestibilidade dos grãos (Leakey, 1988). Essa similaridade entre as duas cultivares pode ser observada pelos padrões protéicos obtidos pelas modalidades eletroforéticas de isofocalização e SDS-PAGE, nos quais as cultivares Aporé e Pérola apresentaram padrões idênticos entre si (Figuras 7 e 8).

A semelhança existente entre as cultivares Aporé e Pérola, observada nos padrões protéicos, e a distância genética revelada entre as mesmas cultivares pelas características morfológicas, provavelmente seja graças ao fato de que caracteres morfológicos têm maior efeito fenotípico, sendo mais passíveis de serem selecionados, enquanto características moleculares são mais conservadas ao longo dos processos de domesticação e melhoramento, como proposto por Gepts (1991).

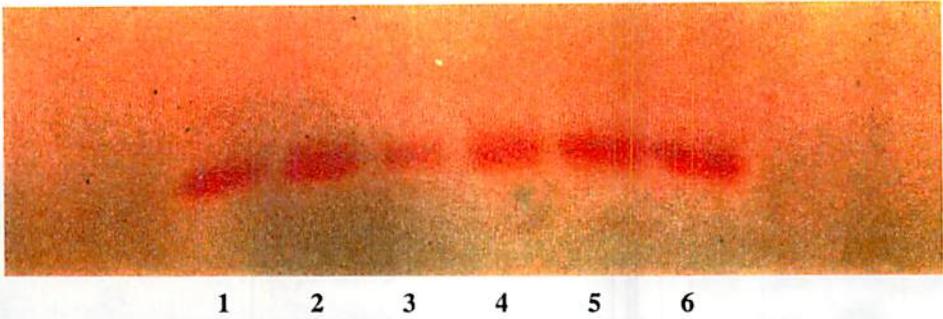
Como observado, a modalidade eletroforética de isofocalização permitiu a separação das cultivares em quatro grupos enquanto a eletroforese SDS-Page separou as cultivares em apenas dois grupos, ficando reconhecida a utilidade da

primeira para a identificação de cultivares. Pelos resultados obtidos, a eletroforese de proteínas para a identificação de cultivares como recomendado pela ISTA (1996), é uma ferramenta importante. No entanto, recomenda-se a associação de modalidades eletroforéticas como forma de complementação de resultados, o que está de acordo com Driedger et al. (1994) e Hussain et al. (1986).

Quanto aos marcadores enzimáticos, ocorreram variações nos padrões de banda para três dos cinco sistemas enzimáticos analisados, em que os monomórficos incluíram as enzimas peroxidase (PO-EC. 1.11.1.7) e glutamato oxaloacetato transaminase (GOT-EC.2.6.1.1), e os polimórficos incluíram as enzimas esterase (EST-EC.3.1.1.1), álcool desidrogenase (ADH-EC 1.1.1.1) e diaforase (DIA-EC. 1.8.1.4) (Figuras 10 e 11).

O polimorfismo encontrado para o sistema enzimático esterase também foi observado por Driedger et al. (1994), que detectaram diferenças nos padrões de banda para este sistema, quando utilizaram extratos provenientes de amostras de caule de várias cultivares de feijão. Diferentes padrões de bandas para essa enzima foram observados para a cultivar Aporé, sendo que as demais apresentaram-se com o mesmo padrão. Quanto à enzima álcool desidrogenase, padrões de bandas semelhantes foram observados para as cultivares Carioca e Carioca MG, Aporé e IAPAR 57 e Pérola e IAPAR 81 (Figura 11). A enzima diaforase apresentou três padrões de bandas distintos para as cultivares Carioca; Carioca MG, IAPAR 57 e IAPAR 81; Aporé e Pérola (Figura 11).

PO



GOT

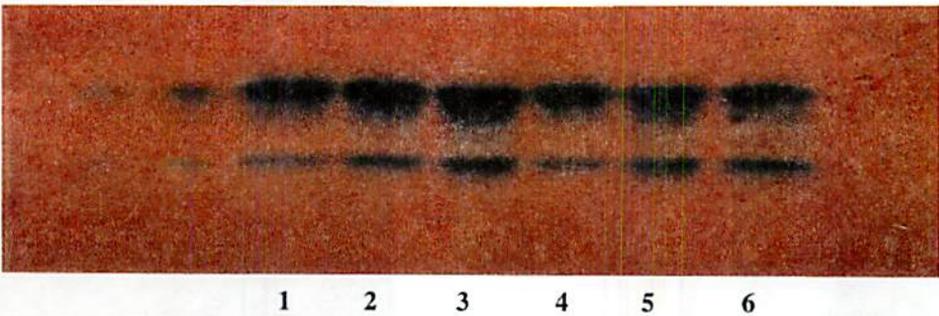


FIGURA 10. Perfis de bandas monomórficas dos sistemas enzimáticos peroxidase (PO) e glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), extraídos de epicótilos de plântulas de feijão das cultivares Carioca (1), Carioca MG (2), Apuré (3), Pérola (4), IAPAR 57 (5) e IAPAR 81 (6), obtidos pelo método eletroforético Nativa-Page.

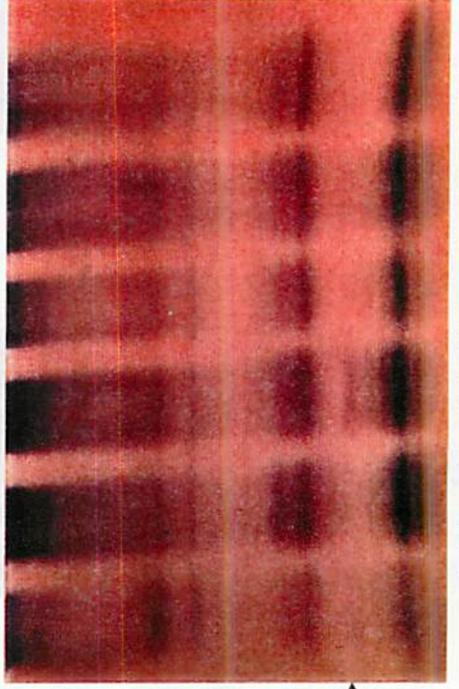
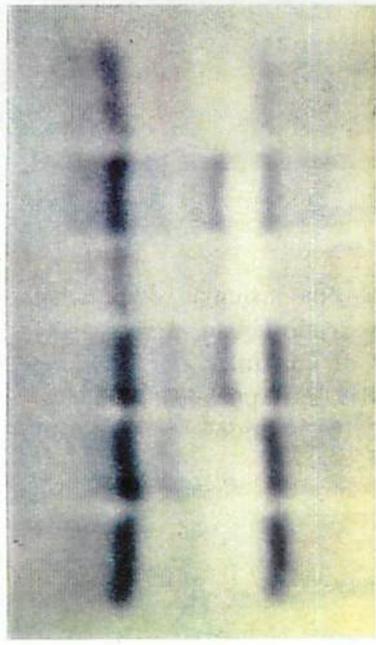
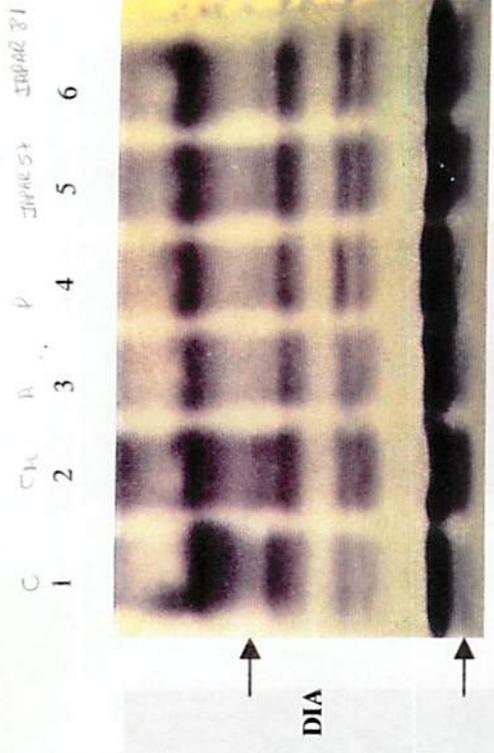


FIGURA 11. Perfis de bandas polimórficos dos sistemas enzimáticos álcool desidrogenase (ADH), diaforase (DIA) e esterase (EST) extraídos de

Observando-se a Tabela 7, os valores de similaridade genética média existente entre as seis cultivares foi de 0,46. Os maiores valores de similaridade foram apresentados entre as cultivares IAPAR 57 e Aporé (0,800) e IAPAR 57 e Carioca MG (0,600). Ainda nesta tabela, podem-se observar os baixos valores referentes aos erros, o que comprova a veracidade dos dados de similaridade genética.

TABELA 7. Similaridades genéticas (posicionadas abaixo da diagonal) e erro padrão (posicionados acima da diagonal) entre as cultivares de feijão Carioca (1), Carioca MG (2), Aporé (3), Pérola (4), IAPAR 57 (5) e IAPAR 81 (6), com base na eletroforese de enzimas do epicótilo. UFLA, Lavras-MG, 1999.

Cultivar	1	2	3	4	5	6
1	-	0,115	0,111	0,000	0,115	0,000
2	0,400	-	0,118	0,000	0,115	0,102
3	0,333	0,500	-	0,000	0,094	0,094
4	0,000 ²	0,000 ²	0,000 ²	-	0,000	0,000
5	0,400	0,600	0,800 ¹	0,000 ²	-	0,102
6	0,000 ²	0,250	0,200	0,000 ²	0,250	-

¹: par de genótipos menos divergente ²: par de genótipos mais divergente

Pelo dendrograma obtido, as cultivares foram separadas em quatro grupos: I) Carioca e Carioca MG; II) Pérola; III) IAPAR 81; IV) Aporé e IAPAR 57 (Figura 12).

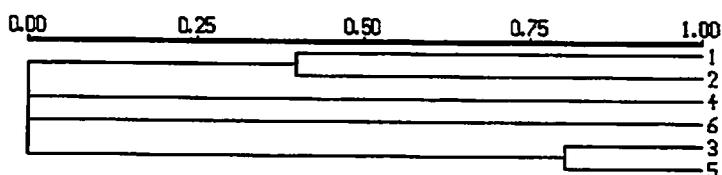


FIGURA 12. Dendrograma de distâncias genéticas entre as cultivares de feijão Carioca (1), Carioca MG (2), Aporé (3), Pérola (4), IAPAR 57 (5) e IAPAR 81 (6), referentes ao perfil de bandas enzimáticas, obtido pelo método UPGMA. UFLA, Lavras-MG, 1999.

O agrupamento das cultivares Carioca e Carioca MG em um mesmo grupo, como já explicado pelos demais marcadores, provavelmente se deveu à elevada proporção de alelos Carioca envolvidos nos cruzamentos que originaram a cultivar Carioca MG (Machado, 1999). A separação da cultivar Pérola em um único grupo, apesar de ela ter-se originado de uma seleção dentro da cultivar Aporé, o que faz com que tenham vários genes em comum, provavelmente foi graças à detecção de um gene específico dessa cultivar.

O agrupamento da cultivar IAPAR 81 isoladamente provavelmente foi por causa da existência, em seu genótipo, de informações genéticas referentes a outra espécie combinada com *Phaseolus vulgaris*, como já comentado, apesar de esta cultivar possuir características próprias do grupo carioca.

A grande similaridade existente entre as cultivares Aporé e IAPAR57 está relacionada com a existência de um progenitor comum, sendo este a cultivar Porrillo, que possui sementes com tegumento preto.

Apesar de Acquah, Isleib e Ferguson (1994) comentarem sobre o uso restrito de enzimas como marcadores em feijão em razão da especificidade de alelos existentes dentro dos centros de domesticação, foi observado algum polimorfismo, que permitiu separar determinadas cultivares.

Pela eletroforese das enzimas álcool desidrogenase e esterase as cultivares Aporé e Pérola apresentaram-se distintas. Essas cultivares também puderam ser separadas por meio de marcadores morfológicos. Burgess e Bell (1983) e Burgess et al. (1985) citados por Alfenas (1998), relataram que as informações obtidas por meio de marcadores enzimáticos e morfológicos são bastante semelhantes. A cultivar Aporé pode ser separada pela presença do halo amarelo nas sementes secas, o que facilita e torna mais rápido o trabalho de certificação da pureza genética. Isso inviabilizaria a utilização do sistema enzimático esterase para esse caso específico.

O sistema enzimático diaforase foi considerado um bom marcador enzimático para a diferenciação da cultivar Carioca em relação às demais, já que esta é a cultivar mais plantada no país (Figura 11). Os padrões da enzima álcool desidrogenase, semelhantes para as cultivares Carioca e Carioca MG, Aporé e IAPAR 57, Pérola e IAPAR 81, foram considerados pouco eficientes para a separação de cultivares no caso de contaminações genéticas nos lotes de sementes dentro do mesmo grupo.

Apesar das limitações impostas ao uso de enzimas como marcadores, limitações estas advindas do efeito da presença de microrganismos nas sementes e do nível de qualidade fisiológica como relatado por Silva (1997) e Vieira (1996), a utilização de tais marcadores foi promissora para a certificação da pureza genética e identificação de cultivares de feijão.

4.4) Marcadores moleculares de DNA:

Neste estudo foram utilizados 52 iniciadores os quais geraram 224 produtos amplificados, com um número médio de bandas/iniciador correspondente a 2,06.

Do total de produtos amplificados, 123 mostraram polimorfismo e 101 foram monomórficos. O número de bandas polimórficas é considerado suficiente para a avaliação da divergência genética entre cultivares de feijão. De acordo com Nienhuis et al. (1995) são necessárias no mínimo 100 bandas polimórficas para uma boa amostragem do genoma desta espécie. No entanto, Johns et al. (1997) verificaram que 50 bandas polimórficas produziram o mesmo agrupamento obtido com 106 bandas, quando estudaram a divergência genética entre 69 cultivares de feijão do Chile.

A maioria dos iniciadores apresentou uma a duas bandas polimórficas, sendo que os iniciadores OP-B04, OP-B08 e OP-C14 apresentaram cinco bandas e os iniciadores OP-B07 e OP-B11, seis bandas polimórficas (Tabela 1A). O baixo nível de polimorfismo gerado pela maioria dos iniciadores provavelmente foi em razão da homogeneidade entre as cultivares (Tabela 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Machado (1999) que, trabalhando com cultivares de feijão do grupo carioca, obteve de uma a duas bandas polimórficas por iniciador.

Na Figura 13 estão apresentados os padrões de bandas obtidos pelos iniciadores OP-B04, OP-B07, OP-B08, OP-B11 e OP-C14. Observa-se que, com a utilização dos iniciadores OP-B04 e OP-B08, foi possível separar as seis cultivares de feijão em cinco grupos, sendo que as cultivares Aporé e Pérola apresentaram padrões de bandas semelhantes. Uma provável explicação para essa semelhança pode ser o fato de a cultivar Pérola ter-se originado de uma seleção dentro da cultivar Aporé. Pela utilização do iniciador OP-B04 também foi possível separar a cultivar Carioca das demais cultivares.

Em relação ao iniciador OP-B07, apenas as cultivares IAPAR 57 e IAPAR 81 não puderam ser distinguidas, sendo as demais cultivares passíveis de serem diferenciadas por este iniciador.

Quanto ao iniciador OP-B11, somente as cultivares Carioca e Carioca MG não puderam ser separadas, já que as demais apresentaram padrões de bandas únicos. No entanto, o iniciador OP-C14 gerou padrões de bandas diferentes para as cultivares Carioca, Carioca MG e Aporé, Pérola, IAPAR 57 e IAPAR 81.

Vale ressaltar que os iniciadores OP-B04, OP-B08 e OP-C14 foram úteis para separar a cultivar Carioca das demais. Sabe-se que considerando a seqüência de bases desses iniciadores pode-se construir um "primer" específico para ser utilizado na certificação da pureza genética de cultivares de feijão nos programas de controle de qualidade das empresas produtoras, uma vez que essa cultivar é a mais plantada no país.

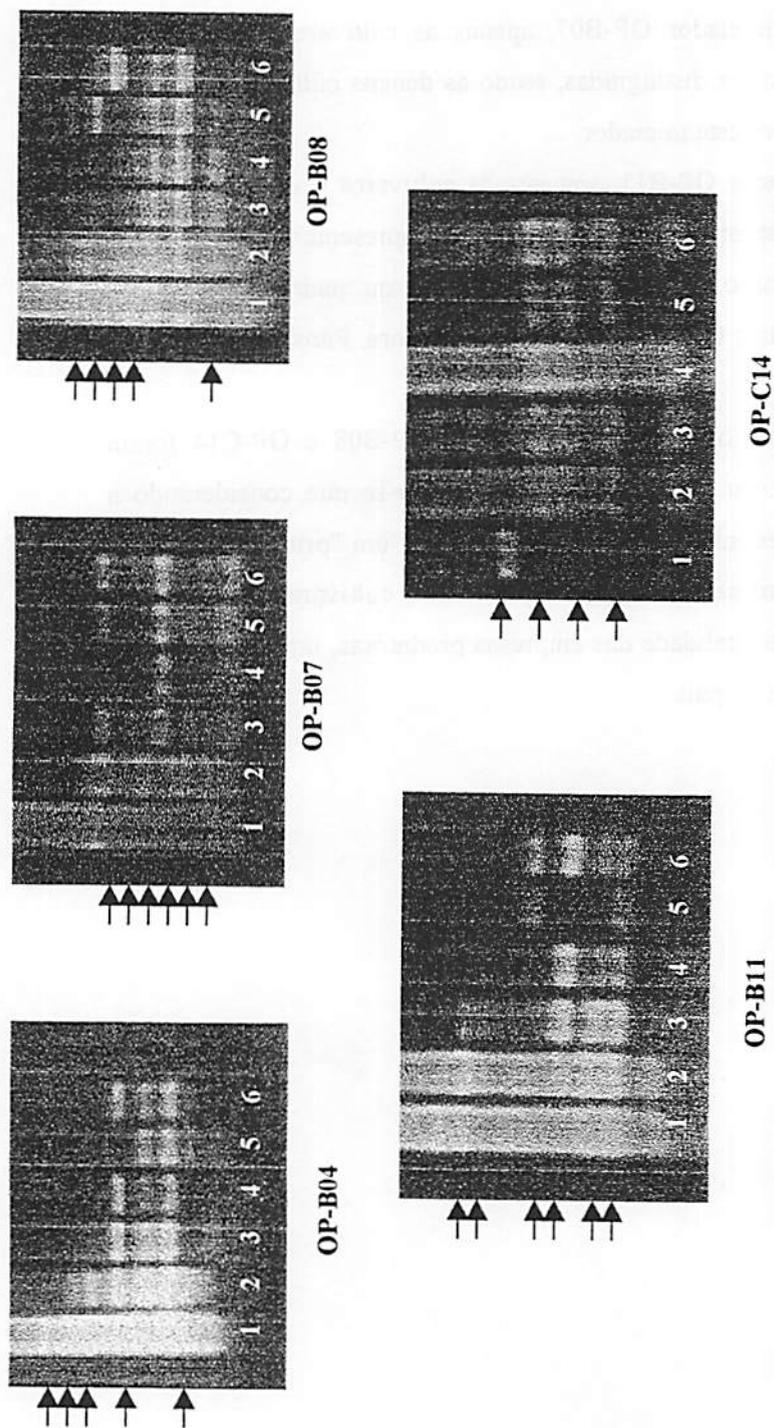


FIGURA 13. Produtos de amplificação de DNA obtidos com os iniciadores OP-B04, OP-B07, OP-B08, OP-B11 e OP-C14. As colunas de 1 a 6 correspondem aos produtos de amplificação das cultivares Carioca, Carioca MG, Aporé, Pérola, IAPAR 57 e IAPAR 81. As setas indicam as bandas consideradas robustas.

O valor médio de similaridade genética entre as seis cultivares foi de 0,71, o maior valor foi observado para as cultivares IAPAR 57 e Pérola (0,800) e o menor para as cultivares Carioca e Carioca MG (0,309), como pode ser observado na Tabela 8, na qual se podem observar os baixos valores do erro associado às similaridades genéticas, o que comprova a veracidade dos dados.

TABELA 8. Similaridades genéticas (posicionadas abaixo da diagonal) e erro padrão (posicionada acima da diagonal) entre as cultivares de feijão Carioca (1), Carioca MG (2), Aporé (3), Pérola (4), IAPAR 57 (5) e IAPAR 81 (6), referentes aos produtos de amplificação de DNA . UFLA, Lavras-MG, 1999.

Cultivar	1	2	3	4	5	6
1	-	0,031	0,033	0,031	0,032	0,032
2	0,309 ²	-	0,029	0,033	0,033	0,033
3	0,397	0,735	-	0,029	0,029	0,029
4	0,312	0,600	0,757	-	0,027	0,029
5	0,362	0,584	0,757	0,800 ¹	-	0,028
6	0,370	0,606	0,747	0,743	0,777	-

¹: par de genótipos menos divergente ²: par de genótipos mais divergente

Conforme pode ser observado pelo dendrograma (Figura 14) as seis cultivares foram separadas em três grupos: I) Carioca e Carioca MG; II) Pérola e IAPAR 57; III) Aporé e IAPAR 81.

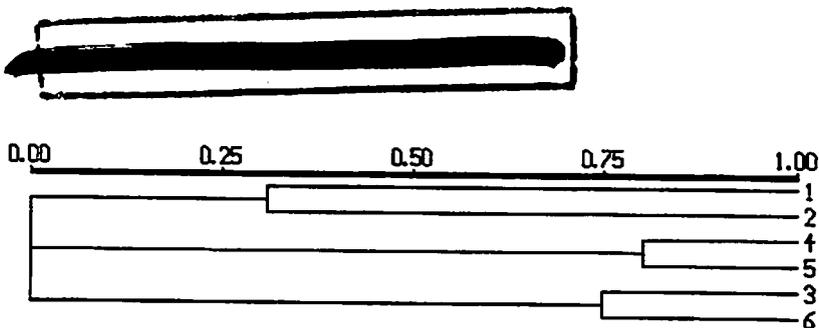


FIGURA 14. Dendrograma de distâncias genéticas entre as cultivares de feijão Carioca (1), Carioca MG (2), Aporé (3), Pérola (4), IAPAR 57 (5) e IAPAR 81 (6), referentes aos produtos de amplificação de DNA, obtido pelo método UPGMA. UFLA, Lavras-MG, 1999.

O agrupamento das cultivares Carioca e Carioca MG em um mesmo grupo é por causa da existência de aproximadamente 50% de alelos da cultivar carioca envolvidos nos cruzamentos para a obtenção da cultivar Carioca MG, como citado por Machado (1999), o que comprova a similaridade genética existente entre elas.

A semelhança existente entre as cultivares Pérola e IAPAR 57 provavelmente é devida ao grau de parentesco existente entre elas, pois a cultivar Pérola é uma linha pura obtida com base na seleção dentro da cultivar Aporé, que possui como progenitores as cultivares Cornell 49-242 e Porrillo as quais possuem sementes com tegumento preto. Esta última foi utilizada também como um dos progenitores dos cruzamentos para a obtenção da cultivar IAPAR 57. Provavelmente as cultivares Pérola e IAPAR 57 possuem características codificadas pelos genes relacionados a cor do tegumento como citado por Basset (1989) e Leakey (1988), o que as torna bastante semelhantes.

Em relação às cultivares Aporé e IAPAR 81, a similaridade genética existente entre elas provavelmente é consequência da existência, nos cruzamentos que as originaram, de progenitores como as cultivares Porrillo, Cornell 79-242 e Jamapa que possuem sementes com tegumento preto. Sendo assim, a cor do tegumento dos progenitores e outras características associadas a ele podem ser responsáveis pela similaridade genética existente entre estas cultivares.

Pelo dendrograma pode-se verificar também que não há nenhuma similaridade genética entre os três grupos, estando estes bem definidos.

Apesar de, neste estudo, a diferenciação total das seis cultivares não ter sido possível pelo uso da técnica RAPD, esta possibilitou a separação das cultivares em três grandes grupos, o que coloca a técnica RAPD como uma ferramenta útil no estudo da similaridade genética entre indivíduos de uma mesma espécie e estritamente relacionados. Resultados semelhantes foram obtidos por Abdelnoor, Barros e Moreira (1995), que trabalharam com a identificação de cultivares de soja.

4.5) Correlação entre os marcadores morfológicos e moleculares de proteínas, enzimas e DNA:

Pela Tabela 9, apresentam-se os coeficientes de correlação entre os quatro tipos de marcadores utilizados neste estudo.

TABELA 9. Coeficiente de correlação entre os marcadores morfológicos quantitativos e qualitativos, marcadores bioquímicos de proteínas e enzimas e marcadores moleculares de DNA, obtidos pela correlação de Spearman. UFLA, Lavras-MG, 1999.

	M. Quant.	M. Qual.	Proteína	Enzima	DNA
M. Quant.	-	-0,03 ^{NS}	-0,18 ^{NS}	0,05 ^{NS}	0,39 ^{NS}
M. Qual.		-	-0,16 ^{NS}	0,17 ^{NS}	-0,45 ^{NS}
Proteína			-	0,23 ^{NS}	-0,19 ^{NS}
Enzima				-	-0,13 ^{NS}
DNA					-

^{NS}: não significativo pelo teste de t ao nível de 5% de probabilidade.

Pela não-significância das correlações entre os marcadores (Tabela 9), percebe-se que cada tipo de marcador utilizado atribuiu diferentes valores de similaridade genética entre as cultivares estudadas. Tal fato pode ser explicado pela baixa variabilidade genética existente entre as cultivares, uma vez que todas pertencem ao mesmo grupo comercial e possuem progenitores em comum.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- 1- As seis cultivares de feijão estudadas podem ser distinguidas pelo peso de 1000 sementes.
- 2- A cultivar IAPAR 57 apresenta cotilédones com antocianina.
- 3- A cultivar Aporé apresenta sementes com halo de cor amarela.
- 4- A cultivar IAPAR 81 apresenta antocianina no caule e suas vagens no ponto de colheita apresentam ápice afilado e dente apical reto.
- 5- A eletroforese de proteínas é eficiente na separação das cultivares Aporé e Pérola das demais cultivares estudadas.
- 6- O sistema enzimático esterase possibilita a distinção da cultivar Aporé.
- 7- O sistema enzimático álcool desidrogenase possibilita a distinção entre as cultivares Carioca e Carioca MG, Aporé e IAPAR 57, Pérola e IAPAR 81.
- 8- O sistema enzimático diaforase possibilita a distinção da cultivar Carioca.
- 9- Os iniciadores mais polimórficos para as cultivares de feijão estudadas são OP-B04, OP-B07, OP-B08, OP-B11 e OP-C14. Destes, os iniciadores OP-B04, OP-B08 e OP-B11 diferenciaram quatro das seis cultivares de feijão.
- 10- A certificação da pureza genética de cultivares de feijão do tipo carioca deve ser realizada utilizando-se a associação de marcadores morfológicos e moleculares de proteínas, enzimas e moleculares de DNA.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o advento da Lei de Proteção de Cultivares, os investimentos na criação e lançamento de novas cultivares, principalmente de espécies autógamas, vem tornando o mercado competitivo. Sendo assim, as empresas produtoras de sementes têm investido em programas de controle de qualidade procurando monitorar a pureza genética nas diferentes etapas de produção, cuja tendência atual é de que a certificação da pureza genética seja realizada não somente por meio de marcadores morfológicos, mas também por meio de marcadores moleculares de proteínas e enzimas e até mesmo de DNA.

A escolha dos marcadores a serem utilizados depende de vários fatores. Dentre os quais pode-se citar a base genética das cultivares, sendo que a maioria das variedades comerciais possui uma base genética estreita, requerendo para a certificação de sua pureza genética marcadores de maior valor informativo como os moleculares.

A disponibilidade de recursos é também um dos fatores que afeta a escolha do tipo de marcador a ser utilizado, sendo que a associação de marcadores se faz muito útil como forma de amenização de gastos e complementação de resultados. Neste último caso, em se tratando de contaminações varietais em lotes de sementes de materiais muito homogêneos como as seis cultivares de feijão do grupo carioca estudadas aqui, não há um melhor marcador a ser recomendado, e sim a associação destes para a certificação da pureza genética.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABDELNOOR, R.V.; BARROS, D.G.; MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA technique and somparative analyses with pedigree data. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, v. 18, n. 3, p. 265-273, 1995.
- ACQUAAH, G.; ISLEIB, T.G.; FERGUSON, A.E. Gene pool specificity, paucity os enxyme variation and phaseolin polymorphism in the common bean. *HorScience*, Alexandria, v. 29, n. 11, p. 1337-1339, 1994.
- ALFENAS, A. C. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa: UFV, 1991, 242p.
- ALMEIDA, L. D'A. de; LEITÃO FILHO, H.F.; MIVASAKA S. Características do feijão Carioca, um novo cultivar. *Bragantia*, Campinas, 30: XXXIII - XXXVIII, abril 1971.
- ALZATE-MARÍN, A. L.; FALEIRO, F. G.; PAULA JR., T. J.; BAIÁ, G. S.; BARROS, D. G.; MOREIRA, M. A. Utilização de marcadores moleculares RAPD em retrocruzamento visando resistência à antracnose do feijoeiro. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 5, Goiânia, 1996. Anais... Goiânia: EMBRAPA-CNPAP-APA, 1996. p. 248-250
- AMARAL JUNIOR, A.T. do; SILVA, D.J.H.; SEDYAMA, M.^ªN.; CASALI, V.W.D.; CRUZ, C.D. Dissimilaridade genética de descritores botânico-agronômicos e isoenzimáticos em clones de couve-flor. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 12, n. 2, p. 113-117, novembro 1994.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. Cultivar purity testing. Lansing, 1991. 371p.
- BASSET, M.J. Arevised linkage map of common bean. *HortScience*, Alexandria, v. 26, n. 7, p. 834-835, July, 1991.

- BASSET, M.J.** List of genes - *Phaseolus vulgaris* L. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, Fort Collins, v. 32, p. 1-15, March, 1989.
- BASSIRI, A.; ADAMS, M.W.** Evaluation of common bean cultivar relationships by means of isozyme electrophoretic patterns. *Euphytica*, Wageningen, v. 27, p. 707-720, 1978.
- BLISS, F. A.; BLOWN, J. W. S.** Breeding common bean for improved quantity and quality of seed protein. *Plant Breeding Reviews*, v. 1, p. 59-102, 1983.
- BOLLINI, R.; CHRISPEELS, M. J.** Characterization and subcellular localization of vicilin and phytohemagglutinin, the two major reserve protein of *Phaseolus vulgaris* L.. *Planta*, Berlin, v. 142, p. 291-298, 1978.
- BOREM, A.** Melhoramento de espécies cultivadas, Viçosa: UFV, 1999, 817p.
- BRADFORD, M.M.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye banding. *Analytical Biochemistry*, San Diego, v. 72, p. 248-259, 1976.
- BRANDÃO JÚNIOR, D.E.** Eletroforese de proteínas e isoenzimas na avaliação da qualidade de sementes de milho. Lavras: UFLA, 1996. 110p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- BRASIL.** Decreto-lei 9456 de 28 de abril de 1997. Lei de proteção de cultivares. *Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]*, Brasília, n.79, p. 8241-8246, 28 de abr. 1997. Seção1.
- BRASIL.** Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Departamento Nacional de Produção Vegetal. Divisão de Sementes e Mudanças. Regras para análise de sementes. Brasília, 1992. 365 p.
- BROTHERS, M.E. & KELLY, J.D.** Allozyme evaluation of upright common bean genotypes. *Euphytica*, Wageningen, v. 67, p. 65-70, 1993.
- BROWN, H. W. S.; BLISS, F. A.; HALL, T. C.** Linkage relationships between genes controlling seed protein in French bean. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 60, p. 251-259, 1981.
- CHERRY, J.P.** Protein degradation during seed deterioration. *Phytopathology*, Sant Paul, v. 73, n. 2, p. 317-321. February, 1983.

- COOKE, F.J. The standartization of electrophoresis methods for variety identification. Proceeding of ISTA Symposium, Leningrad, 1988, p. 14-27.
- CRUZ, C. D. **Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1990. 188 p. (Tese de Doutorado - Genética e Melhoramento de Plantas).
- CRUZ, C.D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa:UFV, 1997, 442p.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 1994. 390 p.
- DERBYSHIRE, D.; WRIGHT, D. J.; BOULTER, D. Legumin and vicilin storage proteins of legumes seeds. *Phytochemistry*, Oxford, v. 15, p. 3-24, 1976.
- DRIEDGER, D. R.; WATTS, B. M.; HUSSAIN A.; ELIAS, L. G. Isoenzyme and cotyledon protein variation for identification of black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) with similar seed morphology. *Euphytica*, Wageningen, v. 74, p. 27-34, 1994.
- DUARTE, J., M. **Estudo da divergência genética em raças de feijão por meio de marcadores RAPD**. Lavras: UFLA, 1998. 78 p. (Dissertação de mestrado - Genética e Melhoramento de Plantas).
- FERREIRA, D.J. Departamento de Ciências Exatas - UFLA. SISVAR (Sistema de Análise de Variâncias), versão 3.02, software não publicado, 1990.
- FERREIRA, D.J.; ZAMBALDE, A.L. Simplificação das análises de algumas técnicas especiais da experimentação agropecuária no Mapgen e softwares correlatos In.: *Anais do I Congresso da Sociedade Brasileira de Informática Aplicada a Agropecuária e Agroindústria*, Belo Horizonte, MG, Setembro, 1997. 285-291p.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1995. 220 p.
- GEPTS, P. Biotechnology sheds light on bean domestication in Latin America. *Diversity*, Bethesda, v. 7, n. 1-2, p. 49-50, 1991.

- GEPTS, P. Phaseolin as evolutionary markers. In: _____. **Genetic resources of *Phaseolus* beans**. Dordrecht: Kluwer, 1988. p. 215-241.
- GEPTS, P.; BLISS, F.A. F₁ hybrid weakness in the common bean: differential geographic origin suggests two gene pools in cultivated common bean. **Journal Heredity**, Edinburgh, v. 76, p. 447-450, 1985.
- GEPTS, P.; BLISS, F.A. Dissemination pathways from phaseolin electrophoretic variability. II. Europe and Africa. **Economic Botany**, New York, v. 42, p. 86-104, 1988.
- GEPTS, P.; BLISS, F. A. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from Colombia. **Economic Botany**, New York, v. 40, p. 469-478, 1986.
- GEPTS, P.; DEBOUCK, D. Origin, domestication and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: VAN SCHOONHOVEN A., VOYSEST, O. **Common bean: research for crop improvement**. Cali: CIAT, 1991. v. 1. p. 7-53.
- GEPTS, P.; KMIĘCIK, K.; PEREIRA, P.; BLISS, F.A. Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability. I. The Americas. **Economic Botany**. New York, v.42, p. 73-85, 1988.
- GEPTS, P.; OSBORN, T.C.; RASHKA, K.; BLISS, F.A. Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. **Economic Botany**, New York, v. 40, n. 4, p. 451-468, 1986.
- GOWER, J. C. Measures of similarity, dissimilarity and distance. In: KOTZ, S.; JOHNSON, N. L. **Encyclopedia of statistical sciences**. Nova York: J. Wiley, v. 5, p. 397-405, 1985.
- GOWER, J. C.; LEGENDRE, P. Metric and euclidean properties of dissimilarity coefficients. **Journal of classification**, New York, v. 3, p. 5-48, 1986.
- GRAHAM, G. C.; HENRY, F. J.; REDDEN, F. J. Identification of navy bean varieties using random amplification of polymorphic DNA. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 34, p. 1173-6, 1994.

- HALEY, S. C.; MIKLAS, P. N.; AFANADOR, L.; KELLY, J. D. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker variability between and within gene pools of common bean. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v. 199, n. 1, p. 122-125, 1994.
- HARRINGTON, J.F. Seed storage and longevity. In: KOZLOWKI, T.T. (ed.). *seed biology*. New York: Academic Press, 1972. v. 3, p. 145-245.
- HUSSAIN, A.; RAMIREZ, H.; BUSHUK, W.; ROCA, W. Field bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar identification by electrophoregrams of cotyledon storage proteins. *Euphytica*, Wageningen, v. 35, p. 729-732, 1986.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. *Rules for seed testing*. Switzerland, 1996. 44p.
- *JAASKA, V. Isoenzyme diversity and phylogenetic affinities among the *Phaseolus* beans (Fabaceae). *Plant Systematic Evolution*, Vienna, v. 200, p. 233-252, 1996.
- * JAASKA, V.; JAASKA, V. Isoenzyme variation in the genera *Phaseolus* e *Vigna* (Fabaceae) in relation to their systematics: aspartate aminotransferase and superoxide dismutase. *Plant Systematics Evolution*, Vienna, v. 159, p. 145-159, 1988.
- JOHNS, M.A.; SKROCH, P. W.; NIENHUIS, J.; KINRICHSEN, P.; BASCUR G. MUÑOZ-SCHICK, C. Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. *Crop Science*. Madison, v.37,n. 2 p. 605-613, março./abril 1997.
- KOENIG, R.; GEPTS, P. Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centers of genetic diversity. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 78, p. 809-817, 1989.
- KOENIG, R. L.; SINGH, S. P.; GEPTS, P. Novel phaseolin types in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economic Botany*, New York, v. 44, p.50-60, 1990.
- KRZANOWSKI, W. J. *Principles of multivariate analysis. A user's perspective*. Oxford: Oxford Science, 1988. 563 p.

- LEAKEY, C.L.A. Genotypic and phenotypic markers in common bean. In: GEPTS, P. (ed.). *Genetic resources in Phaseolus beans*. Boston: Klumer Academic Publishers, 1988, p. 245-327.
- LIOI, L. Electrophoretic variation and geographical distribution of the seed protein phytohemagglutinin in cultivated *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Genetics. & Breeding*, Rome, v. 45, p. 97-102, 1991.
- LORENZ, M.; WEIHE, A.; BOERNER, T. DNA fragments of organellar origin in random amplified polymorphic DNA (RAPD) in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 88, p. 775-779, 1994.
- LOWRY, O.H.; ROSEMBROUGH, N.J.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MA, Y.; BLISS, F. A. Seed protein of common bean. *Crop Science*, Madison, v.18, p. 431-437, 1978.
- MACHADO, C. de F. *Procedimentos para a escolha de genitores de feijão*. Lavras:UFLA, 1999. 118p. (Dissertação - Mestrado Genética e Melhoramento de Plantas).
- MARCOS FILHO, J.; McDONALD, M.B.; TEKRONY, D.M.; ZHANG, J. RAPD fragment profiles from deteriorating soybean seeds. *Seed Technology*, v. 19, n. 1, p. 33-44, 1997.
- McDONALD, M. B. Genetic purity: from protein electrophoresis to RAPDs. In: *Annual Corn and Sorghum Industry Research Conference*, 50th. Washington D.C. p. 256-271, 1995.
- McDONALD, M. B.; ELLIOT, L. J.; SEENEY, P. M. DNA extration from seeds for RAPD analysis in varietal identification studies. *Seed Science and Technology*, Zurich, v. 22, p. 171-176. 1994.
- MUMM, R. H.; DUDLIY, J. W. A PC SAS computer program to generate a dissimilarity matrix for cluster analysis. *Crop Science*, Madison, v. 35, n. 3, p. 925-927, maio/junho 1995.

- NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SCKROCH, P.; SANTOS, J. B. dos. Genetic relationships among cultivars and lines of lima bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as measured by RAPD markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 120, n. 2, p. 300-306, 1995.
- OSBORN, T. C. Genetic control of bean seed protein. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 7, p. 93-115, 1988.
- *PAYNE, R. C. Seed and cultivar identification. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.15, p. 641-644, 1987.
- PEREIRA, P. A. A.; SOUZA, C. R. B. Tipos de faseolina em raças "crioulas" de feijão no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 8, p.1219-1221, 1992.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. dos; PINTO, C.A.P. **Genética na agropecuária**. São Paulo: Globo, 1990, 358 p.
- ROHLF, F. J. **Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis Sistem**. New York, version 1.70, 1992. 470 p.
- ROMERO-ANDREAS, J.; YANDELL, B.S.; BLISS, F.A. Bean arcelin. I-Inheritance and ets effects on seed composition. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 27, p. 123-128, 1986.
- SHATTERS JUNIOR, R.G.; SCHWEDER, M.E.; WEST, S.H.; ABDELGHANY, A.; SMITH, R.L. Environmentally induced polymorphisms detected by RAPD analysis of soubean seed DNA. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 5, p. 109-116, 1995.
- SKROCH, P.W.; TIVANG, J.; NIENHUIS, J. Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. **Proceedings of IUFRO International Conference**. "Breeding tropical trees" Section 202-208, Cali, Colombia, p. 23-30, 1992.
- SILVA, E.A.A. **Padrões eletroforéticos de isoenzimas e proteínas de sementes e coleptilos de milho em associação com microrganismos**. Lavras: UFLA, 1997. 88p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- SILVA, R. **Bandeamento fluorescente e marcador de RAPD em espécies próximas ao *Pinus* de Tecun Umán**. Lavras: UFLA, 1996. 55 p. (Dissertação de mestrado - Genética e Melhoramento de Plantas).

- SINGH, S. P. Patterns of variation in cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, New York, v. 43, n. 1, p. 39-57, 1989.
- SINGH, S. P.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D. G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, New York, v. 45, p. 379-396, 1991.
- SKROCH, P.; TIVANG, J.; NIENHUIS, J. Analysis of Genetic Relationships using RAPD Marker Data. In: **APPLICATIONS OF RAPD TECHNOLOGY TO PLANT BREEDING**, Minneapolis, 1992. **Proceedings...** Minneapolis: Crop Sciences Society of America, 1992. p. 26-30.
- SOKAL, R. R.; SNEATH, P. H. A. **Principles of numeric taxonomy**. San Francisco: W. H. Freeman, 1963. 359 p.
- SPRECHER, S.L. Isozyme genotypic differences between the large seeded and small seeded gene pools in *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, Fort Collins**, v. 31, p. 36-37, 1988.
- STATSOFT, INC. 1996. **STATISTICA for Windows** [Computer program manual]. URL. <http://www.statsoftinc.com>.
- STAUB, J.; BACHER, J.; POETTER, K. Sources of potential errors in the application of random amplified polymorphic DNAs in cucumber. **HortScience**, Alexandria, v. 31, p. 262-266, 1996.
- STAUB, J. E.; SERQUEN, F. Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. **HortScience**, Alexandria, v. 31, n. 5, p. 729-741, 1996.
- STUBER, C.W.; WENDEL, J.F.; GOODMAN, M.M.; SMITH, J.S.C. **Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzyme from maize (*Zea mays* L.)**. Raleigh: North Carolina State University, 1988. 87 p. (Technical Bulletin, 286).
- SUN, S. N.; MUTSCHLER, M. A.; BLISS, F. A.; HALL, T. C. Protein synthesis and accumulation in bean cotyledons during growth. **Plant Physiology**, Rockville, v. 61, p. 918-923, 1979.

- TALBOT, D. R.; ADANG, M. J.; SLIGHTOM, J. L.; HALL, T. C. Size and organization of a multigene family encoding phaseolin, the major seed storage protein of *Phaseolus vulgaris*. *Molecular & General Genetics*, Berlin, v. 198, p. 42-56, 1984.
- VALLEJOS, C.E.; CHASE, C.D. Linkage between isozyme markers and a locus affecting seed size in *Phaseolus vulgaris* L. *Theoretical Applied Genetics*, Berlin, v. 81, p. 413-419, 1991.
- VASCONCELOS, M. J. V. de. Avaliação da variabilidade genética de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo uso de marcadores moleculares RAPD. Viçosa: UFV, 1995, 54 p. (Dissertação de mestrado - Agroquímica).
- VIEIRA, C.; TRAZILBO, J.P.J.; BORÉM, A. Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais. Viçosa: UFV, 1998, 596 p.
- VIEIRA, M.G.G.C. Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). Lavras: UFLA, 1996. 114p. (Tese-Doutorado em Fitotecnia).
- VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. Testes de vigor em sementes. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164p.
- VILARINHOS, A. D.; VARROS, D. G. de; PAIVA, D.; SEDIYAMA, C. S.; MOREIRA, M. A. Use of the random amplified polymorphic DNA technique to characterize soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) genotypes. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, v. 17, n. 3, p. 287-290, 1994.
- WEEDEN, N.F. Genetic confirmation that the variation in the zymograms of 3 enzyme systems is produced by allelic polymorphism. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, Fort Collins, n. 29, p. 117-118, 1996.

WEEDEN, N.F. Linkage between the gene coding for the small unit of ribulose biphosphate carboxylase and the gene coding for malic enzyme in *Phaseolus vulgaris*. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, Fort Collins, v. 27, p. 123-124, 1984.

WEEDEN, N.F.; LIANG, C.Y. Detection of a linkage between flower color and Est-2 in common bean. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, Fort Collins, n. 27, p. 87-88, 1985.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

ZHANG, J.; McDONALD, M.B.; SWEENEY, P.M. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) from seeds of differing soybean and maize genotypes. *Seed Science and Technology*, Zurich, n. 24, p. 513-522, 1996.

ANEXOS

ANEXO A

Página

TABELA 1A. Iniciadores utilizados e respectivas seqüências de bases, número de bandas polimórficas e monomórficas para as seis cultivares de feijão estudadas. UFLA, Lavras-MG, 1999 82

TABELA 2A. Valores de Prob>t obtidos no cálculo da correlação de Spearman, referentes a combinação dois a dois dos marcadores morfológicos quantitativos (1) e qualitativos (2), moleculares de proteínas (3), enzimas (4) e DNA (5). UFLA, Lavras-MG, 1999 84

TABELA 1A. Iniciadores utilizados e respectivas seqüências de bases, número de bandas polimórficas e monomórficas para as seis cultivares de feijão estudadas. UFLA, Lavras - MG, 1999.

Iniciador	Seqüência (5'-3')	Nº Bandas	
		Polimórficas	Monomórficas
OP-A01	CAGGCCCTTC	4	2
OP-A04	AATCGGGCTG	0	2
OP-A05	AGGGGTCTTG	1	2
OP-A06	GGTCCCTGAC	1	4
OP-A07	GAAACGGGTG	4	1
OP-A16	AGCCAGCGAA	0	2
OP-A19	CAAACGTCCG	1	1
OP-B02	TGATCCCTGG	4	0
OP-B03	CATCCCCCTG	4	1
OP-B04	GGACTGGAGT	5	2
OP-B07	GGTGACGCAG	6	1
OP-B08	GTCCACACGG	5	1
OP-B11	GTAGACCCGT	6	1
OP-B13	TCCCCCGCT	3	0
OP-B14	TCCGCTCTGG	4	0
OP-B16	TTTGCCCGGA	3	1
OP-C09	CTCACCGTCC	1	3
OP-C11	AAAGCTGCGG	2	3
OP-C12	TGTCATCCCC	3	1
OP-C14	TGCGTGCTTG	5	0
OP-C15	GACGGATCAG	4	2
OP-C19	GTTGCCAGCC	3	0
OP-C20	ACTTCGCCAC	4	3
OP-D01	ACCGCGAAGG	0	4
OP-D02	GGACCCAACC	4	2
OP-D03	GTCGCCGTCA	4	1

... continua...

TABELA 1A , Cont.

OP-D05	TGAGCGGACA	1	3
OP-D07	TTGGCACGGG	0	2
OP-D09	CTCTGGAGAC	2	2
OP-D12	CACCGTATCC	1	2
OP-D14	CTTCCCCAAG	0	2
OP-D16	AGGGCGTAAG	1	4
OP-D19	GTGGGGACTT	1	4
OP-E01	CCCAAGGTCC	3	3
OP-E02	GGTGCGGGAA	1	3
OP-E05	TCAGGGAGGT	1	4
OP-E06	AAGACCCCTC	1	6
OP-E07	AGATGCAGCC	3	1
OP-E08	TCACCACGGT	4	2
OP-E09	CTTCACCCGA	2	1
OP-E10	CACCAGGTGA	2	4
OP-E11	GAGTCTCAGG	3	3
OP-E12	TTATCGCCCC	3	0
OP-E17	CTACTGCCGT	1	1
OP-E19	ACGGCGTATG	1	3
OP-F01	ACGGATCCTG	4	0
OP-F02	GAGGATCCCT	2	1
OP-F05	CCGAATTCCC	2	1
OP-F06	GGGAATTCGG	1	2
OP-F14	TGCTGCAGGT	2	0
OP-F15	CCAGTACTCC	0	4
OP-F16	GGAGTACTGG	0	3
Total		123	101

TABELA 2A. Valores de Prob>t obtidos no cálculo da correlação de Spearman, referentes a combinação dois a dois dos marcadores morfológicos quantitativos (1) e qualitativos (2) e moleculares de proteínas (3), enzimas (4) e DNA (5).
UFLA, Lavras - MG, 1999.

Marcador 1	Marcador 2	Prob>: t
1	2	0,90676953
1	3	0,52390743
1	4	0,86499167
1	5	0,14507953
2	3	0,56186657
2	4	0,54165826
2	5	0,09009584
3	4	0,40517473
3	5	0,50261695
4	5	0,64800518