



FILIPPE COUTO ALVES

**EFICIÊNCIA DA SELEÇÃO ASSISTIDA POR
MARCADORES MOLECULARES PARA O
ESCURECIMENTO TARDIO DE GRÃOS EM
FEIJÃO-COMUM**

LAVRAS – MG

2014

FILIFE COUTO ALVES

**EFICIÊNCIA DA SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES -
MOLECULARES PARA O ESCURECIMENTO TARDIO DE GRÃOS
EM FEIJÃO-COMUM**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das Exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre

Orientador

Dr. João Bosco dos Santos

LAVRAS – MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Alves, Filipe Couto.

Eficiência da seleção assistida por marcadores moleculares para
o escurecimento tardio de grãos em feijão-comum / Filipe Couto
Alves. – Lavras : UFLA, 2014.

64 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.
Orientador: João Bosco dos Santos.
Bibliografia.

1. Phaseolus vulgaris. 2. Melhoramento de plantas. 3. Seleção
fenotípica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.65223

FILIFE COUTO ALVES

**EFICIÊNCIA DA SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES
MOLECULARES PARA O ESCURECIMENTO TARDIO DE GRÃOS
EM FEIJÃO-COMUM**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das Exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre

APROVADA em 11 de Julho de 2014.

Dr^a. Ângela de Fátima Barbosa Abreu

EMBRAPA/ Arroz e Feijão

Dr. Adriano Teodoro Bruzzi

UFLA/DAG

Dr. João Bosco dos Santos

Orientador

LAVRAS – MG

2014

A minha mãe, Ana Rita, meus irmãos, Lucas e Míriam, a meu sobrinho João Victor e a todos aqueles que de algum modo contribuíram para esta caminhada

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por se fazer presente na minha vida iluminando o meu caminho.

A Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de realização do mestrado.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A minha mãe, Ana Rita, pelo apoio incondicional e por acreditar no meu potencial. Sem você eu não teria conseguido.

Aos meus irmãos, Lucas e Míriam, pela amizade, pelo companheirismo e apoio.

Ao João Victor, meu sobrinho, pelo carinho e alegria contagiante.

Aos meus avós, Odilon e Concebida, pelo apoio nos momentos em que necessitei e pelas orações a mim direcionadas.

Aos demais familiares, por entenderem a minha ausência em vários momentos.

Ao professor João Bosco, pelos ensinamentos, pela paciência, confiança e valiosa orientação durante todo este tempo.

Aos membros da banca avaliadora, Dr^a Ângela e Dr Adriano, pelas valiosas contribuições.

Aos amigos de Laboratório de Genética Molecular, Danuza, Lucas, Chadreque, Monik e aos demais estudantes, pelos momentos prazerosos de trabalho.

À Juliana pela amizade, companheirismo e pela prazerosa convivência durante este tempo.

Ao Lamartine, pelos ensinamentos, amizade e confiança.

A todos aqueles a qual eu não citei, mas que fizeram parte desta etapa da minha vida.

A todos vocês, o meu muito obrigado!

RESUMO

O tempo de escurecimento de grãos de feijão é um fator muito importante para a aceitabilidade de novas cultivares pelo mercado consumidor. Isto porque grãos com escurecimento precoce apresentam menor valor de mercado, uma vez que é feita a associação de grãos mais escuros com grãos envelhecidos. Portanto o desenvolvimento de genótipos com escurecimento tardio é de grande importância para os produtores de feijão. A avaliação fenotípica para este caráter além de laboriosa é muito demorada, já que são necessários 90 dias de armazenamento do grão para se ter dados mais confiáveis para se fazer a seleção, o que dificulta a utilização da seleção fenotípica. Neste caso a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) desponta como uma ferramenta promissora para se proceder seleção de genótipos em um curto espaço de tempo e em gerações mais precoces, como a F_2 . O objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência da SAM em relação à seleção fenotípica para o escurecimento de grãos. Para isto foi avaliado o escurecimento de sementes $F_{2,4}$ de 190 progênies de feijão comum, originadas do cruzamento entre a cultivar BRSMG-Madrepérola (escurecimento tardio) e a linhagem RP-2 (escurecimento precoce). Para se fazer a avaliação fenotípica do caráter foi utilizada uma escala de notas variando de 1 a 5, onde a nota 1 refere-se a grãos claros e 5 a grãos escuros. A avaliação foi feita por três avaliadores em três épocas de avaliação, 30,60 e 90 dias após a colheita. Para a aplicação da SAM utilizou-se os DNAs extraídos de cada planta F_2 responsável por originar uma progênie. A SAM foi efetuada utilizando-se 17 marcadores moleculares ligados à QTLs relacionados ao controle genético do escurecimento de grãos e tempo de cocção. Só foram utilizados os que apresentaram polimorfismo nos genitores. Destes apenas três apresentaram polimorfismo, um ligado ao QTL de escurecimento de grãos e dois ligados a QTLs para tempo de cocção. A capacidade apresentada por cada marcador de explicar a variação fenotípica foi baixa (inferior a 8%). O marcador PVM02TC116 ligado a um QTL de grande efeito para o escurecimento de grãos explicou apenas 2% da variação fenotípica, provavelmente porque este QTL não estava segregando na população usada. Foi estimado o ganho com a seleção fenotípica e seleção assistida por marcadores moleculares das 20 melhores progênies. Observou-se que a seleção fenotípica propiciou maiores ganhos quando comparada com a SAM. Estimou-se o índice de coincidência entre as progênies selecionadas pela SAM e pela seleção fenotípica, e notou-se que a coincidência entre os genótipos selecionados pelas duas técnicas foi baixa.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*, Melhoramento de Plantas, Qualidade de Grão, Seleção Fenotípica

ABSTRACT

The seed coat darkening in common bean grains is a very important trait to the acceptability of new genotypes by the consumer market. Grains that have rapid seed coat darkening (RD) have a small value in the market, because of an association made by the consumer that darker grains are old grains. Therefore the development of new genotypes of common bean with slow seed coat darkening is very important to the bean producers. The phenotypic evaluation of this trait is very slow and laborious, because it is necessary a 90 days storage after harvesting to have a reliable data for the phenotypic selection. In this case the marker assisted selection (MAS) emerges like an important tool to make the selection of genotypes in a short period of time and in earlier generations. The main aim of this research was to check the MAS efficiency in the selection of genotypes that have slow seed coat darkening (SD) against the phenotypic selection. It was evaluated the seed coat darkening in $F_{2.4}$ generation of 190 common bean progenies, derived by the hybridization of the BRSMG-Madrepérola line (SD) and the RP-2 line (RD). The phenotypic evaluation was made by three researches in three ages (30, 60, 90 post-harvest days), this evaluation was taken using a grading scale which varied by 1 (very light grains) to 5 (very dark grains). To the application of MAS it was used the DNA extracted of each F_2 plant that originated a progeny. The MAS was performed using 17 molecular markers linked to QTLs related with the genetic control of seed coat darkening and cooking time. It was used only markers that showed polymorphism in the parental lines. Just three markers were polymorphic, one linked to a seed coat darkening QTL and two associated with the cooking time. The capacity to explain the phenotypic variation of each marker was small (less than 8%). The PVM02TC116 primer related with a large effect QTL to the darkening grain explained only 2% of phenotypic variation, probably because of the non-segregation of this QTL in the genotyped population. It was estimated the selection gain with the phenotypic selection and the MAS of the 20 best progenies. It was observed the superiority of the phenotypic selection in comparison with MAS. It was estimated a coincidence index between the selected progenies by the two selection methods, and a small coincidence among the selected genotypes was noted.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, Plant breeding, Grain Quality, Phenotypic Selection

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	Feijão.....	13
2.2	Cultura do feijão no Brasil.....	15
2.3	Escurecimento do grão do feijão.....	16
2.4	Marcadores moleculares no melhoramento de plantas	21
2.4.1	Marcadores microssatélites	22
2.4.2	Seleção assistida por marcadores moleculares para uma característica de interesse.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1	Local de condução do experimento	27
3.2	Material vegetal.....	27
3.3	Avaliação do escurecimento de grão	28
3.4	Extração e quantificação do DNA	29
3.5	Amplificação dos marcadores moleculares e análise em gel	30
3.6	Análise dos dados	32
3.7	Análise de associação por marca simples.....	34
3.8	Estimativa de precisão experimental.....	35
3.9	Estimativa das herdabilidades	36
3.10	Estimativa do ganho com a seleção	38
3.11	Eficiência da SAM.....	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Análise fenotípica para o escurecimento de grãos	41
4.2	Análise de associação por marca simples.....	48
4.3	Comparação entre a seleção fenotípica, assistida por marcadores moleculares e índice de coincidência	53
5	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão comum (BARBOSA; GONZAGA, 2012), o que faz com que tal cultura seja uma das mais importantes economicamente para o país. Além da importância econômica o cultivo do feijoeiro apresenta grande importância social, uma vez que o seu cultivo é feito em grande parte por pequenos produtores. Além disso, nos últimos anos, tem-se observado um crescente interesse de grandes produtores por esta cultura e isso se deve principalmente à grande produtividade apresentada em cultivos onde se empregam altos níveis tecnológicos. Especialmente esses agricultores tem interesse comercial para o produto e por isso tem sido valorizada nas cultivares características relacionadas ao grão.

Grãos com escurecimento precoce apresentam menor valor de mercado, assim torna-se necessário desenvolver genótipos que apresentem grãos com escurecimento tardio. O escurecimento do grão de feijão está associado à presença de compostos fenólicos na semente, em especial os taninos, que devido à oxidação destes por peroxidases e polifenoloxidasas geram grãos mais escuros. Estudos tem demonstrado que embora o escurecimento do grão esteja relacionado a fatores genéticos, como proposto por Siqueira (2013), fatores ambientais tais como o tipo de armazenagem, a umidade relativa e as temperaturas a que o grão é submetido aceleram o processo de escurecimento do grão (HUGHES; SANDSTED, 1975; PARK; MAGA, 1999; BRACKMANN et al., 2002; JUNK-KNIEVEL; VANDENBERG; BETT, 2007).

Embora haja influência ambiental acelerando o escurecimento do grão, há também efeito genético condicionando grãos que permanecem claros por mais tempo após colhidos. Como esse fenótipo é o preferido pode-se realizar a seleção visando obter cultivares com boa aceitação pelo mercado (SILVA et al. 2008).

O uso de marcadores moleculares para a seleção de um determinado caráter de interesse é denominada seleção assistida por marcadores moleculares (SAM). Para que seja possível o uso da SAM no processo de melhoramento genético de uma dada espécie é necessário que primeiramente o alelo/QTL responsável pelo controle do fenótipo de interesse tenha sido identificado ou mapeado (CAIXETA; BORÉM, 2009). Outros aspectos também devem ser levados em conta, como a natureza genética da característica (quantitativa ou qualitativa), o modo de ação gênica, o efeito do gene na expressão do fenótipo, a complexidade da avaliação fenotípica e a eficiência do marcador para discriminar a característica (MORRIS et al. 2003). A SAM tem sido recomendada em casos em que a determinação do fenótipo é complexa, ou possui custos elevados, e em situações onde é necessária a destruição das plantas.

Outro modo de seleção ainda muito utilizada é a seleção fenotípica, que se baseia em métodos de melhoramento clássico para se proceder a seleção. A seleção fenotípica tem tido sua eficiência comprovada através dos contínuos ganhos genéticos obtidos em características de importância agrônômica e econômica como por exemplo, a produtividade (PEREIRA et al. 2008).

A seleção fenotípica para o escurecimento tardio de grãos além de demorada, apenas é possível a partir da geração F_3 devido ao efeito materno na expressão do caráter. Logo o uso da seleção assistida por marcadores moleculares permitiria diminuir o tempo necessário e número de gerações para se efetuar a seleção dos genótipos mais promissores, ou seja, que apresentassem o escurecimento de grãos tardio.

Devido à alta herdabilidade apresentada pelos marcadores moleculares, uma outra vantagem apresentada pela seleção assistida seria a possibilidade de seleção em nível de planta já na geração F_2 . Tal vantagem também possibilitaria avaliação de um maior número de plantas, aumentando assim a chance de selecionar genótipos mais promissores. Para

o escurecimento tardio já se conhece marcadores tipo microssatélites que podem ser úteis na seleção (COUTO et al. 2010; FELICETTI et al. 2012).

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi estimar a eficiência da seleção por marcadores moleculares para o escurecimento tardio de grãos em feijão comum em comparação com os ganhos obtidos através da seleção fenotípica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Feijão

O feijão comum é classificado como pertencente à família Fabacea, subfamília Faboidea, gênero *Phaseolus* L. e espécie *Phaseolus vulgaris* L. Este é o representante mais cultivado entre as espécies pertencentes ao gênero *Phaseolus*. O feijão é uma espécie autógama e apresenta baixa taxa de alogamia, abaixo de 3% (BURLE et al., 2010) podendo em determinadas condições ambientais exibir taxas mais elevadas de fecundação cruzada (VIEIRA et al., 2005). A autofecundação ocorre antes da antese das flores, fenômeno este denominado cleistogamia, que está associada à presença da quilha, uma estrutura que une os estames e o estigma em uma estrutura em forma de espiral.

O feijão possui origem americana e apresenta dois centros primários de diversidade: o centro Mesoamericano e o Andino. O primeiro se estende pela América Central, Colômbia e Venezuela, já o segundo se expande pela região andina (Argentina, Bolívia e Peru). Os representantes destes centros podem ser separados tanto morfológicamente quanto a nível molecular e eles permanecem isolados devido a um isolamento reprodutivo parcial, que leva ao não desenvolvimento das plantas pertencentes à geração F_1 e outras gerações derivadas de alguns cruzamentos (GEPTS, 1998).

Existem sete raças de feijão comum cultivado, sendo quatro de origem Mesoamericana e três de origem Andina. As raças representantes do grupo Mesoamericano são: a Durango, Jalisco, Mesoamerica e Guatemala (CHACÓN; PICKERSGILL; DEBOUCK, 2005). Já aquelas que representam o grupo Andino são: Nova Granada, Peru e Chile. A origem destas raças é controversa, atualmente não se sabe se elas resultaram de múltiplas domesticações de forma independente dentro de cada região ou se elas são resultado de um único processo de domesticação em cada região

seguido de diversificação sob cultivo (CHACÓN; PICKERSGILL; DEBOUCK, 2005).

Feijões pertencentes ao grupo Andino apresentam uma série de caracteres que os distinguem daqueles pertencentes ao grupo Mesoamericano, sendo um dos principais o tamanho do grão. Cultivares pertencentes ao grupo Andino apresentam grão de tamanho grande, como a cultivar Jalo, já os representantes do grupo Mesoamericano apresentam grãos pequenos, a exemplo do feijão carioca.

Sob o ponto de vista nutricional, o feijão apresenta substâncias que tornam o seu consumo muito vantajoso, entre estas pode-se citar, a alta quantidade de proteínas e os elevados teores de lisina, que exercem efeitos complementares às proteínas dos cereais, o alto conteúdo de carboidratos complexos e a presença de vitaminas do complexo B. Por outro lado, o feijão possui alguns problemas nas suas propriedades nutricionais como a baixa digestibilidade proteica, a quantidade reduzida de aminoácidos sulfurados e a baixa disponibilidade de minerais (LAJOLO; GENOVESE; MENEZES, 1996).

A deficiência do feijão quanto à baixa disponibilidade de aminoácidos sulfurados, como a metionina, é suprida pelo consumo desta leguminosa em conjunto com alguns cereais, especialmente o arroz, que quando consumido junto com o feijão fornece todos os aminoácidos essenciais necessários. Isto ocorre porque os cereais são pobres em lisina, porém ricos em aminoácidos sulfurados, principalmente a metionina (RODRIGUES et al., 2004). Isto torna a tradicional dieta brasileira, o arroz com feijão, complementar no que se refere aos aminoácidos essenciais (VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006).

2.2 Cultura do feijão no Brasil

A cultura do feijão é de grande importância econômica e social no Brasil, sendo seu cultivo feito em grande parte por pequenos produtores. A produção apresentada por esta cultura vem chamando a atenção de grandes produtores, que devido ao uso de tecnologias mais avançadas, podem alcançar uma produtividade de grãos de 3000 kg ha⁻¹ em determinadas áreas.

No Brasil são cultivados feijões tipo preto, carioca, mulatinho, jalo, roxo, rosinha, entre outros. Dentre estes se destaca o feijão tipo “carioca”, que é consumido em praticamente todo o país e corresponde a aproximadamente 70% do feijão consumido no Brasil (PEREIRA et al., 2012). Grãos tipo carioca apresentam tegumento cor creme e com listras marrons, sendo que os grãos devem ser o mais claro possível, sem halo e sem brilho.

A semeadura do feijão é feita tradicionalmente em duas safras, a “safra das águas” ou primeira safra, que possui o plantio concentrado entre os meses de outubro e novembro, sendo a colheita efetuada até março do ano subsequente, e a “safra da seca” ou segunda safra, que possui a semeadura concentrada entre os meses de janeiro e abril, sendo sua colheita efetuada de abril a julho. Há também uma terceira safra denominada de “safrinha” ou “safra de outono-inverno”, com semeadura a partir de maio e com colheita entre os meses de agosto e outubro (POSSE et al., 2010). Esta última por necessitar de um maior nível tecnológico empregado em seu cultivo tem sido produzida em grande parte por grandes produtores (VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2006).

O Brasil é o maior produtor mundial desta leguminosa do mundo, tendo uma produção que corresponde a 18,2% da produção mundial (BARBOSA; GONZAGA, 2012). Cultivado em todo o território brasileiro, o feijão possui como principais produtores os estados de Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso e Bahia.

Considerando as três safras do ano agrícola de 2013/2014 espera-se um acréscimo de 11% na área plantada com esta cultura no Brasil. Seguindo as estimativas para o aumento na área plantada, estima-se que a produção brasileira neste período seja 19,2% maior que em 2012/2013, apresentando assim uma produção de 3,71 milhões de toneladas, 32,3% maior que na safra anterior (CONAB, 2014).

Segundo dados da CONAB (2014) a produtividade média de feijão do Brasil nas safras do ano agrícola 2013/2014 será de 1088 kg/ha, o que representa um acréscimo de 19,2% em relação ao ano agrícola anterior. A produtividade de grãos é muito variável de região para região, dependendo de fatores ambientais, tais como o clima e a época de plantio, e do nível de tecnologia utilizada na lavoura, ela varia de 490 kg/ha na região Nordeste a 1876 kg/ha na região Centro-Oeste. O consumo *per capita* de feijão pelo brasileiro vem apresentando um pequeno aumento, sendo que de acordo com estimativas do IBGE/2012 este se situou na casa de 16 kg/habitante/ano.

2.3 Escurecimento do grão do feijão

Vários fatores levam a aceitabilidade de determinada cultivar pelo consumidor, entre eles podem se destacar características ligadas ao grão, como o tipo de grão, sendo que a este encontra-se ligado intimamente um outro fator determinante para a aceitabilidade que é o escurecimento do grão.

A preferência dos produtores por grãos que apresentam escurecimento tardio se deve a associação feita pelo consumidor de que grãos com tegumento mais escuro possuem dificuldade de cocção, característica comum a grãos envelhecidos. Assim, o consumidor faz a associação do escurecimento de grão ao seu envelhecimento e, conseqüentemente, ao defeito textural *hard to cook* (HTC) que torna as sementes resistentes ao amaciamento com o cozimento, além de resultar em um produto de baixa palatabilidade (LOPES, 2011). Devido a estas associações grãos com escurecimento precoce têm baixo valor comercial.

O escurecimento do grão de feijão tem sido atribuído à presença de compostos fenólicos. Tais compostos são metabólitos secundários derivados da fenilalanina e da tirosina que são amplamente distribuídos nas plantas. Em trabalho desenvolvido por Beninger et al. (2005) observou-se que há diferenças quantitativas na quantidade de compostos fenólicos entre linhagens de feijão de escurecimento lento e rápido. Acredita-se que grãos mais claros apresentam menor teor de compostos fenólicos. Bressani et al. (1993) quantificaram a concentração de compostos fenólicos em feijões com diferentes cores de grão e observaram que: grãos brancos possuem o teor médio de compostos fenólicos de 2,3 mg/g, já nos grãos marrons este teor chega a 7,8 mg/g, enquanto que em feijões pretos é de 6,6 mg/g. Aqueles que apresentam o maior teor de compostos fenólicos associados às sementes são os grãos vermelhos com 12,6 mg/g.

Em leguminosas como o feijão, os compostos fenólicos mais importantes são os taninos e os níveis destes compostos tem sido associados à cor dos grãos (JUNK-KNIEVEL; VANDENBERG; BETT, 2007; SILVA et al., 2008). Taninos são flavonoides poliméricos que compreendem uma pequena parte do amplo e diverso grupo dos compostos fenólicos produzidos por plantas como metabólitos secundários (DÍAZ; CALDAS; BLAIR, 2010). Os taninos consistem de uma série de fenóis poliméricos que estão envolvidos no baixo aproveitamento dos nutrientes do feijão, reduzindo a absorção, digestibilidade e a disponibilidade de nutrientes (DÍAZ; CALDAS; BLAIR, 2010). Estes possuem propriedades antimicrobianas, o que indica um possível mecanismo de defesa.

Díaz, Caldas e Blair (2010) constataram a ocorrência de diferenças na quantidade média de taninos totais e antocianina em feijão dependendo da cor do grão. Os autores observaram que juntamente com grãos roxos os grãos de cor creme são os que apresentam a maior quantidade de taninos totais, enquanto que o grão que apresenta a menor concentração de taninos totais são os grãos marrons. Também foi observado que assim como para a quantidade de taninos totais, a quantidade de taninos solúveis é maior em

grãos de cor roxa e creme em relação às demais cores da semente. Quanto ao teor de antocianina observou-se que sementes de cor vermelha são aqueles que apresentam a maior quantidade deste composto.

Ao que tudo indica, o escurecimento do grão de feijão está ligado à oxidação dos compostos fenólicos presentes no grão, especialmente os taninos (BENINGER et al., 2005; JUNK-KNIEVEL; VANDENBERG; BETT, 2007). Esta oxidação é feita principalmente por enzimas do grupo das polifenoloxidase (PPO) e peroxidases (POD). Em trabalho realizado por MOURA et al. (1999), foram avaliados o efeito da estocagem, da secagem e do armazenamento de grãos de feijão sobre a ação das peroxidases, polifenoloxidases e concentração de fenólicos totais nas sementes de duas cultivares e uma linhagem de feijão. Foi observado que a cultivar de grão mais escuro apresentou maior concentração de compostos fenólicos associada a maior atividade das polifenoloxidases e peroxidases antes e depois do armazenamento, enquanto a cultivar de tegumento mais claro exibiu resultados mais baixos. Concluíram então que quanto maior a atividade observada das polifenoloxidases e peroxidases maior será a quantidade de compostos fenólicos totais na semente. Rios, Abreu e Correa (2002) em experimento semelhante, também observaram que associada aos maiores teores de compostos fenólicos está a maior atividade de peroxidases, e que embora não se tenha observado diferenças significativas da ação das polifenoloxidases entre os tempos de avaliação observou-se um aumento na atividade desta. O resultado anterior só corrobora com o que foi concluído por Moura et al. (1999) de que o escurecimento causado pelo armazenamento de grãos está relacionado com a oxidação dos compostos fenólicos pelas peroxidases e polifenoloxidases.

A ação destas enzimas sobre os compostos fenólicos também está relacionada a outra característica tecnológica muito importante no feijão que é a dificuldade de cocção dos grãos. A dificuldade de cocção é causada pela formação de lignina nos cotilédones devido à polimerização de compostos fenólicos que provavelmente encontra-se ligada à ação da peroxidase. Tal

enzima provavelmente encontra-se associada ao processo de lignificação da lamela média dos cotilédones. A contribuição dos polifenóis no endurecimento dos grãos de feijão pode estar associada com a formação de complexos proteína-lignina. Estudos tem demonstrado que o teor de lignina em grãos de feijão armazenados é superior ao observado em grãos novos. Tem se observado que os teores variam de 8,4g/100g de matéria seca em feijões recém-colhidos à 13 g/100 g de matéria seca para feijões armazenados (HINKS; STANLEY, 1987). Araújo, Ramalho e Abreu (2012) observaram uma alta correlação genética aos 60 dias de armazenamento entre o tempo de cocção dos grãos de feijão e o escurecimento de grãos.

De acordo com Siqueira (2013) o escurecimento do grão está relacionado à constituição genética da cultivar. Este autor notou que a velocidade de escurecimento de grãos é dependente da cultivar utilizada, demonstrando assim as influências genéticas para a ocorrência de tal fenômeno. Alguns estudos tem demonstrado que fatores ambientais tais como a alta umidade relativa, altas temperaturas e exposição à claridade e a luz ultravioleta aceleram o processo de escurecimento dos grãos (HUGHES; SANDSTED, 1975; PARK; MAGA, 1999; BRACKMANN et al., 2002; JUNK-KNIEVEL; VANDENBERG; BETT, 2007). Brackmann et al. (2002) observaram que o armazenamento dos grãos de feijão em ambientes de atmosfera controlada em temperatura ambiente com fluxo contínuo de N₂ e em ambiente refrigerado a 0°C foram mais eficientes na manutenção da cor do grão.

Segundo Brackmann et al. (2002), após a colheita, a respiração e outros processos metabólicos de grãos continuam causando, na maioria das vezes, perdas significativas de qualidade do grão.

Um fator bastante útil durante o processo de melhoramento genético para o escurecimento tardio do grão é o uso do valor de luminosidade (L), que é feita utilizando-se a colorimetria. Tal valor é útil, pois, apresenta grande efeito genético, e ainda possibilita a identificação de genótipos pela claridade de seus grãos. Sendo assim valores mais altos de luminosidade são

associados a grão mais claros e alguns autores determinaram os valores de L de grãos com maior valor de mercado variando entre 53 e 55 (CARNEIRO; SOARES; COSTA, 2000; RIBEIRO; STORCK; POERSCH, 2008).

Uma outra maneira de se efetuar a seleção de genótipos com escurecimento de grãos tardio e que se mostrou bastante eficiente em discriminar genótipos superiores para tal característica é o uso da escala de notas desenvolvida por Silva et al. (2008). A escala de notas proposta varia de um a cinco, onde a nota um se refere a grãos com tegumento muito claro e a cinco a grãos de tegumento muito escuro. Silva et al. (2008) observaram que utilizando-se a escala de notas a herdabilidade para este caráter é alta e mesmo com 30 dias de armazenamento, ela foi suficiente para que ocorresse sucesso com a seleção.

Estudos recentes têm sugerido que no controle genético do escurecimento de grãos de feijão estão envolvidos dois genes, um gene *J* e o *Sd*, com segregação independente e epistasia recessiva (ELSADR et al., 2011). O gene *j* é responsável por determinar se o grão tenderá a apresentar escurecimento ou não, e o gene *sd* determina a velocidade de escurecimento dos grãos. A presença do alelo dominante *J* resulta na tendência de escurecimento do grão, já a ocorrência do genótipo recessivo *jj* determina o não escurecimento dos grãos. O alelo dominante *Sd* condiciona o escurecimento precoce do grão, enquanto que a ocorrência do homocigoto recessivo *sdsd* leva ao escurecimento tardio do tegumento (JUNK-KNIEVEL; VANDENBERG; BETT, 2008). Assim, qualquer planta que possua o homocigoto recessivo *jj* sempre apresentará grãos onde não ocorrerá o escurecimento do grão, logo o fenótipo relacionado aos alelos presentes no loco *Sd* só ocorrerá na presença do alelo dominante *J*, caracterizando assim uma epistasia recessiva.

A fim de acelerar o processo de seleção para o escurecimento de grãos tardio de feijão Couto et al. (2010), utilizando o feijão carioca, e Felicetti et al. (2012), fazendo o uso de feijão pinto, identificaram marcas de microssatélites ligadas ao alelo que controla a velocidade do escurecimento

de grãos. Segundo Couto et al. (2010), o marcador PVESTBR-98 encontra-se dentro do QTL que influencia no escurecimento de grão tardio, enquanto que o marcador PVM02TC116 e PV176 encontram-se flanqueando a uma distância de 2 e 12,24 cM respectivamente. De acordo com estes mesmos autores os três marcadores em conjunto explicariam aproximadamente 40% da variação fenotípica dos indivíduos para o escurecimento de grão. Já os microssatélites apontados por Felicetti et al. (2012) como próximos ao loco *sd* e encontram-se distantes, no máximo, a 3,1 cM. De acordo com ambos os autores os marcadores são promissores para o uso na SAM.

O processo de seleção para este caráter é difícil e mais demorado pelo fato de que além do fenótipo que condiciona escurecimento tardio de grãos ser condicionado por um alelo recessivo há efeito materno para este caráter, o que possibilita a seleção dos genótipos apenas a partir da geração F₃. Assim o uso destas marcas possibilitaria a seleção precoce das plantas já em F₂.

2.4 Marcadores moleculares no melhoramento de plantas

Com o advento das técnicas de biologia molecular tornou-se possível a manipulação do DNA, e com isso no início dos anos 80 surgiram os primeiros marcadores moleculares. Desde então tem surgido inúmeras técnicas moleculares que associadas a métodos clássicos de melhoramento de plantas auxiliam os melhoristas em suas escolhas e aumentam a eficiência do programa.

Os marcadores moleculares surgiram devido à necessidade de se observar o maior número de polimorfismos possíveis em um indivíduo. Antes do advento dos marcadores moleculares eram utilizados marcadores morfológicos e bioquímicos que embora fossem técnicas de baixo custo apresentam uma baixa cobertura do genoma dos indivíduos. Com o surgimento dos marcadores moleculares de DNA, que apresentam uma ampla cobertura do genoma, eles tornaram-se preferidos.

De acordo com Xu e Crouch (2008) o uso de marcadores moleculares beneficia o melhoramento de plantas nos casos em que se deseja: *i*) ter maior eficiência na identificação, quantificação, e caracterização da variação genética de germoplasmas disponíveis; *ii*) na identificação, clonagem e introgressão de genes e/ou QTLs úteis para o melhoramento de uma dada característica; *iii*) manipulação (diferenciação, seleção, piramidação e integração) da variação genética em populações sujeitas ao melhoramento genético.

Há ampla variedade de marcadores de DNA e entre eles os microssatélites têm sido ainda muito utilizados por serem codominantes e de fácil obtenção no laboratório.

2.4.1 Marcadores microssatélites

Os microssatélites ou sequências simples repetidas (SSR) são regiões do genoma onde são encontradas sequências formadas de um a seis nucleotídeos repetidos em tandem. Sabe-se que as regiões que flanqueiam estas sequências são altamente conservadas nas espécies, o que permite assim desenho de pares de *primers* específicos para amplificar determinado microssatélite.

Esses marcadores têm sido utilizados em vários tipos de estudos genéticos, principalmente devido a sua alta repetibilidade e simplicidade técnica, à pequena quantidade de DNA requerida, ao baixo custo, ao grande poder de resolução e ao alto grau de polimorfismo (BORÉM; CAIXETA, 2009). Outras vantagens apresentadas por este tipo de marcador em relação aos demais é que são marcadores co-dominantes e multialélicos e fornecem um elevado nível de informação genética por loco, além de ocorrerem em alta frequência e possuírem distribuição aleatória nos genomas eucariotos (GUIMARÃES et al., 2009), o que permite uma ampla cobertura do genoma que está sendo estudado.

Justamente devido ao alto nível de informação genética apresentada pelos microssatélites, estes tem sido empregado para fins de se distinguir germoplasmas muito relacionados, e ainda obter polimorfismos em populações multiparentais e naquelas derivadas de híbridos de genótipos relacionados. Essa alta variabilidade observada torna este tipo de marcador altamente recomendado para mapeamentos genéticos.

Devido à sua alta repetibilidade quando comparada com outras metodologias, o uso de marcadores microssatélites facilita a troca de informações entre diferentes grupos de pesquisa, o que possibilita a associação destes grupos em pesquisas relacionadas.

Os marcadores de microssatélites têm sido úteis para a integração de mapas genéticos e físicos, além de, simultaneamente, proporcionar aos melhoristas e geneticistas uma eficiente ferramenta para conectar variações fenotípicas e genotípicas. Entretanto, pelo fato de o feijão ter um genoma pequeno, os microssatélites não têm identificado polimorfismo suficiente para o mapeamento dos marcadores, quando se utilizam os genitores selecionados, tipicamente empregados nos programas de melhoramento (PEREIRA et al., 2007). Entretanto, quando o SSR é identificado próximo do alelo de interesse, ele é um marcador ideal para uso na seleção assistida (SAM).

2.4.2 Seleção assistida por marcadores moleculares para uma característica de interesse

O uso de marcadores moleculares para a seleção indireta de um determinado caráter de interesse é denominado seleção assistida por marcadores moleculares (SAM). Para que seja possível o uso da SAM no processo de melhoramento genético de uma dada espécie é necessário que primeiramente o gene/QTL responsável pelo controle da característica de interesse tenha sido identificado ou mapeado, e que existam marcadores que

permitam observar a presença dos alelos de interesse em um dado indivíduo (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Além dos pressupostos anteriormente citados outros aspectos devem ser levados em conta, como a natureza genética da característica (quantitativa ou qualitativa), o modo de ação gênica, o efeito do gene na expressão do fenótipo, a complexidade da avaliação fenotípica e a eficiência do marcador para discriminar a característica (MORRIS et al., 2003). A SAM tem sido recomendada em casos em que a determinação do fenótipo é complexa, ou possui custos elevados; e em situações onde é necessária a destruição das plantas.

De acordo com Collard e Mackill (2008) dois passos devem ser tomados antes da utilização de determinados QTLs em programas de seleção assistida: a confirmação e validação do QTL. A confirmação do QTL é necessária pois a posição deste e os seus efeitos podem ser imprecisos devido a fatores como, por exemplo, problemas de amostragem. A etapa de validação corresponde basicamente à verificação do efeito de determinado QTL em populações diferentes daquela utilizada para a sua identificação, e assim, conseqüentemente determinar a sua utilidade em programas de seleção assistida.

O uso da seleção assistida por marcadores moleculares pode economizar tempo e dinheiro em programas de melhoramento, particularmente quando a fenotipagem da característica consome muito tempo, é cara e errática. Bernardo (2008) aponta que o ganho por unidade de tempo terá seu maior impacto se o uso de marcadores reduzir o tempo necessário por ciclo de seleção ou aumentar o número de ciclos de seleção por ano. Já Concibido, Diers e Arelli (2004) observaram que o uso da SAM reduziu o custo e o tempo necessário para a avaliação da resistência ao nematoide do cisto em soja em relação à seleção fenotípica.

Marcadores co-dominantes, como os microssatélites, apresentam vantagens na seleção indireta para alelos recessivos, como é o caso do alelo para o escurecimento tardio de grãos, uma vez que a partir dos

microssatélites é possível detectar estes alelos e proceder a seleção apenas daqueles genótipos que os apresentam. Assim a utilização destes tipos de marcadores permitiria a fixação de alelos recessivos já nas primeiras gerações do processo de melhoramento da espécie alvo, possibilitando assim o direcionamento das atenções dos melhoristas para outras características.

A seleção com o auxílio de marcadores moleculares para características simples tem grande utilidade quando esta é de difícil medição ou quando se deseja selecionar diversas características simultaneamente, como é o caso da piramidação de genes. O uso da seleção assistida por marcadores moleculares apresenta algumas vantagens em relação à seleção fenotípica, como: a possibilidade de se efetuar a seleção de plantas individuais e em fase de desenvolvimento precoce, as ditas fases de *seedling* (COLLARD; MACKILL, 2008).

O uso de marcadores moleculares para a seleção será vantajoso quando o loco de interesse e o marcador estiverem fortemente ligados e ainda quando forem usadas as primeiras gerações de segregação para se proceder a seleção, evitando assim a recombinação entre loco e marca (LEE, 1995). Segundo Collard e Mackill (2008) os marcadores utilizados em trabalhos de seleção assistida devem estar intimamente relacionados ao loco de interesse, de acordo com estes autores tais marcadores devem estar ligados a uma distância menor que 5 cM do loco em questão para que se tenha uma maior confiabilidade em seu uso. Conforme estes mesmos autores, a utilização de marcadores flanqueando determinados locos de interesse também contribuirá para aumentar a confiabilidade para se predizer o fenótipo.

Lande e Thompson (1990) modelaram a eficiência da SAM no melhoramento de uma característica. Eles observaram que para características com herdabilidade igual a 1 (situação em que toda a variação fenotípica é totalmente devida à variação genética), o fenótipo do indivíduo prediz perfeitamente o seu valor genético, logo não há vantagem na utilização da SAM se comparada à seleção fenotípica. Porém ficou provado

que para valores mais baixos de herdabilidade, a eficiência da seleção assistida por marcadores moleculares pode suplantar a seleção fenotípica.

A SAM apresenta-se como uma alternativa eficiente para permitir a seleção precoce de características de baixa herdabilidade. Assim, a seleção em gerações iniciais do processo de melhoramento permitiria que um maior número de progênies fosse avaliado, uma vez que tal seleção diminuiria o número de plantas analisadas por população.

A SAM é mais eficiente em gerações iniciais de seleção entre progênies de cruzamentos provenientes de linhas endogâmicas (RIBEIRO et al., 2009; STROMBERG; DUDLEY; RUFENER, 1994)), pois nestas gerações a herdabilidade é baixa por causa do limitado número de repetições, e o desequilíbrio de ligação é alto (FALCONER; MACKAY, 1996).

Liu, Zhu e Lu (2004) demonstraram através de simulações de diferentes estratégias de seleção que a SAM não só permitiu altos ganhos com a seleção, como também aumentou muito a frequência de genótipos superiores, quando comparada com a seleção fenotípica. Entretanto, a SAM foi eficiente em todas as gerações embora sua vantagem com relação à seleção fenotípica tenha diminuído com o avanço das gerações de autofecundação. Assim, recomenda-se associar a SAM nas gerações iniciais do programa de melhoramento (F_2 a F_4) à seleção fenotípica nas gerações mais avançadas (acima de F_5), a fim de se obter maior eficiência no programa.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de condução do experimento

O experimento foi conduzido na área experimental e no laboratório de genética molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, Minas Gerais.

3.2 Material vegetal

O material utilizado no experimento é oriundo do cruzamento entre a cultivar BRSMG Madrepérola e a linhagem RP-2. A cultivar BRSMG Madrepérola foi desenvolvida pela EMBRAPA Arroz e Feijão em parceria com a EPAMIG, UFLA e UFV, e apresenta como principais características o tipo de grão carioca e o escurecimento tardio dos grãos (CARNEIRO et al., 2012). Além disso, apresenta resistência ao vírus do mosaico comum do feijão e a várias raças de antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*). A cultivar BRSMG-Madrepérola, foi obtida a partir do cruzamento entre as linhagens AN 512666-0 e AN 730031. A linhagem RP-2 possui grão tipo carioca e escurecimento precoce dos grãos (ARAÚJO; RAMALHO; ABREU, 2012), sendo oriunda do programa de seleção recorrente para porte do feijoeiro da UFLA..

As sementes F_1 foram obtidas a partir de cruzamentos feitos no campo experimental do Departamento de Biologia da UFLA e a partir destas foram obtidas as sementes F_2 . Para se determinar quais plantas F_1 eram provenientes do cruzamento, já que fenotipicamente elas não poderiam ser diferenciadas, pois ambos os genitores apresentam grão do tipo carioca, utilizou-se marcadores moleculares do tipo SSR polimórficos para os genitores para se fazer a distinção das plantas F_1 e das plantas oriundas de autofecundação.

Uma vez definidas quais eram as plantas F_1 obteve-se as sementes F_2 , as quais foram plantadas em campo. Posteriormente, foram tomadas 190 plantas F_2 que tiveram seu DNA extraído. Das plantas F_2 obtiveram-se as progênies $F_{2,3}$ e posteriormente as sementes $F_{2,4}$ que foram utilizadas no presente trabalho.

Em todas as gerações a semeadura foi realizada em campo, com espaçamento entre linhas de 50 cm, sendo a densidade de semeadura por metro linear de 15 sementes. Na semeadura, a adubação utilizada foi de 300 kg/ha da fórmula 8-28-16 (N-P₂O₅-K₂O, respectivamente) e, aproximadamente, vinte dias após a emergência das plantas foi efetuada a adubação de cobertura com aplicação de 150 kg/ha de sulfato de amônio.

3.3 Avaliação do escurecimento de grão

Após a colheita das sementes $F_{2,4}$, estas foram mantidas no sol por um período de seis horas afim de homogeneizar a umidade dos grãos (SILVA et al., 2008). Os grãos secos mais uniformes de cada progênie foram armazenados em sacos plásticos com 15 centímetros de comprimento por 9 cm de largura e armazenadas em temperatura ambiente, protegidas do sol.

A avaliação do escurecimento de grãos foi efetuada conforme proposto por Silva (2008) onde os tratamentos foram avaliados aos 30, 60 e 90 dias após a colheita. A avaliação do escurecimento de grãos foi feita por três avaliadores isoladamente em todas as épocas, vale ressaltar que a nota atribuída por cada avaliador foi considerada como uma repetição. Para isto utilizou-se uma escala diagramática de notas proposta por Silva et al. (2008) que varia de 1 a 5 (Figura 1) onde: 1- Cor do fundo do grão muito clara; 2- Cor do fundo do grão mediantemente clara; 3- Cor do fundo do grão clara; 4- Cor do fundo do grão mediantemente escura; 5- Cor do fundo do grão muito escura;



Figura 1 Escala de notas utilizada para a avaliação do escurecimento de grãos (SLVA et al., 2008)

3.4 Extração e quantificação do DNA

Foi extraído o DNA de 190 plantas F_2 e de seus genitores de acordo com metodologia modificada de Pereira et al. (2007). Todo o processo de extração dos DNAs ocorreu no Laboratório de Genética Molecular da UFLA no Departamento de Biologia.

Para se proceder a extração do DNA coletou-se 1g a 2g de folhas jovens de cada planta F_2 . As folhas foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido, adicionou-se 10 ml de tampão de extração e 20 μ l de β -mercaptoetanol ao macerado. O tampão utilizado possui em sua constituição 2% de CTAB, 100 mM de TRIS (pH 8,0), 1,4M de NaCl e 1% de polivinilpirrolidona (PVP). Após a mistura dos reagentes ao macerado, o material foi transferido para tubos Falcon os quais foram mantidos em banho maria por 30 minutos a 65°C. Depois deste período de tempo adicionou-se aos tubos 10 ml de clorofórmio:álcool isoamil (24:1).

Posteriormente os tubos foram centrifugados a uma rotação de 4000 rpm por 10 minutos. Coletou-se o sobrenadante de cada tubo, que foi transferido para tubos de ensaio com 30 ml de álcool 95%: acetato de amônio 7,5M (6:1), que foram armazenados em um freezer durante uma noite para que os ácidos nucleicos precipitassem. Os ácidos nucleicos precipitados foram coletados e transferidos para tubos de microcentrífuga Eppendorf onde foram centrifugados, secos e reidratados com 300µl de tampão TE (1mM de TRIS + 0,1 mM de EDTA).

Após os passos anteriores procedeu-se uma segunda extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamil (25:24:1), que foi adicionado aos tubos na mesma proporção do TE. Efetuou-se uma nova centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi novamente coletado, e transferido para um novo microtubo, ao qual foi adicionado 300µl de clorofórmio:álcool isoamil (24:1) e procedeu-se uma nova centrifugação. O sobrenadante foi novamente coletado, colocado em um novo microtubo ao qual foi adicionado álcool 95% : acetato de sódio 3M (20:1) e todos os microtubos foram armazenado por uma noite em um freezer para que o DNA precipite. Após este último passo os microtubos foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 rpm e descartou-se a fase aquosa mantendo no microtubo apenas o *pellet* que foi seco a temperatura ambiente e reidratado com 300µl de TE.

A quantificação do DNA foi feita em gel de agarose 1%, onde alíquotas dos DNAs extraídos foram aplicados juntamente com 5µl de *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) como padrão para se determinar a concentração dos DNAs. Após a quantificação, diluiu-se os DNAs para a concentração de 10 ng/µl em água bidestilada.

3.5 Amplificação dos marcadores moleculares e análise em gel

Foram utilizados os marcadores microssatélites ligados aos alelos que determinam a velocidade de escurecimento do grão obtidos por Couto et al. (2010) e Felicetti et al. (2012) (Tabela 1), e os marcadores ligados a

QTLs relacionados ao tempo de cocção de feijão identificados por Garcia et al. (2012).

Tabela 1 *Primers* de microssatélites ligados ao escurecimento tardio de grãos e ao tempo de cocção

Primer	Temp. de anelamento (°C)	Referência do Marcador
PVESTBR-98	55-55	Couto et al. (2010)
PVM02 TC116	55-55	Couto et al. (2010)
PV 176	55-55	Couto et al. (2010)
Pvsd1157	57-57	Felicetti et al. (2012)
Pvsd1158	57-57	Felicetti et al. (2012)
Pvsd0028	57-57	Felicetti et al. (2012)
BM200	58-60	Garcia et al. (2012)
BM 202	58-60	Garcia et al. (2012)
PVESTBR270	60-60	Garcia et al. (2012)
PvM34	55-55	Garcia et al. (2012)
IAC28	48-48	Garcia et al. (2012)
PV 131	58-60	Garcia et al. (2012)
PV 141	55-55	Garcia et al. (2012)
X04001	55-55	Garcia et al. (2012)
X 13329	58-60	Garcia et al. (2012)
PVESTBR_272F	60-60	Garcia et al. (2012)
X80051	46-46	Garcia et al. (2012)

Inicialmente estes marcadores foram testados nos genitores das progênies, a fim de se observar ocorrência de polimorfismo de cada marcador. Aqueles marcadores microssatélites polimórficos foram testados nas progênies. As reações de amplificação do DNA genômico foram preparadas conforme descrito por Carneiro (2009), onde foram misturados os seguintes reagentes nas seguintes concentrações: 20 ng de DNA, 100 µM de cada um dos dntps, 1U de taq DNA polimerase, tampão (composto de 50 mM de TRIS pH 8,3, 20mM de KCl, 2mM de MgCl₂, 10µg de BSA, 0,25% de Ficol 400, 10mM de tartrazine) e água pura. O volume final para cada reação foi de 12µl. Cada reação foi realizada em microtubos de 0,2 ml em

termocicladores, por meio dos seguintes programas: uma etapa de 2 minutos a 94°C, para a desnaturação inicial do DNA, seguida de 32 ciclos, sendo cada um destes constituídos por 20 segundos à 94 °C para a desnaturação, 20 segundos para o anelamento do *primer*, cujas temperaturas variaram dependendo do *primer* testado (50 a 60 °C), e 20 segundos a 72 °C para o alongamento da cadeia de DNA. Após os 32 ciclos, mais quatro minutos a 72°C para a extensão final das cadeias.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese, em gel de poliacrilamida 6% não desnaturante, que foram corados com nitrato de prata 1%.

3.6 Análise dos dados

Os dados obtidos da avaliação fenotípica para o escurecimento de grão foram submetidos à análise de variância no programa SAS (SAS INSTITUTE, 2013).

A análise por época de avaliação (30, 60 e 90 dias após a colheita) seguiu o seguinte modelo estatístico, referente ao modelo de análise para o delineamento em blocos inteiramente casualizados:

$$Y_{ij} = \mu + g_i + a_j + e_{ij}$$

Onde:

Y_{ijkn} : Observação do tratamento “i” feita pelo avaliador “j”
($i=1,2,\dots,192$; $j=1,2,3$);

μ : Média geral do experimento;

g_i : Efeito do i-ésimo genótipo, sendo $g_i \sim N(0, \sigma_g^2)$;

a_j : Efeito fixo do j-ésimo avaliador onde $j= 1, 2, 3$;

e_{ij} : Erro experimental associado à observação Y_{ij} , sendo $e_{ij} \sim N(0, \sigma_e^2)$;

A análise conjunta de todas as épocas foi feita segundo o seguinte modelo estatístico, similar ao modelo utilizado para a análise de variância do delineamento experimental de parcelas subdividas no tempo:

$$Y_{ijl} = \mu + g_i + a_j + d_l + ag_{ki} + ad_{kl} + gd_{il} + e_{ijl}$$

Onde:

Y_{ijl} : Observação referente à progênie “i” feita pelo avaliador “j” na época “l” de avaliação ($i=1, 2, \dots, 192$; $j=1, 2, 3$; $l=1, 2, 3$);

μ : Média geral do experimento;

g_i : Efeito do i-ésimo genótipo, $g_i \sim N(0, \sigma_g^2)$;

a_j : Efeito fixo do j-ésimo avaliador;

d_l : Efeito fixo do l-ésimo tempo de avaliação;

gd_{il} : Efeito da interação do i-ésimo genótipo com o l-ésimo tempo de avaliação, $gd_{il} \sim N(0, \sigma_{gd}^2)$;

Erro A: Efeito da interação entre o i-ésimo genótipo e o j-ésimo avaliador, $ag_{ij} \sim N(0, \sigma_{ag}^2)$;

Erro B: Efeito fixo da interação entre o j-ésimo avaliador e a l-ésima época de avaliação;

Erro C: Erro experimental médio associado à observação Y_{ijl} , $e_{ijl} \sim N(0, \sigma_e^2)$;

O esquema da análise de variância e as respectivas esperanças do quadrado médio encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 Esquema da análise de variância por época de avaliação e da análise conjunta e esperanças do quadrado médio

Análises Individuais			
FV	QM	F	E(QM)
Genótipos (P)	QM1	QM1/QM3	$\sigma_{\epsilon}^2 + A\sigma_{\epsilon}^2$
Avaliador (A)	QM2	QM2/QM3	$\sigma_{\epsilon}^2 + \frac{\sum_j (a_j - \bar{a})^2}{A-1}$
Erro	QM3	-	σ_{ϵ}^2
Análise Conjunta dos Tempos de Avaliação			
FV	QM	F	
Progênes (P)	QM4	QM4/QM6	$\sigma_{\epsilon}^2 + E\sigma_{P \times A}^2 + EA\sigma_P^2$
Avaliador (A)	QM5	QM5/QM6	$\sigma_{\epsilon}^2 + E\sigma_{P \times A}^2 + EN \frac{\sum_j (a_j - \bar{a})^2}{A-1}$
Erro A (A x P)	QM6	-	$\sigma_{\epsilon}^2 + E\sigma_{P \times A}^2$
Época (E)	QM7	QM6/QM9	$\sigma_{\epsilon}^2 + AE \frac{\sum_l (d_l - \bar{d})^2}{E-1}$
Erro B (A x E)	QM8	QM8/QM10	$\sigma_{\epsilon}^2 + N \frac{\sum_{jl} (ad_{jl} - ad)^2}{AE-1}$
PxE	QM9	QM9/QM10	$\sigma_{\epsilon}^2 + A\sigma_{P \times E}^2$
Erro C	QM10	-	σ_{ϵ}^2

*Onde: A refere-se ao número de avaliadores; N ao número de progênes e E ao número de épocas de avaliação.

Foi efetuado o teste de agrupamento de médias de Scott-Knott (SCOTT; KNOTT, 1974) a 5% de probabilidade, para isto utilizou-se o programa estatístico GENES (CRUZ, 2013).

3.7 Análise de associação por marca simples

Foram realizadas análises de associação por marca simples por meio da comparação entre médias entre os genótipos apresentados por cada progênie para cada marcador (MM, Mm, mm) para verificar se os marcadores utilizados realmente encontravam-se ligados aos QTLs controladores do escurecimento de grãos nas progênes avaliadas, para isto procedeu-se a análise da maneira proposta por (SCHUSTER; CRUZ, 2004). O esquema da

análise de variância de associação por marca simples pode ser observado na tabela 3.

Tabela 3 Resumo da análise de variância para escurecimento de grãos em feijão das progênes avaliadas para cada marcador utilizado

FV	GL	QM	F
Genótipos	2		$QM_{\text{genótipos}}/QM_{\text{Erro}}$
Aditivo	1	$(MM-mm)^2$	$QMA_{\text{aditivo}}/QM_{\text{Erro}}$
Dominante	1	$[Mm-(MM+mm)/2]^2$	$QMD_{\text{dominante}}/QM_{\text{Erro}}$
Erro	N-3		
Total	N-1		

N= Número de progênes avaliadas

MM, mm= Genótipo homocigoto para um dos alelos do marcador

Mm=Genótipo heterocigoto para os alelos do marcador

Também foi estimado o coeficiente de determinação (R^2) para cada marcador a partir da soma de quadrados de genótipos e total segunda a seguinte expressão:

$$R^2 = \frac{SQ_{\text{Genótipos}}}{SQ_{\text{Total}}} \times 100$$

Onde:

$SQ_{\text{Genótipos}}$: Refere-se à soma de quadrados de genótipos para cada marcador;

SQ_{Total} : Soma de quadrado total de cada marcador;

3.8 Estimativa de precisão experimental

Como estimativa da precisão experimental foi estimada a acurácia seletiva (RESENDE; DUARTE, 2007). Na Tabela 4 pode-se ver a classificação da precisão experimental de acordo com a estimativa da acurácia seletiva.

Tabela 4 Classificação da precisão experimental de acordo com a estimativa da acurácia seletiva

Valor da acurácia seletiva	Classificação da precisão
0,9 – 1	Muito alta
0,7 – 0,89	Alta
0,5 – 0,69	Moderada
0,1 – 0,49	Baixa

Fonte: Resende e Duarte (2007)

A acurácia foi estimada de acordo com seguinte estimador:

$$\hat{r}_{gg} = \sqrt{1 - 1/F}$$

Onde:

F: Corresponde ao valor do teste F de Snedecor para o efeito de tratamentos (progênes) da análise de variância.

3.9 Estimativa das herdabilidades

Foram estimadas as herdabilidades no sentido amplo e seus limites de confiança para a avaliação do escurecimento em diferentes épocas e considerando todas as épocas conjuntamente, sendo o intervalo de confiança estimados segundo a proposta por Knapp, Stou e Ross (1985).

As herdabilidades no sentido amplo foram estimadas de acordo com a seguinte equação:

$$h_a^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_P^2}$$

Foi utilizada a esperança do quadrado médio para se estimar a variância genética (σ_G^2) e a variância fenotípica (σ_P^2):

a) Análise por época de avaliação:

$$\sigma_P^2 = \frac{QM1-QM3}{A}$$

$$\sigma_P^2 = \frac{QM1}{A}$$

b) Análise englobando todas as épocas de avaliação simultaneamente:

$$\sigma_P^2 = \frac{QM4-QM6}{EA}$$

$$\sigma_P^2 = \frac{QM4}{EA}$$

Os intervalos de confiança foram estimados fazendo-se o uso das expressões (KNAPP; STOU; ROSS, 1985):

a) Intervalo por época de avaliação:

$$LI = \left\{ 1 - \left[\left(\frac{QM1}{QM3} \right) F_{(1-\alpha/2; GL\ Erro; GL\ Genótipos)} \right]^{-1} \right\}$$

$$LS = \left\{ 1 - \left[\left(\frac{QM1}{QM3} \right) F_{(\alpha/2; GL\ Erro; GL\ Genótipos)} \right]^{-1} \right\}$$

b) Intervalo da análise envolvendo as três épocas de avaliação:

$$LI = \left\{ 1 - \left[\left(\frac{QM4}{QM6} \right) F_{(1-\alpha/2; GL\ PxA; GL\ Genótipos)} \right]^{-1} \right\}$$

$$LS = \left\{ 1 - \left[\left(\frac{QM4}{QM6} \right) F_{(\alpha/2; GL\ PxA; GL\ Genótipos)} \right]^{-1} \right\}$$

3.10 Estimativa do ganho com a seleção

O ganho com a seleção para o escurecimento de grão foi estimado por época de avaliação e considerando-se todas as épocas em conjunto. Para o cálculo foi utilizada a seguinte expressão:

$$GS = ds \times h_a^2$$

Onde:

ds: diferencial de seleção, que é dado pela diferença da média das progênies selecionadas pela média geral do experimento com intensidade de seleção de 10%;

h_a^2 : herdabilidade no sentido amplo do caráter em questão;

3.11 Eficiência da SAM

A eficiência da seleção assistida por marcadores moleculares para a velocidade de escurecimento de grãos de feijão foi estimada de duas maneiras. A primeira foi a partir da expressão proposta por Hamblim e Zimmermann (1986):

$$E\% = \frac{A \cdot C}{M \cdot C}$$

Onde:

C: Corresponde a 5% do número de progênies selecionadas;

A: Número de progênies selecionadas pela SAM;

M: Número total de progênies selecionadas fenotipicamente;

Tal estimativa mediu a porcentagem de progênies selecionadas com base nas informações moleculares em relação ao total de progênies selecionadas. O valor estimado da eficiência será máximo quando o número

de progênies selecionadas com o marcador for igual ao número de progênies selecionadas apenas a partir da seleção fenotípica, e será mínima quando as progênies selecionadas com o marcador não coincidirem com aquelas selecionadas fenotipicamente.

Vale ressaltar que para a estimativa da eficiência da seleção assistida através da expressão de Hamblin e Zimmermann (1986) foram levados em conta todos os marcadores, ou seja, foram selecionados aqueles genótipos que apresentaram o maior número de marcas favoráveis.

O segundo modo utilizado para se constatar a eficiência da seleção assistida pelos marcadores moleculares em comparação com a seleção fenotípica foi o índice para a seleção assistida (I) proposto por Stromberg, Dudley e Rufener (1994). Deve-se ressaltar que para a estimativa de I foram utilizadas as 190 progênies. O vetor com os valores do índice I para cada uma das progênies, foi estimado seguindo a seguinte expressão:

$$I=FQ$$

Em que:

F: Corresponde a matriz com “n” linhas (número de famílias) e “m” colunas (número de marcadores), onde o valor de cada progênie para determinado marcador correspondeu à nota média de todos os indivíduos que apresentaram o mesmo genótipo do marcador (MM, Mn ou mm);

Q: É um vetor coluna de pesos associados com cada marcador utilizados com “m” linhas;

O peso associado a cada marcador (Q) para se estimar o índice de seleção considerado foi o valor da estatística F obtidos a partir da análise de associação por marca simples para cada marcador.

De posse dos valores de I para cada progênie foi efetuada a seleção daquelas que apresentaram os menores valores de I.

Posteriormente foi estimado o ganho com a seleção das 20 melhores progênies com base no valor de I. Para isto realizou-se uma análise de regressão múltipla “*stepwise*”, com os marcadores utilizados, utilizando-se o programa SAS (SAS INSTITUTE, 2013), para que se obter a estimativa do R_m^2 (coeficiente de determinação da regressão com base nas informações moleculares) que foi utilizado na estimativa do ganho esperado com a SAM. O ganho estimado com a SAM foi obtido através do uso da seguinte expressão:

$$GS_{SAM} = ds_m \times R_m^2$$

Onde:

ds_m : Diferencial de seleção, dado pela diferença entre as médias das progênies selecionadas pelo índice de seleção (I) e a média geral das progênies, com intensidade de seleção de 10%;

R_m^2 : É o coeficiente de determinação.

Posteriormente, o ganho obtido com a SAM foi comparado com o ganho obtido com a seleção fenotípica com o propósito de se observar qual método foi mais eficiente para a seleção de progênies para o escurecimento tardio de grãos. Para isto utilizou-se a seguinte equação:

$$E\%_R = \frac{GS\%_{SAM}}{GS\%_F} \times 100$$

Onde:

$GS\%_{SAM}$: Ganho com a seleção das 20 melhores progênies baseada no índice de seleção;

$GS\%_F$: Ganho com a seleção das 20 melhores progênies baseada apenas em informações fenotípicas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise fenotípica para o escurecimento de grãos

O resumo das análises de variância efetuadas com os dados obtidos por época de avaliação (30, 60 e 90 dias após a colheita) podem ser observados na Tabela 5. Utilizando-se a acurácia seletiva como estimativa de precisão experimental por época, conclui-se que a precisão obtida foi muito alta, atingindo valores similares ao obtido por (ARAÚJO, 2012).

Tabela 5 Resumo das análises de variância para cada época de avaliação, com médias gerais por avaliação, estimativa da herdabilidades (h^2) e seus intervalos de confiança (LI, LS), acurácia seletiva (r_{gg}) e ganho com a seleção (GS%)

FV	GL	30 Dias	60 dias	90 dias
		QM		
Avaliador	2	20,611**	22,0364**	2,4184**
Genótipos	(191)	1,8202**	1,8434**	2,1613**
Progênes (P)	189	1,8206**	1,8537**	2,1655**
Genitores(G)	1	0,6666 ^{ns}	1,5*	2,6666**
P vs G	1	2,8948**	0,2375 ^{ns}	0,8684*
Erro	382	0,2441	0,2598	0,1897
Média Progênes		2,9684	2,9666	3,2842
Média BRSMG ¹		3,3333	2,6666	3
Média RP-2		4	3,6666	4,3333
h^2		0,8658	0,859	0,9122
IC ²		(0,8275-0,894)	(0,818-0,889)	(0,887-0,931)
\hat{r}_{gg}		0,9305	0,9268	0,9551
CV%		16,64	17,18	13,26
GS% ³		38,57	37,67	44,98

*, ** Significativo a 5% e 1% de probabilidade respectivamente pelo Teste F;

^{ns} Não significativo pelo Teste F;

¹ Cultivar BRSMG Madrepérola;

³ Ganho com a seleção das 20 melhores progênes;

Observou-se a ocorrência de diferenças significativas ($P < 0,01$) entre os genótipos avaliados, o que indica a possibilidade de se obter genótipos promissores com a seleção daqueles com escurecimento de grãos tardio. Considerando o contraste entre as médias dos genitores e as progênes, nas avaliações efetuadas 60 e 90 dias após a colheita, pode-se notar na Tabela 5, a predominância da interação aditiva para o controle do caráter, devido à baixa magnitude do quadrado médio do contraste. Em relação aos genitores, percebe-se que para na primeira avaliação eles não se diferiram estatisticamente quanto ao seu comportamento, provavelmente devido à capacidade deles se manterem durante o primeiro mês de armazenamento um grão com boa aparência no que diz respeito ao caráter em estudo. Já para as demais avaliações tal diferença no escurecimento é observada, indicando assim que as linhagens diferem na velocidade de escurecimento do grão. Assim, novamente para o contraste média dos genitores comparada com a média das progênes, na avaliação aos 30 dias, algumas progênes tiveram maior escurecimento do que o genitor de escurecimento precoce, gerando a significância do contraste.

Como era de se esperar, é notório a tendência de escurecimento dos grãos com o passar do tempo. Isto pode ser comprovado analisando-se o comportamento das médias de acordo com a época de avaliação. Tal fenômeno ocorre devido ao acúmulo de compostos derivados de reações metabólicas, principalmente aquelas ligadas às reações de oxidação de compostos fenólicos por enzimas do grupo das polifenoloxidasas e das peroxidases (MOURA et al., 1999; RIOS et al., 2002; SILVA, 2008).

A magnitude da herdabilidade estimada para cada época de avaliação pode ser considerada alta, e reflete a grande variabilidade existente para o caráter velocidade de escurecimento de grãos dentro da população avaliada. O valor estimado das herdabilidades nas três avaliações, são sempre positivos e similares aos estimados observados na literatura (ARAÚJO; RAMALHO; ABREU, 2012; SILVA et al., 2008), indicando assim a possibilidade de um elevado ganho com a seleção para o caráter em questão

através da seleção das progênies que apresentaram melhor desempenho na avaliação, o que pode ser observado na Tabela 5. Os valores calculados para os limites superiores e inferiores dos intervalos de confiança para a herdabilidade são sempre positivos e com pequena amplitude, o que indica que a estimativa da herdabilidade difere de zero, e que a herdabilidade foi estimada com uma precisão alta, ou seja, com um pequeno erro associado à estimativa (RAMALHO et al., 2012).

A herdabilidade da avaliação aos 90 dias de armazenamento é de maior magnitude dentre as avaliações feitas, indicando assim que a seleção das melhores progênies será mais eficiente aos 90 dias de armazenamento, embora a seleção já possa ser efetuada a partir da primeira avaliação, uma vez que nestas avaliações a herdabilidade do caráter já é superior 0,70 (SILVA et al., 2008). Este alto valor observado aos 90 dias pós-colheita é devido à maior facilidade de discernir as progênies que apresentam grãos com o tegumento mais claro daqueles de tegumento mais escuro e consequentemente diminuir a taxa de erro durante a avaliação, o que é dificultado nas avaliações anteriores, uma vez que a avaliação é feita visualmente. Um modo de se avaliar grãos num curto período de tempo e obter herdabilidades semelhantes às obtidas 90 dias após a colheita, seria utilizar a metodologia proposta por Junk-Knievel, Vandenberg e Bett (2007), que consiste em submeter os grãos colhidos a radiação ultravioleta, que irá acelerar o processo de escurecimento dos grãos.

Visando-se determinar a coincidência das melhores progênies selecionadas aos 30, 60 e 90 dias após a colheita, foi estimado o índice de coincidência de Hamblin e Zimmermann (1986) para as 30 progênies com melhor desempenho por avaliação efetuada (Tabela 6). Os resultados demonstram uma boa coincidência entre as progênies selecionadas aos 30 e 60 dias de armazenamento em relação às progênies selecionadas aos 90 dias de armazenamento, embora a coincidência entre as progênies selecionadas nas duas primeiras épocas de avaliação seja menor como pode ser observado. Isto permite concluir que a seleção pode ser efetuada a partir de

30 dias de armazenamento, corroborando assim com o que foi dito anteriormente. O mesmo índice foi estimado comparando a seleção das progênies por época com a seleção a partir das médias obtidas na análise conjunta de todas as épocas, e notou-se que a coincidência foi a mesma para a seleção aos 30 e 60 dias, 0,7543, enquanto que para a seleção aos 90 dias a coincidência estimada pode ser considerada como muito alta, 0,9298, indicando assim a superioridade da seleção aos 90 dias de armazenamento quando comparada com as médias obtidas da análise conjunta. Logo, embora seja possível a seleção a partir dos 30 dias de armazenamento, recomenda-se proceder a seleção apenas após os 90 dias, afim de se evitar uma possível perda de genótipos superiores.

Tabela 6 Índice de coincidência de seleção das 30 melhores progênies nas três épocas de avaliação

	60	90
30	0,6491	0,7192
60		0,7192

Os resultados obtidos a partir da análise de variância conjunta de todas as épocas encontram-se na Tabela 7. Observa-se, como nas análises individuais por época de avaliação, uma alta acurácia seletiva, indicando uma alta precisão experimental. A acurácia seletiva é a correlação entre o valor genotípico estimado com o valor genotípico verdadeiro do indivíduo (RESENDE; DUARTE, 2007). Assim, de acordo com a análise, os valores genotípicos obtidos são próximos aos valores genotípicos verdadeiros, uma vez que a acurácia estimada indica uma correlação quase perfeita entre ambos. Logo, a seleção com base na média da análise conjunta é a mais confiável, dentre as médias obtidas em cada época de avaliação.

Tabela 7 Resumo da análise de variância conjunta de todas as épocas de avaliação, incluindo as médias gerais das avaliações e dos genitores, herdabilidade (h^2) e seu intervalo de confiança (IC) e acurácia seletiva (r_{gg})

	FV	GL	QM	F
Avaliador		2	15,5978 ^{**}	58,59
Genótipos		(191)	5,3650 ^{**}	20,15
Progênes (P)		189	5,3808 ^{**}	20,21
Genitores (G)		1	4,5 ^{**}	16,90
P vs G		1	3,2462 ^{**}	12,19
Erro A (Avaliador x Genótipos)		382	0,2662	-
Época		2	19,176 ^{**}	89,69
Avaliador x Época (Erro B)		4	14,609	-
Época x Genótipos		382	0,23 ^{ns}	1,08
Erro C		764	0,2137	-
Média Geral			3,073	
Média Madrepérola			3	
Média RP-2			4	
h^2			0,9542	
IC			(0,9411-0,9641)	
CV%			15,04	
r_{gg}^*			0,9783	

^{**} Significativo a 1% de probabilidade pelo Teste F

^{ns} Não significativo pelo Teste F

Como era de se esperar os genótipos avaliados diferiram significativamente ($p < 0,01$), com destaque para as progênes avaliadas que apresentaram um alto nível de variabilidade entre si, o que pode ser observado pelo valor da estatística F explicitado na Tabela 7. A variabilidade existente entre os genótipos avaliados pode ser comprovada a partir da alta estimativa da herdabilidade obtida, que foi estimada com um pequeno erro associado, uma vez que seus limites de confiança estão muito próximo da estimativa. Assim, é esperado a ocorrência de sucesso com a seleção das melhores progênes e ainda um grande ganho com a seleção fenotípica para o caráter.

A elevada heterogeneidade observada entre as progênies e o alto valor da estimativa da herdabilidade, ocorreram devido à não significância da interação Genótipos X Épocas, que indica que os genótipos avaliados apresentaram comportamentos coincidentes nas diferentes épocas de avaliação, o que também foi constatado por Araújo, Ramalho e Abreu (2012).

Com o intuito de se determinar quais eram os genótipos com melhor desempenho para o caráter escurecimento de grãos, efetuou-se o teste de agrupamento de médias de Scott-Knott (SCOTT; KNOTT, 1974) com as médias obtidas a partir da análise conjunta de todas as épocas de avaliação. Com base na divisão das médias em grupos significativamente diferentes de acordo com o teste, foi plotado um gráfico na qual no eixo das ordenadas encontra-se o os grupos determinados pelo teste e no eixo das abscissas encontra-se o número de progênies (Figura 2). O teste de Scott-Knott dividiu as progênies em oito grupos estatisticamente diferentes. Observando-se as médias apresentadas pelas linhagens parentais na Tabela 7 pode-se notar que os genitores foram contrastantes entre si, uma vez que o genitor BRSMG-Madrepérola pertence ao grupo D, enquanto a linhagem RP-2 ao grupo G. Nota-se também a ocorrência de progênies com comportamento superior ao genitor mais favorável, no caso a cultivar Madrepérola, indicando assim a possibilidade de se obter linhagens que apresentem o escurecimento de grãos mais tardio que a cultivar Madrepérola, que é referência neste quesito (CARNEIRO et al., 2012).

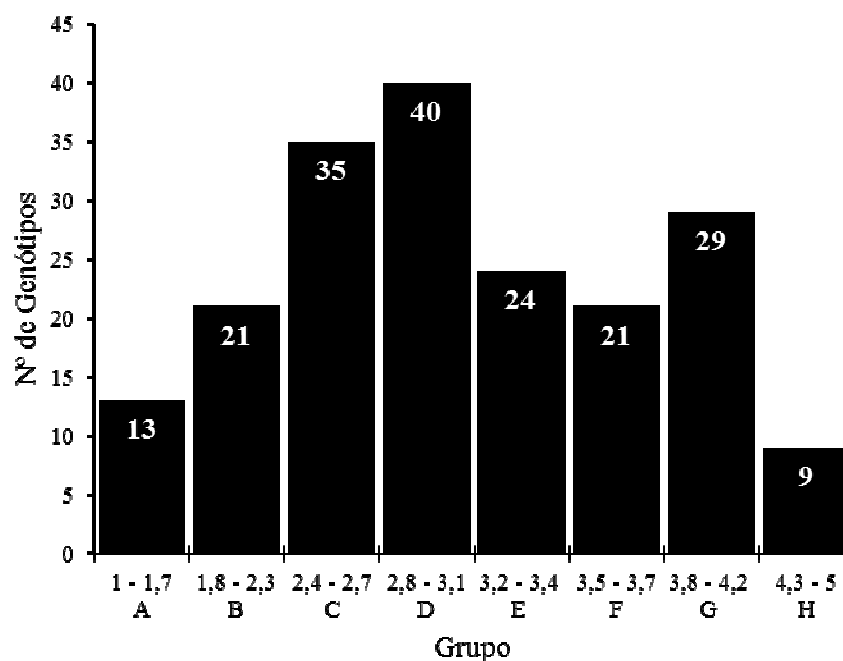


Figura 2 Distribuição das médias dos genótipos avaliados, pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade

Observando-se a distribuição das médias e selecionando-se as progênies com média inferior a 2,6 (consideradas como progênies de escurecimento tardio) pode-se notar que a frequência destas é de 26,04%, muito próximo do que é esperado para a segregação de herança monogênica, o que também foi constatado por alguns autores (ARAÚJO; RAMALHO; ABREU, 2012; SILVA et al., 2008). Outro fator que aponta para a possível herança monogênica do caráter é a alta herdabilidade estimada, o que é comum para caracteres de controle genético com baixo número de genes. Embora os resultados do presente trabalho apontem para uma possível herança monogênica, o que se sabe é que o caráter escurecimento de grãos é controlado por dois genes, o *j* e o *sd*, que são responsáveis por determinar a tendência de escurecimento de grãos e a velocidade em que isto acontece. Segundo Elsadr et al. (2011) estes dois genes ainda interagem, levando a

ocorrência de epistasia recessiva, onde o genótipo *jj* é epistático dos dois alelos do gene *sd*, e condiciona grãos que não irão escurecer. Somando-se ao fato de o caráter ser controlado por dois genes, o escurecimento de grãos ainda é afetado pela ação de enzimas como as dos grupos das polifenoloxidasas e a peroxidases, que atuam oxidando compostos fenólicos presentes na semente, levando ao escurecimento de grãos (MOURA et al., 1999; RIOS; ABREU; CORREA, 2002; MARLES; VANDENBERG; BETT, 2008). Portanto a expressão do caráter escurecimento de grão é mais complexo do que aparenta ser, uma vez que várias rotas metabólicas influenciam para a aceleração ou retardamento do escurecimento da semente, além do elevado efeito do ambiente.

4.2 Análise de associação por marca simples

Foram testados todos os marcadores moleculares relacionados a QTLs obtidos por Couto et al. (2010) e Felicetti et al. (2012), porém destes apenas um marcador, o PVM02TC116, apresentou polimorfismo para os genitores e conseqüentemente para a população segregante. Devido à baixa quantidade de marcadores polimórficos ligados a QTLs obtidos e à alta correlação genética observada entre os caracteres velocidade de escurecimento de grãos e o tempo de cocção (ARAÚJO; RAMALHO; ABREU, 2012), decidiu-se então utilizar marcadores relacionados a QTLs que controlam o tempo de cozimento de grãos identificados por Garcia et al. (2012) para se proceder a seleção assistida para escurecimento de grãos. Dentre os marcadores para tempo de cocção testados, apenas dois pares de *primers* (PV141 e X04001) apresentaram polimorfismo nas linhagens parentais e foram utilizados na genotipagem da população segregante.

Provavelmente o pequeno polimorfismo encontrado entre os genitores, e conseqüentemente entre as progênies, para os marcadores relacionados a QTLs foi devida a baixa divergência genética apresentada entre os dois genitores, já que ambos apresentam grãos do tipo carioca, e

provavelmente apresentam uma genealogia parecida. Em um trabalho desenvolvido por Cabral et al. (2011) visando determinar divergência genética entre acessos de feijão comum cedidos pela EMBRAPA, cultivares comerciais e variedades locais, constatou-se uma alta similaridade entre os acessos cedidos pela EMBRAPA e as cultivares comerciais. Coincidentemente as linhagens utilizadas neste trabalho são uma cultivar comercial desenvolvida pelo programa conjunto de melhoramento do feijoeiro da UFV, UFLA, FAPEMIG e EMBRAPA resultante do cruzamento de duas linhagens endogâmicas da EMBRAPA, a BRSMG Madrepérola, e uma linhagem, a RP-2, oriunda do programa de seleção recorrente para porte do melhoramento do feijoeiro da UFLA.

De posse dos dados da genotipagem das progênies utilizadas no presente trabalho, procedeu-se análise por ponto de cada marcador afim de se certificar que os marcadores moleculares utilizados estão relacionados a locos que controlam o escurecimento de grãos, para isto utilizou-se a metodologia apresentada por Schuster e Cruz (2004). Para realizar a análise por ponto, utilizou-se os dados provenientes da segunda avaliação fenotípica (60 dias de armazenamento), uma vez que o QTL ao qual o marcador PVM02TC116 está ligado foi identificado nesta época de avaliação. Os resumos das análises por ponto estão representados na Tabela 8.

Tabela 8 Resumo das análises de associação por marca simples dos marcadores polimórficos

FV	PV 141			X04001		PVM02 TC116	
	GL	QM	F	QM	F	QM	F
Genótipos	2	3,5071	6,09**	2,8778	4,87**	1,5686	2,6 ^x
Aditivo	1	2,0829	3,62 ^{ns}	3,4235	5,8*	3,1338	5,19*
Dominante	1	3,5512	6,16*	3,2185	5,45*	0,0735	0,12 ^{ns}
ERRO	189	0,5760		0,5905		0,6043	
R ²		0,0605		0,0490		0,0267	

**,*^x, Significativo a 1%, 5%, 8% de probabilidade pelo Teste F

^{ns} Não significativo pelo teste F

Pode-se observar, que todas os marcadores utilizados apresentaram diferenças significativas para a fonte de variação Genótipos, aqui vale uma ressalva de que para o marcador PVM02TC116 foi significativo apenas a 8%. As diferenças significativas observadas demonstram que todos os marcadores encontram-se ligados a locos relacionados a velocidade de escurecimento de grãos (SCHUSTER; CRUZ, 2004).

Os resultados explicitados na Tabela 8 evidenciam que marcador PVM02TC116 está ligado a um QTL no qual há uma maior importância dos efeitos aditivos. Já para os QTLs ligados aos marcadores relacionados ao tempo de cocção pode-se observar que para ambos ocorre uma certa relevância também para os efeitos de dominância. Nhanengue (2014) observou que para os últimos, o efeito de dominância não era relevante para os QTLs marcados por estes marcadores em relação à porcentagem de grãos cozidos e havia predominância de efeitos aditivos. Isto demonstra que para o caráter escurecimento de grãos o controle genético pode ser diferente do apresentado para a porcentagem de grãos cozidos.

Embora o tempo de cocção e a velocidade de escurecimento dos grãos apresentem uma alta correlação genética após os 60 dias de armazenamento (ARAÚJO; RAMALHO; ABREU, 2012), o que se nota é que ambos os marcadores relacionados ao tempo de cocção explicaram pouco da variação fenotípica para escurecimento de grãos das progênies avaliadas. Isto já era esperado, uma vez que para a identificação destes QTLs não foi considerada a velocidade de escurecimento dos grãos, ou seja, não foi observado previamente se tais QTLs marcados por estes marcadores estavam relacionados também com o controle genético da velocidade de escurecimento de grãos. Garcia et al. (2012) observaram que os QTLs marcados para tempo de cocção pelos marcadores PV 141 e X04001 explicaram na geração $F_{2:4}$ da população segregante utilizada no estudo de detecção de QTLs, aproximadamente 14 e 21% respectivamente, muito acima dos valores obtidos no presente trabalho para escurecimento de grãos.

Embora tais marcadores tenham explicado pouco da variação fenotípica para o escurecimento de grãos, eles podem ser utilizados para aumentar a capacidade do modelo de explicar tal variação.

Surpreendentemente o marcador ligado ao QTL relacionado à velocidade de escurecimento de grãos, explicou uma parcela ínfima da variação fenotípica para o caráter em estudo. Couto et al. (2010) observaram no seu estudo de identificação de QTLs relacionados ao escurecimento de grãos, que ocorria a co-segregação do marcador PVM02 TC116 com um QTL de grande efeito para o caráter em estudo. De acordo com estes autores tal QTL explicou aproximadamente 40% da variação fenotípica apresentada pela população utilizada para a detecção deste. Era de se esperar que o uso deste marcador explicasse uma alta parcela da variação fenotípica das progênies utilizadas no presente trabalho, uma vez que, a cultivar BRSMG Madrepérola, que apresenta escurecimento de grãos tardio, foi utilizada como genitora no cruzamento que deu origem às progênies utilizadas no trabalho desenvolvido por Couto et al. (2010) e neste trabalho.

Algumas hipóteses podem ser levantadas para a baixa capacidade do QTL de explicar a variação fenotípica. A primeira está relacionada aos alelos presentes nos genitores e a segunda à efeitos epigenéticos. Como dito anteriormente no controle genético do escurecimento de grãos estão envolvidos dois genes, o *j* e o *sd* (ELSADR et al., 2011), sendo o alelo *j* epistático aos alelos *Sd* e *sd*, o que caracteriza a epistasia recessiva, assim a segregação que ocorreria em F_2 seria 9 *J_Sd_*, grãos com escurecimento precoce, 3 *J_sdsd*, sementes com escurecimento tardio, 3 *jjSd_* e 1 *jjdsd*, totalizando 4 grãos sem tendência de escurecimento ou com escurecimento muito lento. No trabalho desenvolvido por Couto et al. (2010), os genitores cruzados foram o VC-3 (BRSMG-Madrepérola) e a cultivar Majestoso, e suas prováveis constituições genéticas, seriam, respectivamente *jjdsd* e *JJSdSd*. Assim, na geração F_2 as plantas devem ter apresentado segregação conforme citado anteriormente, e, possivelmente, os autores podem ter marcado o alelo *sd*. No presente estudo os genitores empregados foram a

cultivar BRSMG-Madrepérola e a linhagem RP-2. Considerando que entre os marcadores do QTL identificado por Couto et al. (2010) a maioria foi monomórfico nos genitores, a provável constituição genética da linhagem RP-2 deve ser *JJsdsd*. Outra razão para essa sugestão é o fato da avaliação aos 30 dias de armazenamento ambos os genitores não se diferenciaram. A provável segregação em F_2 neste caso seria de 3 sementes com escurecimento mais tardio (*J_sdsd*), porém, mais escuros, e 1 grão com escurecimento tardio, mas mais claro (*jjsdsd*). Consequentemente, com o alelo *sd* fixado na população segregante, realmente não é esperado que o QTL identificado por Couto et al. (2010) explique a variação fenotípica observada. Entretanto, uma questão que pode ser levantada é como o marcador PVM02TC116 apresentou polimorfismo nos genitores embora se esperasse que estivesse também fixado, já que é o melhor marcador do alelo *sd*? Isso pode ser explicado pelo fato que em microssatélites há uma alta probabilidade de que durante a divisão celular pode ser gerado polimorfismo nas regiões repetidas devido à ocorrência de *crossing over* desigual ou algum erro da DNA polimerase durante a replicação (*slippage*). Outro fato que provavelmente confirme o afirmado até aqui, é que os marcadores identificados por Felicetti et al. (2012) não apresentaram polimorfismo nos genitores, e segundo estes autores tais marcadores encontram-se ligados ao alelo *sd*. Portanto, pode ser que o gene *j* seja o responsável por explicar a maior parte da variação fenotípica das progênes devido a causas genéticas.

Na hipótese de efeito epigenético alterando a expressão do QTL de grande efeito para escurecimento de grão, o que provavelmente ocorreu é alteração no nível de metilação, o que consequentemente afeta a expressão gênica (RABOY, 2013). Nesse caso, o marcador microssatélite torna-se inútil para a seleção assistida. Um marcador alternativo que poderia ser identificado próximo desse QTL é o AFLP sensível a metilação no sítio de corte da enzima. Tal marcador poderá vir a ser útil na seleção assistida do caráter, considerando o efeito materno em seu controle, o que permitiria a seleção já na F_2 e a redução de tempo para o melhoramento.

Problemas com relação à interação QTL x Ambiente tem sido reportada em alguns estudos também como um dos causadores da baixa capacidade de determinados marcadores de explicar a variação fenotípica para determinados caracteres. Pereira et al. (2008) e Torga et al. (2010) observaram a variação dos efeitos de QTLs para produtividade de grãos em feijoeiro em diferentes safras. Díaz-Ruiz et al. (2010) constataram que alguns QTLs relacionados a resistência ao parasita *Orobanche crenata*, que afeta o feijão fava, não expressaram em determinados ambientes. De acordo com Santos (2008), a interação QTL x Ambiente é decorrente da expressão diferencial do QTL nos diferentes ambientes ou quando há ausência de expressão nos ambientes avaliados. Em relação ao escurecimento de grãos sabe-se vários fatores ambientais, tais como a temperatura, a claridade, a incidência de luz ultravioleta, a humidade relativa à qual o grão é submetido afetam a expressão do caráter. (PARK e MAGA, 1999; HUGHES e SANDSTED, 1975; BRACKMANN et al., 2002; JUNK-KNIEVEL et al., 2007). Entretanto, na hipótese de interação QTL x ambientes os efeitos epigenéticos certamente foram quem mais contribuíram para a interação. Assim, possivelmente tais fatores foram os responsáveis pela baixa capacidade de explicação da variação fenotípica pelo marcador, uma vez que a expressão do caráter não foi igual à ocorrida quando houve a identificação do QTL. Comparando-se as médias da cultivar BRSMG Madrepérola aos 60 dias de armazenamento obtidas neste trabalho com as médias obtidas por Silva (2007), pode-se observar que as médias obtidas por Silva (2007), que foram as médias utilizadas por Couto et al. (2010), foram mais baixas (2,25) que as obtidas nesta pesquisa (2,66), isto provavelmente já demonstra as diferenças ambientais que a linhagem foi submetida durante o tempo em que ela permaneceu armazenada.

4.3 Comparação entre a seleção fenotípica, assistida por marcadores moleculares e índice de coincidência

O ganho obtido com a seleção das progênies com base no índice obtido pela aplicação do método proposto por Stromberg, Dudley e Rufener (1994) propiciou um pequeno ganho com a seleção (Tabela 9). Isso ocorreu principalmente devido à pequena parcela da variação explicada pelos marcadores utilizados no presente trabalho e também devido ao pequeno valor obtido pela estimativa da estatística F obtida a partir da análise por ponto para cada marcador, que indica uma baixa variabilidade entre as classes genotípicas do marcador observadas (MM, Mm e mm). Comparando-se o ganho obtido pela seleção fenotípica feita aos 60 dias de armazenamento (Tabela 1) com a seleção feita pelo índice pode-se assumir que a seleção assistida pelos marcadores moleculares não foi efetiva uma vez que o ganho obtido pela seleção fenotípica foi aproximadamente 50 vezes maior que a seleção com base no índice. Tão ampla superioridade pode ser explicada pela alta diferença apresentada pelas estimativa da herdabilidade na avaliação aos 60 dias de armazenamento (85%) e do R^2 obtido (6%), o que também foi notado por outros autores (PEREIRA et al., 2008).

Tabela 9 Estimativas do coeficiente de determinação obtido a partir da regressão *stepwise* (R^2), média geral dos índices de seleção proposto por Stromberg, diferencial de seleção considerando o índice de seleção (d_{sm}), ganho com a seleção baseado no índice ($GS_m\%$), ganho de seleção com seleção assistida em relação à fenotípica ($E\%_R$) e índices de coincidência (E%)

R^2 stepwise	0,0669
Média Geral ¹	2,9666
d_{sm}	0,4666
$GS_m\%$	0,9438
$E\%_R$	2,505
$E\%^{1}$	8,77
$E\%^{2}$	22,1

^{1,2} Índice de coincidência com a seleção das 30 e 50 melhores progênies respectivamente (HAMBLIM; ZIMMERMANN, 2008)

Com base no índice de coincidência de Hamblin e Zimmermann (1986), o que se notou foi uma baixa taxa de coincidência quando feita a seleção com base no número de marcas favoráveis apresentadas pelos genótipos com a seleção baseado nas informações fenotípicas, mesmo utilizando-se números variáveis de progênies selecionadas (30 e 50). Isto, se deve à baixa associação fenótipo x marcador, pois como salientado anteriormente, os marcadores explicaram uma baixa taxa da variação fenotípica.

O uso de marcadores para a seleção seria recomendado em casos onde, o índice de coincidência fosse alto, uma vez que isto indicaria que grande parte dos genótipos selecionados coincidiriam com os selecionados com base no fenótipo, o que tornaria o ganho com a seleção similares para a seleção feita com base no número de marcas favoráveis com a seleção fenotípica.

5 CONCLUSÃO

A seleção fenotípica é mais eficiente, propiciando maior ganho com a seleção para caráter escurecimento tardio de grãos, quando comparada com a seleção assistida por marcadores moleculares.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, L. C. A. **Seleção de linhagens de feijoeiro com escurecimento tardio dos grãos**. 2012. 66 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) -Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

ARAÚJO, L. C. A.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, Â. D. F. B. Estimates of genetic parameters of late seed-coat darkening of carioca type dry beans. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 2, p. 156–162, abr. 2012.

BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. O. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2012.

BENINGER, C. W. et al. Changes in polyphenols of the seed coat during the after-darkening process in pinto beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food chemistry**, Easton, v. 53, n. 20, p. 7777–7782, 5 Oct. 2005.

BERNARDO, R. Molecular markers and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years. **Crop Science**, Madison, v. 48, n. 5, p. 1649–1664, Sept. 2008.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa: Editora da UFV, 2009.

BRACKMANN, A. et al. Conservação de três genótipos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do grupo carioca em armazenamento refrigerado E. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 6, p. 911–915, dez. 2002.

BRESSANI, R. et al. Tanin in common beans: methods of analysis and effects on protein quality. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 48, n. 2, p. 1000–1003, May 1993.

BURLE, M. L. et al. Microsatellite diversity and genetic structure among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary

center of diversity. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v. 121, p. 801–813, Sept. 2010.

CABRAL, P. D. S. et al. Diversidade genética de acessos de feijão comum por caracteres. **Ciência Agronômica**, v. 42, n. 4, p. 898–905, dez. 2011.

CARNEIRO, F. F. **Genética da resistência do feijoeiro ao mofo branco e o uso do retrocruzamento assistido por marcadores microsatélites**. 2009. 85 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

CARNEIRO, G. E. S.; SOARES, D. M.; COSTA, D. J. C. **Resultados do ensaio Sul Brasileiro de avaliação de linhagens de feijão nos anos 1997/98 e 1998/99**. Santo Antônio de Goiás:Embrapa Arroz e Feijão, 2000.

CARNEIRO, J. E. de S. et al. BRSMG madreperola□: common bean cultivar with late-darkening carioca grain. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 12, n. 4, p. 281–284, Dec. 2012.

CHACÓN, M. I.; PICKERSGILL, S. B.; DEBOUCK, D. G. Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L .) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. **Theoretical and applied genetics**, Berlim, v. 110, n. 3, p. 432–444, Feb. 2005.

COLLARD, B. C. Y.; MACKILL, D. J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, Londres, v. 363, n. 1491, p. 557–72, Feb. 2008.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 2013/14:nono levantamento**. Brasília: Conab, 2014. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 14 mar. 2014.

CONCIBIDO, V. C.; DIERS, B. W.; ARELLI, P. R. A Decade of QTL mapping for cyst nematode resistance in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 44, n. 4, p. 1121–1131, July 2004.

COUTO, K. R. et al. Identificação de marcadores microssatélites relacionados ao escurecimento de grãos em feijão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 11, p. 1268–1274, nov. 2010.

CRUZ, C. D. GENES: a software package for analysis in experimental statistic and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 35, n. 3, p. 271–276, Sept. 2013.

DÍAZ, A. M.; CALDAS, G. V.; BLAIR, M. W. Concentrations of condensed tannins and anthocyanins in common bean seed coats. **Food Research International**, Barking, v. 43, n. 2, p. 595–601, Mar. 2010.

DÍAZ-RUIZ, R. et al. Validation of QTLs for *Orobanche crenata* resistance in faba bean (*Vicia faba* L.) across environments and generations. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v. 120, n. 5, p. 909–19, Mar. 2010.

ELSADR, H. T. et al. Characterization of seed coat post harvest darkening in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v. 123, n. 8, p. 1467–72, Dec. 2011.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. Essex: Longmans Green, 1996.

FELICETTI, E. et al. Simple sequence repeats linked with slow darkening trait in pinto bean discovered by single nucleotide polymorphism assay and whole genome sequencing. **Crop Science**, Madson, v. 52, n. 4, p. 1600, July 2012.

GARCIA, R. A. V. et al. QTL mapping for the cooking time of common beans. **Euphytica**, Wageningen, v. 186, n. 3, p. 779–792, Dec. 2012.

GEPTS, P. Origin and evolution of common bean: Past events and recent trends. **HortScience**, Alexandria, v. 33, n. 7, p. 1124–1130, Dec. 1998.

GUIMARÃES, C. T. et al. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 253, p. 24–33, ago. 2009.

HAMBLIM, J. E.; ZIMMERMANN, M. J. Breeding common bean for yield in mixture. **Plant Breeding Reviews**, Tóquio, v. 4, p. 245–272, Feb. 1986.

HINKS, M. J.; STANLEY, D. W. Lignification: evidence for a role in hard-to-cook beans. **Journal Food Biochemistry**, Hoboken, v. 11, n. 1, p. 41–58, Feb. 1987.

HUGHES, P. A.; SANDSTED, R. F. Effect of temperature, relative humidity, and light on the color of “California Light Red Kidney” bean seed during storage. **HortScience**, Alexandria, v. 10, n. 4, p. 423–432, Jan. 1975.

JUNK-KNIEVEL, D. C.; VANDENBERG, A.; BETT, K. E. An accelerated postharvest seed-coat darkening protocol for pinto beans grown across different environments. **Crop Science**, Madson, v. 47, n.2 , p. 694–702, Mar. 2007.

JUNK-KNIEVEL, D. C.; VANDENBERG, A.; BETT, K. E. Slow darkening in pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats is controlled by a single major gene. **Crop Science**, Madson, v. 48, n. 1, p. 189–193, Jan. 2008.

KNAPP, S. J.; STOU, W. W.; ROSS, W. Exact confidence intervals for heritability on a progeny mean basis. **Crop Science**, Madson, v. 25, n. 1, p. 192–194, Jan. 1985.

LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. L.; MENEZES, E. W. Qualidade nutricional. In: ARAUJO, R. S.; AGUSTIN RAVA, L. F.; ZIMMERMANN, M. J. O. (Ed.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Potafos, 1996. p. 71–99.

LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. **Genetics**, Austin, v. 124, n. 3, p. 743–56, Mar. 1990.

LIU, P.; ZHU, J.; LU, Y. Marker-assisted selection in segregating generations of self-fertilizing crops. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 109, n. 2, p. 370–376, July 2004.

LOPES, R. L. T. **Características tecnológicas de genótipos de feijoeiro em razão de épocas de cultivo e períodos de armazenamento**. 2011. 64 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônômico de Campinas, Campinas, 2011.

MARLES, M. A S.; VANDENBERG, A.; BETT, K. E. Polyphenol oxidase activity and differential accumulation of polyphenolics in seed coats of pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.) characterize postharvest color changes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 56, n. 16, p. 7049–7056, 27 Aug. 2008.

MORRIS, M. et al. Money matters (II): costs of maize inbred line conversion schemes at CIMMYT using conventional and marker-assisted selection. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 11, n. 3., p. 235–247, Apr. 2003.

MOURA, A. C. C. et al. Influência da exposição ao sol, dos tipos de secagem e do armazenamento, na atividade de peroxidases e polifenoloxidasas e fenólicos totais em duas cultivares e uma linhagem de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 2, p. 345–352, June 1999.

NHANENGUE, C. L. **Seleção assistida por marcadores de DNA e fenotípica para tempo de cocção**. 2014. 77 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

PARK, D.; MAGA, J. A. Dry bean (*Phaseolus vulgaris*) color stability as influenced by time and moisture content. **Journal of Food Processing Preservation**, Hoboken, v. 23, n. 6, p. 515–522, Dec. 1999.

PEREIRA, H. S. et al. BRS notável: cultivar de feijoeiro comum carioca semiprecoce com alto potencial produtivo e resistência a doenças. **Comunicado Técnico**, Santo Antônio de Goiás, n. 202, p. 1–6, 2012.

PEREIRA, H. S. et al. Informações fenotípicas e marcadores microssatélites de QTL na escolha de populações segregantes de feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 5, p. 707–713, maio 2007.

PEREIRA, H. S. et al. Seleção fenotípica e assistida por marcadores moleculares de famílias de feijoeiro-comum com alta produtividade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 111, p. 1551–1558, nov. 2008.

POSSE, S. C. P. et al. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central brasileira: 2009-2010**. Vitória: Incaper, 2010.

RABOY, V. The future of crop breeding for nutritional quality. **SABRAO Journal of Breeding and Genetics**, Bancoc, v. 45, n. 1, p. 100–111, Mar. 2013.

RAMALHO, M. A. P. et al. **Aplicações da genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas**. Lavras: Editora da UFLA, 2012.

RESENDE, M. D. V.; DUARTE, J. B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Brasília, v. 37, n. 3, p. 182–194, set. 2007.

RIBEIRO, E. H. et al. Estimates of genetic parameters and selection of recombined inbred lines of common bean. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 5, p. 580–590, out. 2009.

RIBEIRO, N. D.; STORCK, L.; POERSCH, N. L. Classificação de lotes comerciais de feijão por meio da claridade do tegumento dos grãos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 2042–2045, out. 2008.

RIOS, A. O.; ABREU, C. M. O.; CORREA, A. D. Efeitos da época de colheita e do tempo de armazenamento no escurecimento do tegumento do feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 3, p. 550–558, jun. 2002.

RODRIGUES, J. D. A. et al. Standardization of imbibition time of common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 4, n. 4, p. 465–471, Dec. 2004.

SANTOS, M. F. **Mapeamento de QTLs em testecrosses de milho com diferentes testadores e níveis de acidez do solo**. 2008. 167 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SAS INSTITUTE. **Statistical analysis program**. Cary: NCSAS Institute, 2013.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa: Editora da UFV, 2004.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Haboken, v. 30, n. 3, p. 507–512, Sept. 1974.

SILVA, G. S. da. **Controle genético do escurecimento precoce de grãos de feijão tipo carioca**. 2007. 52 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

SILVA, G. S. da et al. Genetic control of early grain darkening of carioca common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 8, n. 4, p. 299–304, Dec. 2008.

SIQUEIRA, B. dos S. **Desenvolvimento dos fenômenos de escurecimento e endurecimento em feijão carioca**: aspectos bioquímicos e tecnológicos. 2013. 126 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

STROMBERG, L. D.; DUDLEY, J. W.; RUFENER, G. K. Comparing conventional early generation selection with molecular marker assisted selection. **Crop Science**, Madson, v. 34, n. 5, p. 1221–1225, Sept. 1994.

TORGA, P. P. et al. Seleção de famílias de feijoeiro baseada na produtividade, no tipo de grãos e informações de QTLs. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 95-100, fev. 2010.

VIEIRA, C. et al. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2. ed. Viçosa: Editora da UFV, 2005. p. 301–391.

VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão**. 2. ed. Viçosa: Editora da UFV, 2006.

XU, Y.; CROUCH, J. H. Marker-assisted selection in plant breeding□: from publications to practice. **Crop Science**, Madson, v. 48, n. 2, p. 391–407, Mar. 2008.