



JULIANA SOUZA VELOSO

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA DE CULTIVARES
DE FEIJÃO**

Lavras – MG

2014

JULIANA SOUZA VELOSO

DIVERGÊNCIA GENÉTICA DE CULTIVARES DE FEIJÃO

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

Prof. Dr. João Bosco dos Santos

Coorientador

Pesquisador Dr. Nelson da Silva Fonseca Júnior

LAVRAS - MG

2014

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

Veloso, Juliana Souza.

Divergência genética de cultivares de feijão / Juliana Souza

Veloso. – Lavras : UFLA, 2014.

81 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: João Bosco dos Santos.

Bibliografia.

1. *Phaseolus vulgaris*. 2. Diversidade genética. 3. Pureza genética. 4. Marcadores moleculares. 5. SSR. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.65223

JULIANA SOUZA VELOSO

DIVERGÊNCIA GENÉTICA DE CULTIVARES DE FEIJÃO

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 14 de agosto de 2014.

Prof^a. Dr^a. Dulcinéia de Carvalho UFLA

Prof^a. Dr^a. Elaine Aparecida de Souza UFLA

Prof. Dr. João Bosco dos Santos UFLA

Prof. Dr. João Bosco dos Santos

Orientador

Pesquisador Dr. Nelson da Silva Fonseca Júnior

Coorientador

LAVRAS - MG

2014

À Deus

OFEREÇO

*À toda minha família pelo amor e apoio incondicional.
Ao meu namorado Wylcker pelo amor e companheirismo.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo amor incondicional.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Biologia e ao Laboratório de Genética Molecular pela estrutura física e oportunidade de realizar o mestrado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao IAPAR, em especial ao pesquisador Dr. Nelson da Silva Fonseca Júnior, pela proposta de pesquisa, fornecimento de material e excelente orientação.

À Embrapa Arroz e Feijão e ao IAC pelo fornecimento de material.

Ao Professor Dr. João Bosco dos Santos pelos ensinamentos transmitidos durante os quatro anos e meio de orientação e pelas sugestões capazes de enriquecer a pesquisa.

Às professoras Dra. Dulcinéia de Carvalho e Dra. Elaine Aparecida de Souza pela disponibilidade em participarem da banca e pelas contribuições.

Aos professores, técnicos e monitores do programa de Pós-graduação em Genética e melhoramento de Plantas pelos conhecimentos transmitidos que possibilitaram a conclusão do mestrado.

Ao professor Luciano e aos técnicos do Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Ciência do Solo pela infraestrutura disponibilizada para a etapa de quantificação do DNA.

Ao Lucas pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao Lamartine que sempre foi mais que um profissional, foi também um amigo.

À minha família pelo apoio, paciência, conselhos e otimismo sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

Ao Wylcker, meu namorado, pela ajuda, incentivo, paciência, carinho e pelo amadurecimento que a nossa convivência proporcionou.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular pelo apoio, sugestões, conhecimentos transmitidos e pela capacidade de tornar diferente e divertido cada dia de trabalho.

Ao Igor, porque mesmo estando completamente atarefado, sempre encontra tempo para ajudar, ensinar e sugerir.

À Letícia pelos muitos conselhos e ensinamentos, mesmo à distância. Graças a ela aprendi muito mais do que genética.

Aos novos calouros, pela divertida convivência.

Aos meus amigos de Lavras, Sete Lagoas, Santana de Pirapama e Rio de Janeiro pela amizade que nem a distância foi capaz de alterar.

À Luzia e família pelo apoio, companhia e alegria contagiante.

Agradeço também a todos aqueles que, embora não citados, contribuíram para que fosse possível concluir mais essa etapa em minha vida.

RESUMO

O objetivo do trabalho foi estimar a divergência genética da cultivar Carioca utilizada por diferentes instituições, bem como de outras 16 cultivares de feijão-comum utilizadas na Rede Cooperativa Sul Brasileira de Pesquisa de Feijão, por meio de marcadores moleculares microssatélites associados à QTLs de interesse agrônômico. Foi preparado um bulk por cultivar contendo o DNA de 30 plantas, para que apenas os alelos com frequência superior a 15% em cada cultivar pudessem ser detectados. Os bulks foram utilizados em reações microssatélites com *primers* pré-selecionados com base na distribuição dos mesmos no mapa cromossômico do feijoeiro e na característica agrônômica marcada pelo loco em questão. As estimativas de divergência genética, bem como a caracterização da diversidade genética, endogamia, identificação do número ótimo de marcadores, avaliação da estrutura e variância populacional foram realizadas utilizando 22 SSRs polimórficos. Esses marcadores foram eficientes para estimar as relações genéticas entre e dentro das cultivares avaliadas, amplificando um total de 56 alelos. Observaram-se altos valores de heterozigosidade observada para plantas autógamas, o que pode indicar a ocorrência de mistura. A divergência genética entre as cultivares foi estimada utilizando o complemento do coeficiente de similaridade ponderado e esses valores foram utilizados para construção de um dendograma utilizando o método de agrupamento UPGMA. Houve divergência genética entre a cultivar Carioca fornecida pelas instituições; sendo as amostras da cultivar Carioca mais semelhantes entre elas do que em relação às demais cultivares; e a cultivar Carioca fornecida pelo IAPAR foi a mais divergente dentre as amostras de Carioca. Os menores valores de dissimilaridade genética foram encontrados entre a cultivar Carioca fornecida pela UFLA e pela EMBRAPA Arroz e Feijão.

A maior estimativa de dissimilaridade genética foi encontrada entre as cultivares CNFP 10104 e BRS MG Realce, pertencentes a tipos comerciais e grupos gênicos distintos, Preto/mesoamericano e Rajado/andino, respectivamente. A análise da estrutura populacional utilizando o software Structure separou as cultivares em dois grupos de maior similaridade genética. Entretanto, não houve formação de grupos definidos que separassem o tipo comercial Carioca do tipo comercial Preto em razão da origem das cultivares e dos *primers* utilizados não marcarem locos relacionados à cor da semente. Esse fato também pode ser observado pelo dendograma e pode indicar a presença de mistura. A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que as cultivares apresentaram maior variação genética entre cultivares do que dentro de cultivares ou entre os grupos Carioca e Preto. A variação genética dentro de cultivares foi elevada para uma planta autógama, o que pode indicar a ocorrência de mistura. A elevada divergência entre cultivares indica alto potencial de exploração da variabilidade genética pelo melhoramento. A baixa variabilidade entre grupos pode ser explicada pela genealogia das cultivares, pois muitas cultivares possuem genitores pertencentes a tipos comerciais ou grupos gênicos diferentes.

Palavra-chave: *Phaseolus vulgaris* Pureza Genética Mistura de Cultivares Marcadores Moleculares SSR.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the genetic divergence among Carioca cultivar used by different institutions, and others 16 common-beans cultivars from Rede Cooperativa Sul Brasileira de Pesquisa de Feijão, through microsatellite molecular markers associated to QTLs with agronomic importance. One bulk for cultivar was prepared, containing 30 plants DNA, thus only the alleles with frequency higher than 15% in each could be detected. The bulks produced were used in microsatellite reactions using primers previously selected, based on their distribution in the bean chromosomic map and on some identifying QTLs of agronomic traits. The estimates of genetic divergence, diversity index, endogamy index, ideal number of markers, population structure and analysis of molecular variance were obtained using 22 polymorphic SSRs. These markers were efficient to estimate the genetics relationship among and within the evaluated cultivars, amplifying a total of 56 alleles. High levels of heterozygosity for autogamous plants were observed, and can indicate the occurrence mixture of lines in each cultivar. The genetic divergence was evaluated using the weighted complement of similarity coefficient and these values were used to construct a dendrogram under the UPGMA grouping method. There was genetic divergence among the Carioca cultivar from four institutions, but the Carioca cultivar samples were more similar among themselves than others cultivars. The Carioca cultivar from IAPAR was the most divergent sample among the Carioca cultivar. The lower values of genetic dissimilarity observed were found between the Carioca cultivar from UFLA and EMBRAPA Arroz e Feijão, and the largest estimate between the cultivars CNFP 10104 and BRS MG Realce, belonging to different commercial types and genic groups, Black/Mesoamerican and Red Spotted/Andin, respectively. The analysis of the

populational structure divided the cultivars in two groups of higher genetic similarity. Though, there were no defined groups constructed that could separate the Carioca and Black commercial type because of the origin of the cultivars, and the primers used do not mark locus related to the color of the seed. The molecular variance analysis (AMOVA) shows the cultivars have more genetic variation among themselves than within or between groups Carioca and Black. The genetic variation within cultivars was higher for autogamous plant. This fact can indicate that there is higher potential to genetic variability exploration for breeding. The lower variability among groups can be explained by cultivars genealogy, because many of them have parents belonging the commercial types or different genic groups.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. Genetic Purity. Cultivates Moisture. Molecular Markers. SSR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Perfil eletroforético das 20 cultivares de *Phaseolus vulgaris* avaliadas com o *primer* PvBR25 (Tabela 3 e 4). Genótipo A1A1 para as cultivares 1, 3 e 4. Genótipo A2A2 para as cultivares 2, 5, 6, 7, 14, 15, 16, e 17. Genótipo A3A3 para as cultivares 8, 13 e 19. Genótipo A4A4 para as cultivares 12, 18 e 20. Genótipo A1A2 para as cultivares 9, 10 e 11 50
- Figura 2.** Frequências alélicas em cada um dos 22 locos avaliados. Os locos correspondem respectivamente às regiões marcadas pelos *primers* apresentados na tabela 3..... 51
- Figura 3.** Dendograma gerado pelo método UPGMA, por meio da matriz de dissimilaridade entre as 20 cultivares de feijão-comum avaliadas .. 55
- Figura 4.** Representação gráfica da divergência genética entre as cultivares tipo Carioca e Preto 40
- Figura 5.** Representação gráfica da divergência genética entre e dentro dos cultivares e entre os grupos Carioca e Preto..... 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cultivares de feijão utilizadas na caracterização molecular, instituição obtentora e tipo comercial	35
Tabela 2. Genealogia das cultivares de feijão utilizadas na caracterização molecular e instituição fornecedora.	36
Tabela 3. Nome do marcador, característica associada e fonte.....	39
Tabela 4. Nome do marcador, grupo de ligação e sequência de bases.....	40
Tabela 5. Índices de diversidade genética e endogamia das 20 cultivares de feijão avaliadas utilizando 22 locos SSRs	52
Tabela 6. Análise de reamostragem (<i>bootstrap</i>) para identificação do número ótimo de marcadores a partir da avaliação do estresse médio	56

LISTA DE SIGLAS

UFLA	Universidade Federal de Lavras
IAPAR	Instituto Agronômico do Paraná
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
SSR	Simple Sequence Repeat
QTL	Quantitative Trait Loci
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
DHE	Distinguibilidade, Heterogeneidade e Estabilidade
UPOV	União Internacional para Proteção de Cultivares
LPC	Lei de Proteção de Cultivares
PCR	Polimerase Chain Reaction
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
AFLP	Amplified Fragment Length Polimorphism
ISSR	Inter- SSR Amplification
STR	Short Tandem Repeats
ERiCC	EMBRAPA Rice Core Collection
VCU	Valor de Cultivo e Uso
ISTA	Associação Internacional para Testes em Sementes
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms
CNPAF	Cento Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão

CPACT	Centre for Process Analytics and Control Technology
EPAGRI	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
FEPAGRO	Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
DBI	Departamento de Biologia
DCS	Departamento de Ciência do Solo
Ne	Número de Alelos Efetivos
He	Heterozigosidade Esperada
Ho	Heterozigosidade Observada
PIC	Conteúdo de Informação Polimórfica
CCC	Coefficiente de Correlação Cofenética
AMOVA	Análise de Variância Molecular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 O Feijoeiro: Aspectos Botânicos, Origem e Importância da Cultura	20
2.2 Sistema Reprodutivo	22
2.3 A Cultivar Carioca	23
2.4 Pureza de Cultivares	26
2.5 Divergência Genética no Melhoramento de Plantas Autógamas	28
2.6 Divergência Genética e a Manutenção de Cultivares	31
2.7 Divergência Genética e Proteção de Cultivares em Plantas Autógamas 32	
2.8 Marcadores Moleculares	34
2.9 Marcadores Microssatélites	35
2.10 Marcadores Moleculares em Estudos de Divergência Genética	36
2.11 Marcadores Moleculares nos Testes DHE	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Material Vegetal	41
3.2 Local	43
3.3 Extração, Quantificação e Diluição do DNA	44
3.4 Preparo de Bulks, Reações de SSR e Análise de Polimorfismo	44
3.5 Análises Estatísticas	48
3.5.1 Frequência Alélica	49
3.5.2 Número de Alelos Efetivos	50
3.5.3 Heterozigosidade Esperada	50
3.5.4 Heterozigosidade Observada	50
3.5.5 Conteúdo Médio de Informação Polimórfica	51
3.5.6 Divergência Genética	51
3.5.7 Análise de Agrupamento	52
3.5.8 Coeficiente de Correlação Cofenética	53

3.5.9 Número Ótimo de Marcadores para Identificação de uma Cultivar.....	54
3.5.10 Estrutura Populacional.....	54
3.5.11 Análise de Variância Molecular (AMOVA).....	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1 Genotipagem	56
4.2 Caracterização da Diversidade Genética e Endogamia	56
4.3 Divergência Genética	59
4.4 Identificação do Número Ótimo de Marcadores	62
4.5 Estrutura Populacional	63
5 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das principais culturas produzidas e consumidas no Brasil. De acordo com informações do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2013), a produção média anual de feijão corresponde a 3,5 milhões de toneladas e pode-se esperar o crescimento no consumo interno em cerca de 1,2% ao ano no período de 2009/2010 a 2019/2020.

A importância do feijão extrapola o aspecto econômico devido a sua relevância como componente cultural e alimentício, podendo ser considerado, de acordo com Barbosa e Gonzaga (2012), um dos pilares da dieta brasileira. O feijão também se destaca como uma excelente opção nutricional para a população de baixa renda, pois, além das inúmeras propriedades nutricionais associadas a esse alimento, o baixo custo e a grande produção de grãos contribuem para torná-la acessível a toda população.

A produtividade da cultura é constantemente limitada pela pequena utilização de sementes certificadas pelos agricultores, principalmente quando o cultivo é desenvolvido por pequenos proprietários. Em geral as sementes das cultivares utilizadas são derivadas de cultivos anteriores sem os cuidados necessários quanto a pureza e a qualidade fitossanitária. Tais dificuldades podem ser reduzidas por meio do uso de sementes certificadas e cultivares melhoradas indicadas para cada região de cultivo. Assim, os programas de melhoramento genético de feijão têm se desenvolvido com objetivo de produzir cultivares de alta produtividade, resistentes a pragas e doenças e que possuam qualidade tecnológica, como tempo de cozimento adequado e qualidades nutricionais.

A avaliação da divergência genética entre cultivares é útil para o manuseio de bancos de germoplasma, em algumas atividades de melhoramento, como no retrocruzamento e também na identificação da divergência entre

cultivares e mesmo entre amostras de uma mesma cultivar utilizada em diferentes instituições.

Dentre as cultivares utilizadas em programas de melhoramento, a Carioca é muito utilizada. Em um estudo realizado por Veloso (2012) utilizando 96 genótipos da cultivar Carioca fornecida pelo Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), a autora constatou presença de indivíduos heterozigotos superior a 5%. Considerando que o feijoeiro é uma planta autógama, a autora concluiu que a cultivar Carioca utilizada pelo IAPAR não estava pura. Além disso, verificou que havia locos trialélicos; o que significa que a cultivar avaliada é composta por uma mistura de no mínimo três linhagens. Diante desse resultado, surgiu o interesse em avaliar a divergência genética entre a cultivar Carioca utilizada em outras instituições mantenedoras e usuárias (Universidade Federal de Lavras - UFLA, Embrapa Arroz e Feijão - CNPAF, Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR e Instituto Agronômico de Campinas - IAC), bem como de outras cultivares/linhagens de feijão integrantes do ensaio da Rede Cooperativa Sul Brasileira de Pesquisa de Feijão. Essa avaliação poderá informar sobre a divergência da Cultivar Carioca utilizada nessas instituições em relação a Carioca original obtida pelo IAC, sugerir procedimentos para manutenção de cultivares e mesmo indicar a necessidade de alterar a diversidade das cultivares em programas futuros de melhoramento. A avaliação da divergência genética entre as cultivares/linhagens poderá fornecer informações úteis para auxiliar na escolha de genitores para programas de melhoramento.

O objetivo do trabalho foi estimar a divergência genética da cultivar Carioca utilizada por diferentes instituições, bem como de outras cultivares utilizadas na Rede Cooperativa Sul Brasileira e Pesquisa de Feijão, por meio de marcadores microssatélites associados a QTLs de caracteres agronômicos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O Feijoeiro: Aspectos Botânicos, Origem e Importância da Cultura

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) é pertencente ao gênero *Phaseolus* L., subtribo Phaseolineae, tribo Phaseoleae, subfamília Papilionoideae, família Fabaceae, ordem Rosales, subclasse Archichlamydeae, classe Dicotyledoneae, sub-ramo Angiospermae, ramo Embryophytae e reino Plantae (VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2011).

O gênero *Phaseolus* possui cerca de 55 espécies, das quais apenas cinco são cultivadas: *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* e *P. polyanthus*. Essas espécies, embora apresentem importância comercial mais restrita que *P. vulgaris* L., possuem importância no melhoramento genético como fonte de resistência a estresses, podendo ser empregadas em cruzamentos interespecíficos com *P. vulgaris*; como é o caso da espécie *P. coccineus* que é bastante próxima do feijão-comum e produz híbridos interespecíficos viáveis. Assim como as demais espécies, *Phaseolus vulgaris* é diplóide ($2n=2x=22$) e possui 11 pares de cromossomos.

A maioria das cultivares possui ciclo vegetativo de 65 a 110 dias, sendo influenciado pela época do plantio. O surgimento das flores tem início, em geral, até 45 dias após a emergência das plântulas do solo e é variável de acordo com a precocidade da cultivar. A floração dura de 12 a 20 dias, aproximadamente (VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2011).

Segundo Debouck (1993), foram identificados três centros de diversidade genética do gênero *Phaseolus* nas Américas. O primeiro localiza-se na região central das Américas, principalmente no México, onde se originou a maioria das cultivares que produzem grãos pequenos semelhantes ao “Carioca”.

O segundo localiza-se no sul dos Andes, principalmente no norte da Argentina e no sul do Peru, onde se originaram as cultivares que produzem sementes grandes semelhantes ao Jalo. A terceira área de domesticação é considerada de menor importância que as anteriores e situa-se na Colômbia, região intermediária aos dois principais centros de diversidade.

Em virtude da grande variabilidade de caracteres agronômicos que o feijão-comum apresenta foi proposto seu agrupamento em seis raças ou 12 grupos gênicos, considerando um conjunto de caracteres morfológicos, adaptativos, evolucionários e moleculares (SINGH, 1993).

O feijão-comum pode ser considerado historicamente como um dos principais alimentos consumidos no Brasil (BARBOSA; GONZAGA, 2012). Sua importância extrapola o aspecto econômico devido a sua tradicionalidade na culinária brasileira e por esse mesmo motivo, é considerado um componente cultural.

O feijão é rico em nutrientes essenciais para a dieta humana. É fonte de ferro, proteínas, carboidratos, fibras e compostos vitamínicos e fenólicos que lhe conferem propriedades antioxidantes capazes de reduzir a incidência de doenças (POSSE et al., 2010).

Além disso, características técnicas, agronômicas e culturais destacam a cultura do feijão como uma excelente alternativa de exploração agrícola para pequenas propriedades (BARBOSA; GONZAGA, 2012). Isso aumenta a importância social da cultura devido ao grande contingente de mão-de-obra empregado durante todo o ciclo e a possibilidade de cultivo do feijão durante o ano todo e em todos os estados do território nacional. Além disso, o cultivo também é praticado por grandes agricultores que utilizam elevada tecnologia de produção. Esse fato credencia a cultura como uma excelente opção econômica (POSSE et al., 2010).

O Brasil destaca-se como sendo o maior produtor e consumidor mundial de feijão. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2014), em seu quinto levantamento sobre a produção de feijão 2013/2014, haverá aumento de 20,5% da área plantada na segunda safra e uma produção de 1485,7 mil toneladas, superior em 34,3% à registrada na safra anterior.

2.2 Sistema Reprodutivo

O feijoeiro é uma planta autógama devido à estrutura das flores possuírem anteras situadas no mesmo nível do estigma e envolvidas completamente pela quilha, possibilitando que os grãos de pólen caiam sobre o estigma por ocasião da deiscência das anteras (VIEIRA; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2011). Entretanto, é possível a migração de alelos característicos de uma população para outra da mesma espécie por meio de polinização cruzada (BORÉM, 1999; PINHEIRO; FARIA, 2005; RIEGER; MICHAELIS; GREEN, 1976).

A intensidade do processo migratório de alelos entre populações de uma mesma espécie é função da distância entre plantas, do ambiente e do genótipo das cultivares utilizadas. Isso porque as condições do meio podem influenciar o fenótipo dos indivíduos cultivados e a atividade dos insetos polinizadores do feijoeiro. Além disso, as cultivares podem apresentar diferenças no tipo de suas flores, na maior ou menor coincidência dos períodos de floração e na capacidade de dispersão dos gametas; e a distância entre as plantas está associada à facilidade do grão de pólen cair sobre o estigma de outra flor ocasionando a fecundação (BORÉM, 1999).

A variabilidade genética dentro de uma cultura é fator determinante para a adaptabilidade da mesma, desse modo, a ocorrência de polinização cruzada é considerada um fator de evolução (RIEGER; MICHAELIS; GREEN, 1976). Em

feijão, por ser uma planta autógama, a polinização cruzada geralmente ocorre devido a atividade de insetos da ordem Thysanoptera e abelhas que podem atuar como agentes polinizadores (BORÉM, 1999).

Para a maioria das espécies do gênero *Phaseolus* são observadas baixas taxas de cruzamento natural, inferiores a 1%, que geralmente são consideradas irrelevantes (PINHEIRO; RIEGER, 2005). Entretanto, dependendo dos genótipos utilizados e do ambiente de semeadura foram observadas altas taxas de cruzamento natural. Antunes, Costa e Oliveira (1973) registrou valores de 6 a 10% de cruzamento natural no município de Pelotas, RS.

No Brasil, a recomendação oficial de isolamento de um campo de produção de sementes de feijão é de 3 m, compatível com dados experimentais (VIEIRA; RAVA, 2000). Entretanto, Ferreira (2004) estimou a ocorrência de fluxo gênico entre as cultivares de feijão Talismã (receptor de pólen) e Diamante Negro (doador de pólen) na Estação Experimental de Coimbra, pertencente a Universidade Federal de Viçosa, e mostrou que a distância mínima para isolamento de um campo de produção de sementes de feijão poderia ser aumentada para 3,25 m.

2.3 A Cultivar Carioca

O feijão do tipo Carioca foi descoberto na década de 60 em uma fazenda no interior de São Paulo, no Pontal do Paranapanema. O proprietário da terra, agrônomo, identificou em sua propriedade uma planta viçosa, que apresentava grãos rajados, alto rendimento e com pronunciada resistência a doenças e a seca. O agrônomo “batizou” o feijão descoberto, de Carioca. Curiosamente, o nome Carioca fazia referência a uma raça de porcos comum na região de Ourinhos e, assim como o suíno, o grão apresentava aspecto malhado. O proprietário

encaminhou uma amostra dessas sementes ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), onde a cultivar foi pesquisada.

Inicialmente, no IAC, a cultivar foi semeada em campo de observação junto com outros materiais e, como apresentou alta capacidade produtiva, o instituto decidiu realizar estudos mais detalhados. Assim, a cultivar Carioca foi avaliada em ensaios de competição e em campos de caracterização de cultivares, mesmo as sementes apresentando grande diferença na coloração em relação aos feijões mais consumidos na época como o mulatinho, rosinha, roxinho e o bico-de-ouro, os quais possuíam apenas uma única cor, diferentemente do feijão Carioca, que apresentava listras e coloração creme.

A cultivar Carioca foi descrita por Almeida et al. (1971) como detentora de hábito de crescimento indeterminado, ciclo vegetativo de aproximadamente 90 dias, sementes muito pouco ou não pigmentadas por antocianina, foscas, com estrias de coloração havana, hilo branco com coloração creme ao redor e tamanho médio de 0,96 cm de comprimento, 0,60 cm de largura e 0,51 cm de espessura. Testes realizados no laboratório da Seção de Leguminosas classificaram as sementes da cultivar Carioca como tenras e de cozimento rápido.

Segundo Almeida et al. (1971) entre os anos de 1966 e 1969 foram realizados 22 ensaios de competição de cultivares incluindo a cultivar Carioca, sendo que em 15 desses ensaios, a cultivar apresentou produção superior às cultivares Bico-de-ouro e Rosinha G-2.

No ano agrícola de 1967/68, a cultivar foi avaliada em condições de campo quanto à resistência a importantes doenças do feijoeiro como a ferrugem e a antracnose, apresentando, de acordo com Almeida et al. (1971), maior resistência que as cultivares Bico-de-ouro e Rosinha G-2, principalmente em relação à ferrugem. Seis anos após seu lançamento, que ocorreu em 1975, a cultivar Carioca já era considerada o feijão mais semeado em todo o Brasil.

2.4 Pureza de Cultivares

O processo de produção de sementes de qualidade é longo e com alto custo agregado. Por meio desse é obtida a semente genética, que após sucessivas multiplicações origina a semente básica certificada. Considerando os prejuízos que a presença de sementes contaminantes pode causar, após sua multiplicação, faz-se necessário o estabelecimento de um rigoroso controle em todas as etapas desse processo. Segundo Chediak et al. (2007), para isso, é necessário ciência, tecnologia, conhecimento, experiência, bom gerenciamento e comprometimento com a qualidade.

Para a determinação da qualidade genética, relacionam-se os fatores associados à constituição genética da cultivar que atuam de modo a proporcionar à mesma, características próprias de homogeneidade e uniformidade, importantes para a manutenção da pureza e identidade genética (CHOER; BARBIERI; CASTRO, 2002). Assim, considera-se a pureza como um dos principais requisitos para a comercialização da semente, uma vez que a presença de indivíduos atípicos pode resultar em redução da produção, menor uniformidade e menor qualidade do produto final (BONOW et al., 2007; CHOER; BARBIERI; CASTRO, 2002; FERREIRA et al., 2011).

A pureza varietal é uma característica de um lote de sementes. Desse modo, a presença de sementes de outras cultivares em um lote resulta na perda de sua pureza varietal. Essa contaminação pode ocorrer por meio de misturas mecânicas, durante a semeadura, colheita, recepção, beneficiamento e armazenamento (BORÉM; CAIXETA, 2009; RAMOS, 2004). Segundo Ramos (2004), a contaminação varietal pode ser eficientemente controlada nas gerações subsequentes por meio de “rouging” e limpeza de máquinas e equipamentos. Entretanto, podem ocorrer falhas nesse controle que deverão ser detectadas por

meio de testes que avaliem a presença de mistura na amostra e a porcentagem de sua incidência. Um dos possíveis testes capazes de avaliar a ocorrência de mistura é a avaliação da divergência genética entre um lote de sementes recém produzido e uma amostra de sementes considerada padrão. O princípio da utilização de informações da divergência genética consiste na possibilidade de estimar o parentesco genético existente entre as amostras a partir do uso de marcadores moleculares.

A determinação da pureza genética, atributo de sementes individuais, pode ser considerada como complexa, uma vez que as contaminações provocadas principalmente por polinizações não controladas e mutações não provocam muitas alterações fenotípicas, dificultando que sua ocorrência seja percebida durante um programa de melhoramento. No caso de agricultores, a baixa utilização de cultivares e o uso de sementes das mais variadas origens são responsáveis pela maior parte da incidência de misturas. Em ambos os casos os testes de pureza, baseados em marcadores moleculares, são considerados eficientes para detectar a variação genética (RAMOS, 2004).

Como forma de assegurar aos produtores que as sementes adquiridas possuem alta qualidade, e garantir que os esforços realizados durante o processo de obtenção de uma cultivar melhorada gerem benefícios para a produção agrícola e para o mercado consumidor, a certificação de sementes é utilizada como agente de controle (BORÉM; CAIXETA, 2009; CHEDIAK et al., 2007; SCHUSTER et al., 2004). No Brasil, a produção de sementes certificadas ocorre em maior escala nas regiões Centro-Oeste (GO e MS), Sudeste (SP e MG), Sul (PR, SC, RS) e Nordeste (BA).

Devido à grande quantidade de sementes produzidas para fins de comercialização, a certificação dos lotes é feita por meio de amostragens. Para o feijão-comum, o peso mínimo da amostra a ser analisada é de 700 gramas, o que equivale à cerca de 2800 sementes (CHEDIAK et al., 2007). A partir da amostra,

são realizadas diversas análises, sendo que para verificação da qualidade, as análises mais importantes são as de pureza, vigor e germinação.

A análise de pureza permite determinar a composição da amostra e, conseqüentemente, do lote que ela representa. Desse modo, fornece a porcentagem de sementes puras, identifica a presença de outras sementes e a natureza do material inerte na amostra. A determinação da pureza de um lote de sementes com a finalidade de obter a certificação é, atualmente, realizada com base em descritores morfológicos associados às sementes, como tamanho médio, formato, brilho, coloração e aspecto do tegumento além de cor e formato do hilo, no caso de fabáceas (BONOW et al., 2007; BORÉM; CAIXETA, 2009). Entretanto, muitas dessas características podem estar sujeitas à influência ambiental e, em alguns casos, lotes de sementes sem mistura varietal e de boa qualidade podem ser descartados por possuírem sementes com alguma variação provocada pelo ambiente. Além disso, diferenças genéticas geralmente ocorrem dentro das cultivares, embora não estejam representadas na variação fenotípica das sementes. Por esse motivo, diversos trabalhos têm questionado a eficiência da utilização dessa metodologia na discriminação de cultivares (BONOW et al., 2007; FERREIRA et al., 2011; RAMOS, 2004; RAMOS et al., 2006). Por essa mesma razão, vários trabalhos apontam a utilização de marcadores moleculares como método eficiente para avaliar a pureza (CHEDIAK et al., 2007; CHOER; BARBIERI; CASTRO, 2002; JESUS et al., 2006; RAMOS, 2004; RAMOS et al., 2006; SCHUSTER et al., 2004).

2.5 Divergência Genética no Melhoramento de Plantas Autógamas

Plantas autógamas são aquelas cuja frequência de polinização cruzada é inferior a 5% (RAMALHO et al., 2012). Pelo fato dessa frequência ser baixa, espera-se que a maior parte dos locos dessas plantas esteja em homozigose. Esse

conhecimento é importante na escolha do processo de melhoramento a ser utilizado e no entendimento de todas as etapas desse processo.

O planejamento cuidadoso do programa de melhoramento envolve o gerenciamento adequado dos recursos humanos e financeiros, infraestrutura para testes e avaliações, escolha adequada do método de melhoramento a ser empregado e o germoplasma a ser utilizado. Segundo Borém e Miranda (2009), a escolha inadequada do germoplasma talvez seja o fator mais crítico e limitante no programa de melhoramento e, mesmo que possa ser substituído ao longo do programa, acarretará em grande perda de tempo e recursos.

Geralmente, os programas de melhoramento de plantas autógamas objetivam reunir em um único indivíduo –linhagem– os alelos desejáveis que se encontram em linhagens distintas. Para isso, segundo Fehr (1987) e Ramalho (1997), a melhor alternativa é o uso da hibridação. Para a aplicação desse método, existem três etapas fundamentais: a escolha dos genitores, a obtenção da população segregante e a escolha do método de condução dessa população.

O número de combinações possíveis entre genitores, em qualquer espécie, é infinito, sendo impossível a obtenção de todas as combinações. Por esse motivo, os genitores devem ser criteriosamente escolhidos e a seleção deve ser concentrada apenas nas combinações mais promissoras. No caso do caráter de interesse ser de herança quantitativa, como por exemplo, produtividade de grãos, a escolha deve proporcionar obter uma população segregante que possua média alta e grande variabilidade para a característica sob seleção.

Os métodos para escolha de genitores visando o melhoramento de um caráter quantitativo foram classificados em duas categorias por Baenzinger e Peterson (1991): os que utilizam apenas informações dos pais e os que utilizam o desempenho de suas progênes.

Entre as alternativas para escolha de genitores utilizando o seu próprio desempenho, podem ser empregadas informações da média juntamente com informações da distância genética existente entre os mesmos. A escolha baseada na média tem como inconveniente a impossibilidade de antever se a variabilidade genética existente entre as progênes será suficiente para obter sucesso com a seleção. Uma medida que pode ser associada à média visando minimizar esse inconveniente é o coeficiente de parentesco, que é obtido por meio da genealogia dos genitores e tem como princípio o fato de que quanto mais aparentados os genitores forem, maior deve ser o número de locos em comum e menor a divergência genética entre os parentais. Entretanto, há a possibilidade dos genitores serem aparentados e se complementarem para a característica de interesse ou não aparentados e serem pouco divergentes.

Com a finalidade de se obter novas cultivares, a metodologia mais utilizada é a realização de cruzamentos dialélicos para verificar a capacidade geral e específica de combinação dos possíveis genitores. É importante mencionar que a eficiência da escolha de genitores por meio dessa metodologia pode ser aumentada se forem utilizadas simultaneamente informações de divergência genética. É necessário considerar, contudo, que somente a divergência genética não informa eficientemente os melhores genitores (MACHADO et al., 2002). Assim, a divergência pode auxiliar a decidir entre genitores previamente selecionados, utilizando-se os mais divergentes, uma vez que, segundo Dorneles et al. (2011) o conhecimento da divergência genética entre cultivares permite a identificação de genótipos muito similares dentre os materiais genéticos utilizados em cruzamentos.

2.6 Divergência Genética e a Manutenção de Cultivares

O melhoramento genético do feijoeiro visando obter uma nova cultivar ocorre em diferentes etapas que vão desde a escolha de genitores até a seleção dos genótipos em ensaios de competição. Após a realização dos cruzamentos, as populações segregantes são conduzidas de modo a gerar progênies que são avaliadas em vários ambientes. Aquelas que sobressaem são recomendadas como novas cultivares.

Espera-se que as cultivares a serem recomendadas sejam puras para garantir homogeneidade da produção. Entretanto, um fato que geralmente ocorre com o feijão, é que as progênies selecionadas geralmente são constituídas por uma mistura de linhas puras. Isso resulta na produção de cultivares que apresentam alguma heterogeneidade genética. Outros fatores capazes de aumentar a heterogeneidade genética são a ocorrência de cruzamentos naturais entre linhagens cultivadas com isolamento insuficiente e a ocorrência de mistura mecânica entre sementes de diferentes cultivares durante o processo de produção de sementes. Assim, é possível que uma mesma cultivar multiplicada por diferentes instituições mantenedoras e usuárias apresente, após muitos anos, diferença genética em relação a cultivar original. Nesse contexto, o conhecimento da divergência genética pode ser uma excelente ferramenta para detectar essa divergência além de possibilitar a sugestão de procedimentos para manutenção da cultivar.

Informações da divergência genética entre cultivares também são de grande importância para o gerenciamento de bancos de germoplasma. Elas permitem identificar erros na identificação dos acessos como homonímia e sinonímia, por exemplo. A correta identificação das coleções possibilita que a transferência de resultados e recomendações entre diferentes programas de

melhoramento sejam realizadas corretamente, além de possibilitar a redução do tempo, espaço e recursos necessários para a conservação e avaliação do potencial genético dos acessos, uma vez que acessos sinônimos podem ser descartados (FALEIRO, 2007; SCHAFER; BASTIANEL; DORNELLES, 2004).

2.7 Divergência Genética e Proteção de Cultivares em Plantas Autógamas

A obtenção de cultivares que atendam as necessidades dos agricultores e dos produtores é um processo demorado e caro. No caso de plantas autógamas, ainda há o inconveniente de o produtor poder utilizar parte dos grãos oriundos em uma safra como sementes na semeadura da safra seguinte, resultando em desestímulo para o investimento de programas de melhoramento de autógamas. Por essa razão, foi criada, em 1961, a União Internacional para a Proteção de Cultivares (UPOV), com a finalidade de determinar as normas comuns para o reconhecimento e a proteção da propriedade intelectual dos obtentores de novas variedades vegetais. A criação da UPOV permitiu que empresas públicas e privadas se beneficiassem com a produção de cultivares melhoradas. Isso resultou na sustentabilidade e continuidade de programas de melhoramento, bem como o subsequente lançamento de diversos cultivares de interesse para o agronegócio (CARVALHO; BIANCHETTI; REIFSCHNEIDER, 2009; KUMAR et al., 2001).

O Brasil aderiu oficialmente à UPOV em 23 de maio de 1999, ainda optando pela convenção de 1978, a qual serviu de base para a elaboração da Lei de Proteção de Cultivares (LPC). A LPC tem como objetivos a proteção de novas cultivares (ou cultivares essencialmente derivadas), produzidas nos programas de melhoramento genético conduzidos por instituições de pesquisa públicas e privadas, garantindo os direitos da instituição que a produziu

(VIEIRA, 2004), facilitar o intercâmbio de material genético, permitindo a importação de sementes comerciais e assegurar que o Brasil também possa exportar esse tipo de material.

A proteção recai sobre o material de reprodução das plantas (semente, tubérculos, estacas, etc.) e seu período de proteção é de 15 anos. Após o término do período de proteção, a cultivar entra em domínio público, podendo ser livremente utilizada (CASTRO, 2006).

Os requisitos necessários para a proteção de cultivares de plantas autógamias são: ser produto de melhoramento genético; ser uma espécie passível de proteção; não ter sido comercializada no exterior há mais de quatro anos; não ter sido comercializada no Brasil há mais de um ano; e ser distinta, homogênea e estável (AVIANI et al., 2008; CARVALHO; BIANCHETTI; REIFSCHNEIDER, 2009).

Com a finalidade de assegurar que uma cultivar é distinta de outras, homogênea e estável, o teste DHE (Distinguibilidade, Homogeneidade e Estabilidade) constitui-se como um requisito para a concessão do título de propriedade intelectual às cultivares candidatas à proteção. No Brasil, o sistema de proteção de cultivares permite que os próprios melhoristas conduzam os testes DHE de acordo com os princípios contidos nas diretrizes publicadas para cada espécie (BRASIL, 2011).

Oficialmente, os testes DHE são baseados principalmente em descritores morfológicos (como forma complementar, são utilizados descritores fisiológicos, bioquímicos e moleculares), não incluindo características quantitativas, entretanto, essas variáveis são requeridas no pedido de registro da cultivar. A caracterização morfoagronômica dos testes DHE baseia-se em caracteres botânicos descritores de alta herdabilidade, facilmente detectáveis. Entretanto, a identificação de um acesso com base apenas em características fenotípicas, não oferece total segurança devido à insuficiência ou escassez de

polimorfismo, influência ambiental, necessidade de grande espaço físico para avaliar o material, dependência do estágio de desenvolvimento da planta e do tipo de herança dos caracteres (COSTA et al., 2009). Assim, apesar da grande importância das características morfológicas para observação da divergência entre os genótipos, esses descritores possuem limitações, podendo não ser suficientes para diferenciar cultivares aparentadas ou que possuem a mesma genealogia, como no caso de linhas recombinadas (BECHER et al., 2000; PRIOLLI et al., 2002). Nesse contexto, o uso de informações obtidas em estudos moleculares constitui-se como uma maneira alternativa para avaliar a divergência genética entre linhagens podendo auxiliar na diferenciação de cultivares proporcionando rapidez, eficiência e custo reduzido.

2.8 Marcadores Moleculares

Marcadores moleculares são ferramentas utilizadas para detectar variações no genoma, auxiliando a análise genética e permitindo a seleção indireta de caracteres desejáveis em programas de melhoramento de plantas (BORÉM; CAIXETA, 2009). A análise da informação obtida por meio de marcadores moleculares baseia-se na presença ou ausência dos mesmos nas amostras. Assim, de acordo com Ferreira e Grattapaglia (1998), sempre que um dado marcador for identificado em diferentes amostras, os indivíduos avaliados possuem semelhança genética.

A utilização de marcadores de DNA no estudo genético de plantas ocorre devido à possibilidade de se obter uma quantidade suficiente de marcadores para detectar variações em todos os alelos de todos os genes de uma espécie (RAMALHO et al., 2012). Além disso, a confiabilidade, praticidade operacional e informatividade genética, associadas à técnica, estimulam ainda mais o seu uso por parte dos pesquisadores.

A escolha do marcador molecular mais indicado ao estudo deve considerar a quantidade de informação acessada por meio deles. De acordo com Faleiro (2007), marcadores moleculares multilocos como o microssatélite, por exemplo, são os mais apropriados para estudos de identidade genética e estudos de variabilidade dentro de uma mesma espécie.

Dentre as técnicas disponíveis, as baseadas em PCR (*Polimerase Chain Reaction*) têm como vantagens em relação a outros métodos, a rapidez e o uso de reduzida quantidade de DNA. Dessa técnica derivam-se, principalmente os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e SSR (*Simple Sequence Repeats*). Desses, o RAPD, SSR e ISSR (*Inter-SSR amplification*) são, atualmente, os mais utilizados em análises de divergência genética.

2.9 Marcadores Microssatélites

Os microssatélites, também chamados de SSR ou STR (*Short Tandem Repeats*), são sequências de DNA repetitivo cujas repetições de mono-, tri-, tetra-, penta- ou até mesmo hexanucleotídeos se repetem de 10 a 60 vezes (SILVA, 2003). Essas sequências são distribuídas ao longo do genoma de todos os organismos e podem ocorrer em regiões codificantes e em regiões não codificantes, sendo mais comuns nas codantes (RAMALHO et al., 2012).

O surgimento e a evolução das sequências de SSR estão relacionados à ocorrência de aberrações cromossômicas como inserção ou substituição de bases, escorregamento ou pareamento desalinhado e permuta desigual (SILVA, 2003).

As regiões de microssatélite são flanqueadas por sequências altamente conservadas entre indivíduos de uma mesma espécie possibilitando a construção

de *primers* e sua utilização em PCR de modo que possibilite a amplificação dessas sequências repetitivas.

A separação de bandas de DNA polimórficas pode ser feita em gel de eletroforese, utilizando poliacrilamida ou agarose e a visualização das mesmas, realizadas por meio da coloração com brometo de etídio, nitrato de prata ou vários outros intercalantes de DNA menos nocivos, tais como gelred e Sybr-green (HONGWEI et al., 2009; KAZANIDOU et al., 2009; SPIEGELAERE et al., 2008).

A vantagem na utilização de marcadores SSR consiste no fato de serem multialélicos, possuírem herança codominante, ampla distribuição no genoma, alta taxa de polimorfismo, necessitarem da utilização de pequena quantidade de DNA dos indivíduos sob análise, alta reprodutibilidade por meio de PCR e não sofrerem influência ambiental (ANDRADE et al., 2013; MATA, 2010; SCHUSTER et al., 2004; SOUZA, 2012). Além disso, por ser codominante, é possível obter maior quantidade de informação genética, se comparado a marcadores dominantes (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011). Por esse motivo, são bastante utilizados para avaliação de pureza em sementes, mapeamento genético, teste de paternidade, identificação de QTLs, seleção assistida e estudos de divergência genética (CHEDIAK et al., 2007; JESUS et al., 2006; RAMOS et al., 2006; SHUSTER et al., 2004). A principal limitação no uso desses marcadores, segundo Silva (2003), consiste na confecção dos *primers* pois, é um processo demorado, trabalhoso e de alto custo. Mas essa desvantagem é compensada pela facilidade, eficiência e rapidez na utilização do marcador por meio da técnica PCR. No caso do feijão, já existem muitos *primers* disponíveis, bem como diversos QTLs já identificados por esses marcadores, facilitando o seu uso.

2.10 Marcadores Moleculares em Estudos de Divergência Genética

O estudo da divergência genética consiste na análise da variação entre populações, grupos, ou indivíduos de um grupo por meio da utilização de um método específico ou de uma combinação de métodos (BORÉM; CAIXETA, 2009). A avaliação da divergência genética foi por muito tempo realizada a partir de informações fenotípicas, como caracteres morfológicos e/ou de desempenho agrônômico (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011). Os dados podem ser obtidos por meio de análise bioquímica, citológica e, ainda mais recentemente, genotípica que é obtida com uso de marcadores de DNA e possibilita a obtenção de informações mais precisas e sem influência ambiental.

Várias pesquisas têm sido realizadas utilizando marcadores moleculares para estimar a divergência genética de coleções ou populações (AGUILERA et al., 2011; BORBA et al., 2009; BRONDANI et al., 2006; CARDOSO et al., 2002; MÉTAIS et al., 2000; NADERI et al., 2009; PAPA et al., 2005; PINHEIRO et al., 2012; RODRIGUES; ALCÂNTARA NETO; SCHUSTER, 2008; SCHAFER; BASTIANEL; DORNELLES, 2004; SCHUSTER et al., 2009; SOUZA et al., 2008; VAZ et al., 2009; VIEIRA et al., 2009; VIEIRA; NODARI, 2007).

Borba et al. (2009) determinaram a estrutura genética de 242 acessos da Coleção Núcleo de Arroz da Embrapa (ERiCC) para criar uma coleção mini-núcleo e desenvolver um painel multiplex de fluorescência com SSRs. Este estudo indicou que há alta variabilidade genética nos acessos de arroz presentes no germoplasma mundial podendo ser prontamente utilizado em programas de pré-melhoramento de arroz. Brondani et al. (2006) avaliaram por meio de marcadores SSR a variabilidade genética de genótipos de arroz que participaram de ensaios de VCU da Embrapa. Este estudo foi realizado com o objetivo de caracterizar o potencial das linhas em gerar populações que poderiam ser exploradas em futuros programas de melhoramento partindo do pressuposto de

que o valor de uma população como fonte de novas linhas depende, além de outros parâmetros, da magnitude da variabilidade genética existente entre os tratamentos de interesse. Vieira et al. (2009) utilizou marcadores SSR com a finalidade de determinar se há variabilidade significativa entre cultivares elite presentes no germoplasma brasileiro de soja, pois segundo Alcântara Neto (2001) e Miranda et al. (2007), o fato das cultivares de soja existentes no Brasil serem originárias de poucos ancestrais poderia implicar na ocorrência de baixa variabilidade genética entre elas. Entretanto, o estudo realizado mostrou que mesmo sob essas condições há variabilidade genética significativa entre as cultivares elite de soja avaliadas. Shuster et al. (2009) caracterizaram trinta e seis cultivares de trigo recomendadas para várias regiões do Brasil e avaliaram a distância genética entre eles usando marcadores microssatélites. Esse trabalho mostrou que a informatividade proveniente do uso de SSR pode ser utilizada para a avaliação do germoplasma de trigo usado no Brasil, bem como na proteção da propriedade intelectual. Cardoso et al. (2014) caracterizaram cultivares comerciais de feijão desenvolvidas em várias instituições de pesquisa usando marcadores microssatélites com objetivo de determinar o grau de diversidade genética entre as amostras analisadas e auxiliar na proteção dos direitos de propriedade intelectual dos melhoristas. Além disso, esse trabalho evidenciou que a variabilidade genética do feijão Carioca e linhas de feijão do tipo Preto apresentou redução. Cardoso et al. (2013) estimou a divergência genética de 172 linhas e cultivares de feijão-comum utilizadas em cinco testes de Valor de Cultivo e Uso (VCU) conduzidos pelo programa de melhoramento da Embrapa Arroz e Feijão para determinar o potencial de combinação para gerar genótipos superiores. Nesse trabalho a autora concluiu que a estimativa de divergência entre cultivares tem grande potencial para ser utilizado em programas de melhoramento de feijão.

2.11 Marcadores Moleculares nos Testes DHE

Conforme comentado, a avaliação de genótipos por meio de caracteres qualitativos, descritores, sofre grande influência ambiental e depende do estágio de desenvolvimento da planta e do tipo de herança dos caracteres (COSTA et al., 2009). A caracterização molecular de genótipos, por meio de marcadores de DNA, possibilita avaliar a pureza genética de sementes permitindo a identificação de mistura, além de diferenciar cultivares geneticamente diferentes, mas que possuem a mesma genealogia. Portanto, a caracterização molecular pode auxiliar na realização do teste DHE, agilizando o processo de certificação de cultivares e diminuindo o tempo entre a obtenção e a comercialização dos cultivares. Por esse motivo, a Associação Internacional para Testes em Sementes (ISTA), que é responsável pela padronização dos testes e técnicas para a caracterização de cultivares, e cujas normas são adotadas pela UPOV, já considera os usos dos marcadores microssatélite, SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) para a caracterização de cultivares (INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION - ISTA, 2009).

No Brasil, as técnicas moleculares vêm sendo utilizadas na proteção de cultivares apenas como ferramenta auxiliar na análise de processos, como, por exemplo, na comprovação da origem genética da cultivar (teste de paternidade), na identificação de cultivares em caso de uso indevido e em atividades de fiscalização (VIANA et al., 2011).

Uma das premissas para o uso de marcadores moleculares para fins de identificação e proteção de cultivares é a realização de ensaios nos quais exista um mínimo de reprodutibilidade dos resultados. Além disso, de acordo com Viana et al., 2011 é necessário que os *primers* ou iniciadores empregados por todos os laboratórios nas reações de PCR sejam sintetizados por um único

fornecedor confiável, reduzindo a possibilidade de gerarem perfis de DNA divergentes.

Alguns trabalhos, nos quais os marcadores moleculares foram utilizados para complementar os testes de DHE, já foram publicados. Entre eles, Bernet et al. (2003) utilizaram os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic*) em novas cultivares de abóboras, para fins de proteção. Garcia et al. (2007) selecionaram 10 locos de SSR indicados para uso complementar em testes de rotina para identificação de cultivares brasileiras de soja.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Os genótipos utilizados no presente estudo consistiram em 20 cultivares de feijão, amplamente utilizadas no programa de melhoramento da rede Sul Brasileira pelo Instituto Agrônomo do Paraná (informação pessoal do pesquisador, Dr. Nelson da Silva Fonseca Júnior) (Tabelas 1 e 2).

Devido ao fato da cultivar Carioca utilizada pelo Instituto Agrônomo do Paraná ter sido constatada como impura (VELOSO et al., 2008), no presente trabalho avaliou-se a cultivar Carioca utilizada em quatro diferentes instituições de pesquisa: IAPAR, UFLA, IAC e Embrapa Arroz e Feijão (CNPAP) para verificar o possível distanciamento genético em relação a cultivar originalmente obtida pelo IAC. Por essa razão, neste trabalho, a cultivar Carioca de cada instituição foi tratada como sendo uma cultivar diferente.

Tabela 1. Cultivares de feijão utilizadas na caracterização molecular, instituição obtentora e tipo comercial.

Cultivar	Instituição Obtentora	Tipo Comercial
CNFP10104	CNPAP	Preto
BRS MG Realce	CNPAP	Rajado
Pérola	CNPAP	Carioca
BRS Campeiro	CNPAP	Preto
TB 02-07	CPACT	Preto
TB 02-24	CPACT	Vermelho
CHC 01-175	EPAGRI	Carioca
CHP 98-66-20	EPAGRI	Preto

SM 1107	FEPAGRO	Preto
SM 1810	FEPAGRO	Preto
P5-4-3-1	IAC	Carioca
PR-14-2-3-2	IAC	Preto
LP 07-80	IAPAR	Carioca
LP 08-90	IAPAR	Preto
IPR Tangará	IAPAR	Carioca
Uirapuru	IAPAR	Preto
Carioca	IAPAR	Carioca
Carioca	IAC	Carioca
Carioca	UFLA	Carioca
Carioca	CNPAF	Carioca

Legenda: CNPAF é Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão; CPACT é Centre for Process Analytics and Control Technology; EPAGRI é Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina; FEPAGRO é Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária; IAC é Instituto Agrônômico de Campinas; IAPAR é Instituto Agrônômico do Paraná; UFLA é Universidade Federal de Lavras.

Tabela 2. Genealogia das cultivares de feijão utilizadas na caracterização molecular e instituição fornecedora.

Cultivar	Genealogia da Cultivar	Instituição Fornecedora
CNFP 10104**	FT85-113 / POT51	IAPAR
BRSMG	PR 95105259 / PR 93201472	IAPAR
Realce**		
Pérola**	Seleção na cultivar Aporeé	IAPAR
BRS Campeiro**	Programa de indução de mutação na cultivar Corrente por radiação gama	IAPAR
TB 02-07**	BRS Expedito x A55	IAPAR
TB 02-24**	Seleção de planta individual em cultivar	IAPAR

	crioula	
CHC 01-175**	BRS Campeiro X IAC Eté	IAPAR
CHP 98-66-20**	(Ci 9661 X FT Nobre) + (Ci 9661 X Ci 667/2V)	IAPAR
SM 1107**	(IPR Uirapuru) x (BR Fepagro 44 Guapo Brillhante)	IAPAR
SM 1810**	(IPR Uirapuru) x (BR Fepagro 44 Guapo Brillhante)	IAPAR
P5-4-3-1**	{[IAC Carioca Eté x (IAC Carioca Eté x Carioca Precoce)] x Preto 60 Dias}	IAPAR
PR-14-2-3-2**	BRS Supremo x IAC Tunã	IAPAR
LP 07-80**	{[CNF86-9 x (IAPAR14x Sel. Carioca 80) x BAT 93] x (Sel Carioca 99 x Great North Nebraska 1 sel 27) x Seleção Aruana} x {(Sel. Carioca 99 x Great North Nebraska 1 sel 27) x (Rai 46 x (Moruna x G. N. 1 sel 27) x Iguaçu) X BAT 93] x [(IAPAR 14 x IAPAR 31) x BAT 93] x Sel Carioca 99 x Great North Nebraska 1 sel 27}	IAPAR
LP 08-90**	Desconhecida	IAPAR
IPR Tangará**	(LP 95-92 que descende de IAPAR 31) X (Pérola)	IAPAR
Uirapuru**	BAC29/PR1711/3/NEP2/2/PUEBLA 173/ICAPIJAO	IAPAR
Carioca*	Seleção dentro da lavoura de produtores	IAPAR
Carioca*	Seleção dentro da lavoura de produtores	IAC
Carioca*	Seleção dentro da lavoura de produtores	UFLA
Carioca*	Seleção dentro da lavoura de produtores	EMBRAPA

Fonte: *Cardoso (2009); ** Informações do melhorista do IAPAR Dr. Nelson da Silva Fonseca Júnior.

3.2 Local

A semeadura para obtenção do DNA foi realizada na casa de vegetação

do Departamento de Biologia, Setor de Genética, da Universidade Federal de Lavras. Foram semeadas 60 sementes de cada cultivar em bandejas de isopor com o substrato Plantmax® e conduzidas em casa de vegetação por 21 dias, período necessário ao desenvolvimento das folhas primárias e da primeira trifoliolada.

A extração do DNA genômico, bem como, as reações de PCR, utilizando marcadores SSR foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular, do Departamento de Biologia (DBI), na UFLA.

As quantificações do DNA foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Ciência do Solo (DCS), na UFLA.

3.3 Extração, Quantificação e Diluição do DNA

Foram coletadas no período da manhã aproximadamente 2g de folhas jovens de 30 plantas de cada cultivar. O material obtido foi acondicionado em gelo a fim de evitar a oxidação. Após a coleta, o material foi levado ao Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), onde se seguiu a extração do DNA de acordo com os procedimentos utilizados por Pereira et al. (2007).

Após extraído, o DNA foi reidratado em tampão TE e quantificado em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000. O material quantificado foi diluído em TE para a concentração de 10ng/μL para ser utilizado nas reações de PCR.

3.4 Preparo de Bulks, Reações de SSR e Análise de Polimorfismo

Com o DNA extraído foi preparado um bulk para cada cultivar. O número de genótipos constituintes dos bulks foi definido experimentalmente por Schuster et al. (2004) em soja. Os autores demonstraram que até a proporção de

1:7 (um genótipo contaminante para sete genótipos puros) em uma mistura de amostras de DNA, é possível identificar, sem dificuldades, alelos diferentes presentes no bulk. Os bulks foram preparados com o DNA de 30 plantas de cada cultivar visando identificar alelos SSR com frequência de no mínimo 15% (SCHUSTER et al., 2004). As misturas que porventura foram observadas em relação ao aspecto da semente de cada cultivar foram eliminadas.

Os pares de *primer* utilizados foram selecionados com base na distribuição dos mesmos no mapa cromossômico do feijoeiro e na característica associada ao loco marcado pelo *primer* em questão (Tabelas 3 e 4). A finalidade dessa escolha foi para que a análise da divergência genética existente entre as cultivares contemplasse informações dos diferentes grupos de ligação que constituem o genoma do feijoeiro, aumentando assim a eficiência da estimativa da divergência entre elas. A seleção de *primers* associados à QTLs de interesse teve como objetivo direcionar a caracterização da divergência genética de modo que estivesse relacionada aos caracteres que são de interesse aos programas de melhoramento.

Tabela 3. Nome do marcador, característica associada e fonte.

Nome do Marcador	Característica	Fonte
	Associada	
ATA6	Mofo-branco	Antonio (2008)
ATA7	Mofo-branco	Antonio (2008)
BM 141	Mancha angular	Teixeira et al. (2005)
BM 143	Mancha Angular	Teixeira et al. (2005)
BM 154	Produtividade	Rodrigues e Santos (2006)
BM 170		
BM184	Mofo-branco, tempo de florescimento, peso de 100 sementes	Blair, Iriarte e Beebe (2006) e Soule et al. (2011)
BM 185		Cabral et al. (2011)
BM187	Mofo-branco, tempo de florescimento, número de	Blair, Iriarte e Beebe (2006)

BM201	sementes por planta	
BMc94	Mancha angular	Teixeira et al. (2005)
PvBR13	Mofo-branco	Lara et al. (2014)
PvBR35	Escurecimento de Grãos	Couto et al. (2010)
PV141	Tempo de Cozimento	Nhanengue (2014)
PvBR005		
PvBR025		
PVESTBR_98	Escurecimento de Grãos	Couto et al. (2010)
PVESTBR_42	Mofo-branco	Antonio (2008)
PVESTBR_204	Mofo-branco	Lara et al. (2014)
PVM02TC116	Escurecimento de Grãos, Mofo-branco	Couto et al. (2010)
PVM04 TC323	Crestamento	Couto et al. (2010)
X74919	Produtividade	Cabral et al. (2011) e Pereira et al. (2007)

Tabela 4. Nome do marcador, grupo de ligação e sequência de bases.

Nome do Marcador	Grupo de Ligação	Sequência de Pares de Base
ATA6	B11	F TGATTTGTCTAACACTTCAC R GGAGATGATTTGCATGTAG
ATA7	B02	F ATAAATCTATTGAGTTCTAG R AACAAGTCAATAATCTAAAG
BM 141	B09	F TGAGGAGGAACAATG GTG GC R CTCCACAACCACACGCACC
BM 143	B02	F GGGAAATGAACAGAGGAA A R ATGTTGGGAAC TTTTAGTGTG
BM 154	B09	F TCTTGCGACCGAGCTTCTCC R CTGAATCTGGGAACGATGACCAG
BM 170	B06	F AGCCAGGTGCAAGACCTTAG R AGATAGGGAGCTGGTGGTAGC
BM184	B11	F AGTGCTCTATCAAGATGTGTG R ACATAATCAATGGGTCACTG

BM 185	B07	F AAGGAGGTTTCTACCTAATTCC R AAAGCAGGGATGTAGTTGC
BM187	B06	F TTTCTCCAACCTCACTCCTTTCC R TGTGTTTGTGTTCCGAATTATGA
BM201	B07	F TGGTGCTACAGACTTGATGG R TGTCACCTCTCTCCTCCAAT
BMc94		F GCACTATCACCGCCTTCTTC R AGTGAGACGGCACAGAGAGA
PvBR13	B01	F TGAGAAAGTTGATGGGATTG R ACGCTGTTGAAGGCTCTAC
PvBR35		F TCTACGCGTTCCTCTGTCT R AGTGGATGTGTGGGAAAAGC
PV141	B09	F TGAGGAGGAACAATGGTGGC R CTCACAAACCACAACGCACC
PvBR005	B01	F ATTAGACGCTGATGACAGAG R AGCAGAATCCTTTGAGTGTG
PvBR025	B09	F GAGCTTCTCCGTCCTGTGT R CGAACTGAATCAGAAAGGAA
PVESTBR_98		F TCTTTAACAGCGCACACACTTT R GTTGAAACGACAGTAGGAACC
PVESTBR_42	B02	F CGTGTTGGAGAGAGAGTG R GTTCCAAAGGGATTATTACTG
PVESTBR_204		F AAGCGGTAGTTGAAATTTTGG R TCGACGGTTATGCTAATCCTTT
PVM02TC116	B01	F CGCCATTTGGATTGGATT R AGGCGTGGAAGTGGAGTG
PVM04 TC323		F GGTTCTCCTCCTTCTGCT R CGCCCGTCTTTTTGGTAGT
X74919	B05	F CCGTTGCCTGTATTTCCCAT R CGTGTGAAGTCATCTGGAGTGGTC

Em seguida, foram realizadas reações de PCR para avaliar o padrão de segregação oriunda da amplificação dos *primers* entre as populações sob estudo. Para essa avaliação foi considerado que cada par de *primer* amplifica fragmentos

de DNA de um loco. Para cada reação foram utilizados 20 ng de DNA, 100 μ M 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, 10 μ g de BSA, 0,25% de Ficol 400, 10mM de tartrazine e água pura. O volume final para cada reação foi de 12 μ l.

As reações foram realizadas em termociclador modelo Mastercycler Eppendorf, seguindo o seguinte programa: dois minutos a 95° C para a desnaturação do DNA seguido de 32 ciclos. Em cada ciclo ocorreu uma fase de desnaturação a 94°C por 20s; uma fase de anelamento por 20s cujas temperaturas variaram de 46 a 68° C, de acordo com o primer; e uma fase de alongamento a 72°C por 60s para síntese de DNA.

Os produtos de amplificação obtidos foram submetidos à eletroforese vertical por 2 horas e 15 minutos a 130 V em gel de poliacrilamida 8% para que os fragmentos de DNA fossem separados. Em seguida, foram corados em nitrato de prata a fim de que pudessem ser detectados.

Os géis produzidos foram visualizados por meio de transiluminador de luz branca e fotografados com câmera digital. Fragmentos com diferentes tamanhos foram considerados diferentes alelos. Assim, sempre que foram observados fragmentos de diferentes tamanhos (número de pares de bases) entre as cultivares, os dados obtidos a partir do *primer* utilizado foram anotados. Neste estudo considerou-se polimórfico o loco cuja frequência do alelo mais comum fosse menor que 95% (COLE, 2003).

3.5 Análises Estatísticas

A descrição genotípica dos indivíduos foi realizada por meio da transformação dos dados obtidos na análise do perfil eletroforético de cada gel de SSR em códigos numéricos informativos dos alelos que cada indivíduo

coletado possui. Os fragmentos de DNA amplificados de cada loco foram codificados de acordo com o programa computacional Genes (CRUZ, 2008). Desse modo, os genótipos foram identificados com notas 11, 22, 33 e 44 quando homozigotos em relação ao loco avaliado e considerando respectivamente, a ordem crescente de tamanho do fragmento amplificado. Os genótipos heterozigotos foram identificados como 12, 13, 14, 23, 24, 34, etc. Por exemplo, o heterozigoto é 12 quando ele possui um alelo com mesmo tamanho que os indivíduos cujo genótipo foi identificado como 11 e um alelo com mesmo tamanho que os indivíduos cujo genótipo foi identificado como 22.

3.5.1 Frequência Alélica

Foi estimada a frequência alélica a partir do número de ocorrência das diferentes classes genotípicas (frequência observada). O conhecimento da frequência alélica é de grande importância para a compreensão da estrutura genética populacional, pois é a base para a realização das estimativas de divergência genética e endogamia. Para estimar a frequência alélica foi utilizada a seguinte expressão (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011):

$$F(A_i) = \frac{2N_{ii} + \sum_{j=1, j \neq i}^a N_{ij}}{2N}$$

Onde:

$F(A_i)$ = Frequência do alelo i na população

N_{ii} = Número de indivíduos homozigotos na população;

N_{ij} = Número de indivíduos heterozigotos na população;

a = Número de alelos por loco estudado;

N = Número total de indivíduos da população.

3.5.2 Número de Alelos Efetivos

Representa o número requerido de alelos igualmente frequentes em uma população ideal, para produzir a mesma heterozigosidade esperada que a população real apresentou. O número de alelos efetivos foi estimado de acordo com Cruz, Ferreira e Pessoni (2011).

$$N_e = \frac{1}{1 - H_e}$$

Onde,

N_e = Número de alelos efetivos;

H_e = heterozigosidade esperada.

3.5.3 Heterozigosidade Esperada

A probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto em um dado loco, em uma população em equilíbrio foi calculada segundo a fórmula de Nei (1987).

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

Onde:

H_e = heterozigosidade esperada;

k = número de alelos;

p_i = frequência do alelo i .

3.5.4 Heterozigosidade Observada

É a proporção de indivíduos heterozigotos na população (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011).

$$H_o = \frac{n}{N}$$

Onde:

H_o = heterozigosidade observada;

n = número de indivíduos heterozigotos;

N = Número total de indivíduos da população.

3.5.5 Conteúdo Médio de Informação Polimórfica

O valor de PIC fornece uma estimativa do poder discriminatório do marcador por considerar o número e a frequência relativa de alelos por loco (CRUZ, 2008). De acordo com os valores de PIC os marcadores podem ser classificados como muito informativos (valores de PIC superiores a 0,5), medianamente informativos (valores de PIC entre 0,25 e 0,50) e pouco informativos (valores de PIC inferiores a 0,25) (BOLTSTEIN et al., 1980). O Conteúdo de Informação Polimórfica será calculado por meio da seguinte expressão (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^a p_i^2 - \sum_{i,j=1}^a \sum_{(i \neq j)} p_i^2 p_j^2$$

Onde:

PIC = Conteúdo médio de informação polimórfica;

a = Número de alelos apresentado pelo loco estudado;

p_i = Frequência do i -ésimo alelo do loco estudado;

p_j = Frequência do j -ésimo alelo do loco estudado.

3.5.6 Divergência Genética

Com os dados codominantes foi estimado o complemento do coeficiente de similaridade ponderado ($1 - S_{ij}$) (CRUZ; CARNEIRO, 2006).

$$S_{ij} = \frac{1}{2} \sum_{j=1}^L p_j c_j,$$

Em que:

$p_j = \frac{a_j}{A}$: peso associado ao loco j, determinado por:

a_j : número total de alelos do loco j;

A : número total de alelos estudados

c_j = número de alelos comuns entre os pares de acessos i e i'.

3.5.7 Análise de Agrupamento

Para facilitar a identificação visual de grupos de cultivares quanto ao grau de similaridade foi utilizado o método hierárquico da ligação média não ponderada entre grupos (UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). De acordo com essa metodologia, foram utilizadas as médias não ponderadas das medidas de dissimilaridade com a finalidade de evitar que os valores extremos influenciem na caracterização dos genótipos considerados.

A distância entre uma cultivar k e um grupo formado pelas cultivares i e j foi estimada por (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011):

$$d_{(ij)(k)} = \text{média} \{d_{ik}; d_{jk}\}$$

Onde,

$d_{(ij)(k)}$ = Distância entre uma cultivar k e um grupo formado pelas cultivares i e j;

d_{ik} = Média não ponderada das medidas de dissimilaridade de i e k;

d_{jk} = Média não ponderada das medidas de dissimilaridade de j e k.

Desse modo, $d_{(ij)(k)}$ foi estimado pela média do conjunto das distâncias dos pares de cultivares (i e k) e (j e k).

A distância entre os grupos (ij) e (kl) foi fornecida por:

$$d_{(ij)(kl)} = \text{média} \{d_{ik}; d_{il}; d_{jk}; d_{jl}\}$$

Onde,

$d_{(ij)(kl)}$ = Distância entre os grupos (ij) e (kl);

d_{ik} = Média não ponderada das medidas de dissimilaridade de i e k;

d_{il} = Média não ponderada das medidas de dissimilaridade de i e l;

d_{jk} = Média não ponderada das medidas de dissimilaridade de j e k;

d_{jl} = Média não ponderada das medidas de dissimilaridade de j e l.

Desse modo, a distância entre os dois grupos formados, respectivamente pelas cultivares (i e j) e (k e l) foi estimada pela média do conjunto, cujos elementos são as distâncias entre os pares de cultivares (i e k), (i e l), (j e k) e (j e l).

A partir dos dados de divergência genética entre cultivares foi realizada a reamostragem com reposição (*bootstrapping*) das variáveis (locos) no conjunto de dados originais para avaliar a repetibilidade dos nós formados nos dendogramas, ou seja, a consistência das ramificações do dendograma. O processo de reamostragem executou-se em 10.000 simulações utilizando o software Genes (CRUZ, 2008) e após todas as simulações, definiu-se o dendograma consenso, cujos nós foram os mais frequentes.

3.5.8 Coeficiente de Correlação Cofenética

Com a formação do dendograma pode haver distorções sobre o padrão de dissimilaridade entre as cultivares estudadas e ocorrer simplificação das informações originais (CRUZ; CARNEIRO, 2006). Por essa razão, após a obtenção do dendograma a consistência do agrupamento foi avaliada estimando-se o coeficiente de correlação cofenética (CCC).

A estimativa do CCC foi realizada utilizando os coeficientes de semelhança do dendograma para gerar uma nova matriz de dissimilaridade, denominada matriz de coeficientes de similaridade cofenéticos. O coeficiente de correlação cofenética foi então estabelecido a partir da correlação linear de

Pearson entre os elementos da matriz cofenética e os elementos da matriz de dissimilaridade (CARGNELUTTI FILHO; RIBEIRO; BURIN, 2010).

Segundo Cruz e Carneiro (2006), valores de CCC próximos à unidade indicam boa representação da matriz de dissimilaridade pelo dendograma.

3.5.9 Número Ótimo de Marcadores para Identificação de uma Cultivar

A estimativa do número adequado de marcadores para identificar cada cultivar que são capazes de caracterizar todas as cultivares simultaneamente foi realizada utilizando o complemento do coeficiente de similaridade ponderado. A informação genética obtida por meio da estimativa do complemento da similaridade ponderado utilizando os 22 marcadores foi empregada para estimar o número mínimo de marcadores necessários para estimar a divergência entre as cultivares. Para tal, foi realizada a análise de reamostragem (*bootstrap*) utilizando o programa Genes (CRUZ, 2008).

3.5.10 Estrutura Populacional

O grau de parentesco entre as 20 cultivares analisadas (Tabela 1) foi avaliado a partir da separação das cultivares em grupos de similaridade genética (*clusters*). A formação dos grupos foi realizada com base nas informações da frequência alélica de cada cultivar em estimativa Bayesiana para um determinado número X de dados, fornecida pelo software Structure Harvester (EARL; VONHOLDT, 2012). Posteriormente, foi gerado um gráfico para facilitar a análise da heterogeneidade da distribuição das cultivares utilizando o software Structure v. 2.3.2 (PRITCHARD; STEPHENS; DONELLY, 2000).

3.5.11 *Análise de Variância Molecular (AMOVA)*

A análise comparativa da divergência entre grupos, entre cultivares e dentro de cultivares foi realizada por meio da Análise de variância molecular (AMOVA), proposta por Excoffier, Smouse e Quattro (1992). De acordo com esse método os valores de dissimilaridade entre pares de cultivares são utilizados em um esquema de análise de variância hierarquizado produzindo estimativas de componentes de variância análogos às estatísticas F de Wright. A partir das estimativas de variância entre cultivares e grupos, calcula-se o erro; este corresponde à variância dentro de cultivares.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Genotipagem

A genotipagem foi realizada utilizando 22 SSRs polimórficos em relação às 20 cultivares analisadas e cujas bandas amplificadas apresentaram nítida resolução em gel de poliacrilamida 8% (Figura 1).



Figura 1. Perfil eletroforético das 20 cultivares de *Phaseolus vulgaris* avaliadas com o primer PvBR25 (Tabela 3 e 4). Genótipo A^1A^1 para as cultivares 1, 3 e 4. Genótipo A^2A^2 para as cultivares 2, 5, 6, 7, 14, 15, 16, e 17. Genótipo A^3A^3 para as cultivares 8, 13 e 19. Genótipo A^4A^4 para as cultivares 12, 18 e 20. Genótipo A^1A^2 para as cultivares 9, 10 e 11.

4.2 Caracterização da Diversidade Genética e Endogamia

As frequências alélicas de cada um dos 22 locos avaliados consta na figura 2. Por exemplo, no loco 8 existem 4 alelos com frequências 0,150 para os alelos 3 e 4; frequência de 0,225 para o alelo 1; e frequência 0,475 para o alelo 2. É importante notar que todos os 22 locos apresentaram alelos em frequência inferior a 95% e portanto, foram considerados polimórficos.

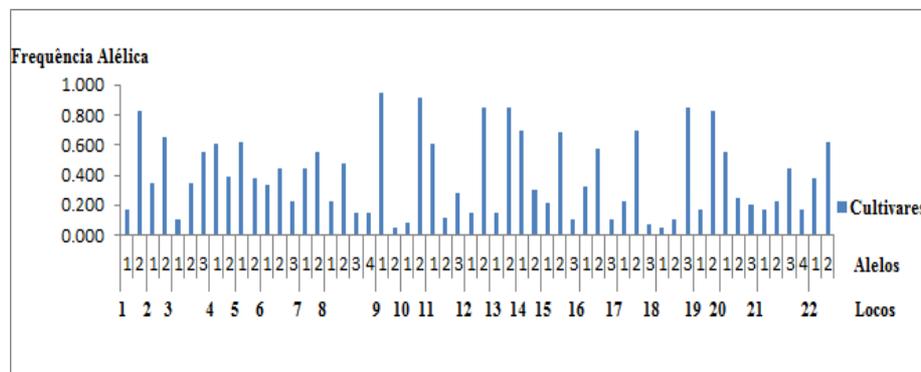


Figura 2. Frequências alélicas em cada um dos 22 locos avaliados. Os locos correspondem respectivamente às regiões marcadas pelos *primers* apresentados na Tabela 3.

Os 22 *primers* avaliados amplificaram um total de 56 alelos, com média de 2,5 alelos por loco (Tabela 5). Houve uma variação de 2 a 4 alelos por loco, sendo os *primers* PvBR25 e ATA6 os mais informativos (Tabela 5). Nascimento et al. (2013) apresentou um resultado similar em estudo da variabilidade genética de 39 genótipos de feijão Caupi. Nesse estudo os autores utilizaram 20 pares de *primer* SSR e identificaram em média 4 alelos por loco, variando de dois a sete alelos por loco. A partir desse resultado médio, foi possível perceber que a maior parte dos locos avaliados apresentou dois alelos, assim como constatado no presente estudo. Outros trabalhos encontraram um número médio de alelos por loco superior ao verificado no presente estudo, conforme constatado por Cardoso et al. (2013, 2014). Em 2013 os autores avaliaram a divergência genética de 172 linhas e cultivares de feijão integrantes de cinco ensaios de VCU conduzidos pelo programa de melhoramento genético da Embrapa Arroz e Feijão utilizando 30 pares de *primers* polimórficos. Neste trabalho, foi observado em média 7,79 alelos por loco. Em 2014, os mesmos autores obtiveram média de 8,29 alelos por loco em estudo de divergência genética de 157 cultivares comerciais de feijão utilizando 24 *primers* polimórficos. No presente trabalho foi observado um número médio de alelos

por loco inferior aos apresentados pelas autoras, provavelmente devido ao menor número de genótipos avaliados e ao maior parentesco entre eles.

A diversidade genética é melhor compreendida pela estimativa do número efetivo de alelos pois esta estimativa representa o número requerido de alelos igualmente frequentes em uma população ideal, em Equilíbrio e Hard-Weinberg, para produzir a mesma heterozigosidade esperada que a população real apresentou. Neste trabalho, o número efetivo de alelos variou de 1,105 a 3,306, com média de 1,931 (Tabela 5). Esta estimativa foi inferior ao número médio de alelos por loco, indicando a presença de alelos raros.

A heterozigosidade observada foi menor que a heterozigosidade esperada em locos em uma população ideal para a maioria dos locos analisados (Tabela 5). A heterozigosidade observada variou de 0,000 a 0,800 e apresentou média de 0,122. A heterozigosidade esperada variou de 0,095 a 0,698 e apresentou média de 0,435. Esse resultado indica excesso de homozigose para a maioria dos locos avaliados em relação a uma população ideal. Como o feijoeiro é uma planta autógama esperava-se que para todos os locos a heterozigosidade observada para cada loco seria menor que a heterozigosidade esperada. Entretanto, isso não ocorreu provavelmente devido a ocorrência de mistura varietal ou polinização cruzada nas estações experimentais das instituições fornecedoras das cultivares. É necessário considerar, contudo, que em vários locos SSR em feijão ocorre heterozigose, mesmo após 24 gerações de autofecundação (RODRIGUES; SANTOS, 2006).

De modo geral, o poder discriminatório dos locos analisados (PIC) foi considerado medianamente informativo, variando de 0,095 a 0,699 e com média de 0,436 (Tabela 5).

Tabela 5. Índices de diversidade genética e endogamia das 20 cultivares de feijão avaliadas utilizando 22 locos SSRs.

Marcador	Na	Ne	Ho	He	PIC
X74919	2,000	1,406	0,150	0,289	0,289
PV141	2,000	1,835	0,100	0,455	0,455
PVESTBR_204	3,000	2,299	0,000	0,565	0,565
BM143	2,000	1,906	0,222	0,475	0,475
BM170	2,000	1,882	0,250	0,469	0,469
PVESTBR_98	3,000	2,793	0,000	0,642	0,643
PvBR35	2,000	1,980	0,800	0,495	0,495
PvBR25	4,000	3,113	0,150	0,679	0,679
BM154	2,000	1,105	0,100	0,095	0,095
BM184	2,000	1,170	0,053	0,145	0,146
BM 187	3,000	2,160	0,000	0,537	0,537
BMc94	2,000	1,342	0,300	0,255	0,255
BM185	2,000	1,342	0,000	0,255	0,255
PVM04 TC323	2,000	1,724	0,200	0,420	0,420
PvBR5	3,000	1,910	0,000	0,476	0,477
BM141	3,000	2,241	0,050	0,554	0,554
PvBR13	3,000	1,831	0,100	0,454	0,454
PVM02 TC116	3,000	1,361	0,100	0,265	0,265
BM201	2,000	1,406	0,050	0,289	0,289
ATA7	3,000	2,469	0,000	0,595	0,595
ATA6	4,000	3,306	0,000	0,698	0,699
PVESTBR_42	2,000	1,895	0,059	0,472	0,472
Média	2,545	1,931	0,122	0,435	0,436

Legenda: Na é o número total de alelos; Ne é o número efetivo de alelos; Ho é a heterozigosidade observada; He é a heterozigosidade esperada e PIC é o conteúdo de informação polimórfica.

4.3 Divergência Genética

O complemento do coeficiente de similaridade calculado para estimar as dissimilaridades entre as cultivares variou de 0,0357 a 0,8125 (Figura 3). O coeficiente de correlação cofenética entre as distâncias gráficas e os dados de dissimilaridade apresentados no dendograma foi de 83% (CCC = 0,8343). Essa estimativa indica que há alta confiabilidade na representação dos dados de dissimilaridade pelo dendograma. A menor estimativa foi encontrada entre as cultivares Carioca fornecida pela UFLA e a fornecida pela EMBRAPA Arroz e Feijão (CNPAF); o que já era esperado, uma vez que a cultivar utilizada pela UFLA é originalmente uma amostra de sementes fornecida pela EMBRAPA Arroz e Feijão e posteriormente, multiplicada na universidade. O maior valor de dissimilaridade genética foi encontrado entre as cultivares CNFP 10104 e BRS MG Realce, pertencentes a tipos comerciais e grupos gênicos distintos, Preto/mesoamericano e Rajado/andino, respectivamente. Outro fato que chama atenção, é a cultivar LP 07-80 que é do tipo comercial Carioca, ser uma das mais divergentes em relação à todas as outras estudadas (Tabela 2 e Figura 3). Essa ampla divergência pode ser devido a sua origem, pois grande número de genótipos foram inter cruzados, inclusive a cultivar Great North Nebraska, obtida na América do Norte (Tabela 2). Em consequência, a LP 07-80 possui mais diversidade alélica e caso ela seja promissora para cultivo, certamente também será promissora como genitora em programas de melhoramento.

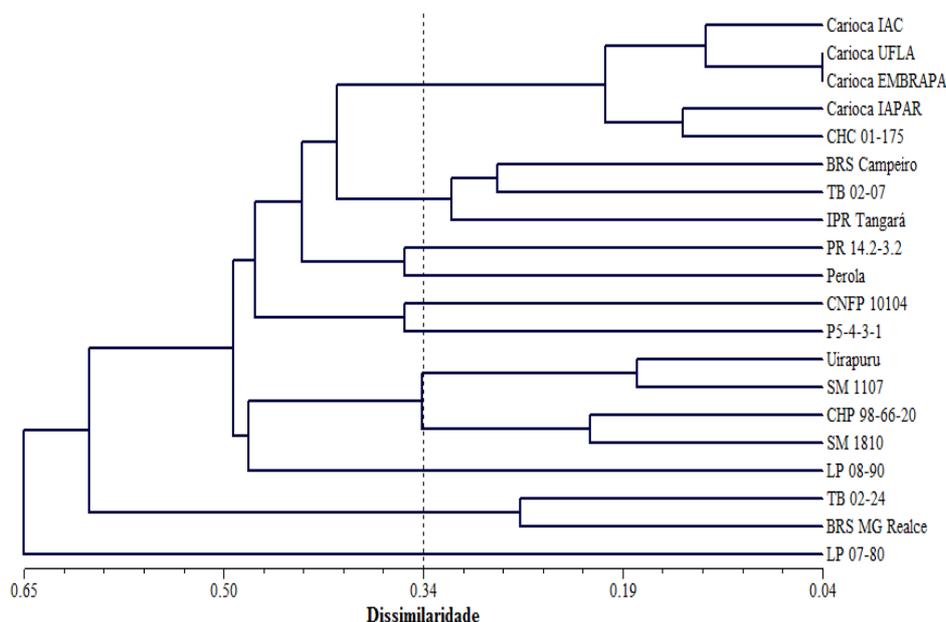


Figura 3. Dendrograma gerado pelo método UPGMA, por meio da matriz de dissimilaridade entre as 20 cultivares de feijão-comum avaliadas.

De acordo com o dendrograma obtido também é possível verificar que houve divergência genética entre a cultivar Carioca fornecida pelas instituições. A cultivar Carioca fornecida pela EMBRAPA Arroz e Feijão e a fornecida pela UFLA foram as menos divergentes entre si; entretanto apresentaram-se divergentes em relação a cultivar fornecida pelo IAC, considerada padrão dentre as outras, pois de acordo com a Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, a cultivar Carioca original foi identificada e lançada pelo IAC. A cultivar Carioca fornecida pelo IAPAR apresentou similaridade com a cultivar CHC 01-175 e foi considerada a mais divergente dentre as amostras da cultivar Carioca avaliadas. Entretanto, considerando as diferentes amostras da cultivar Carioca, elas não são muito divergentes quando comparadas as demais cultivares. A semelhança da cultivar CHC 01-175 com a Carioca fornecida pelo IAPAR deve-se a

genealogia, uma vez que a cultivar CHC 01-175 teve como genitor a cultivar IAC Eté, que pertence ao tipo comercial Carioca.

4.4 Identificação do Número Ótimo de Marcadores

Considerando que o intervalo entre 50 e 100 fragmentos de DNA amplificados tem se mostrado suficiente nas estimativas de relações genéticas entre e dentro de populações de espécies vegetais (COLOMBO et al., 2005) pode-se considerar que os 56 fragmentos empregados nesse estudo são suficientes para estimar com eficiência a divergência genética entre as cultivares.

O resultado das análises de reamostragem (*bootstrap*) realizadas utilizando os 56 fragmentos para as 20 cultivares estão apresentados na tabela 4. Pode-se constatar que com 21 marcadores é possível representar a divergência genética entre os acessos com grau de concordância satisfatório ao obtido com os 22 marcadores, visto que a estimativa do estresse médio é inferior a 0,05%. Portanto, a correlação entre as medidas de divergência obtida utilizando 22 marcadores foi superior a 0,95% e indica que foi utilizado um número satisfatório para o estudo.

Tabela 6. Análise de reamostragem (*bootstrap*) para identificação do número ótimo de marcadores a partir da avaliação do estresse médio.

Número de Marcadores	Estresse Médio
1	0,8582
3	0,4866
5	0,3604
7	0,2853
9	0,2357
11	0,1962
13	0,1631
15	0,1341
17	0,1063

19	0,0774
21	0,0413
22	0,00

4.5 Estrutura Populacional

Por meio da análise da estrutura populacional implementada pelo software Structure as cultivares foram separadas em dois grupos de maior similaridade genética (Figura 4).

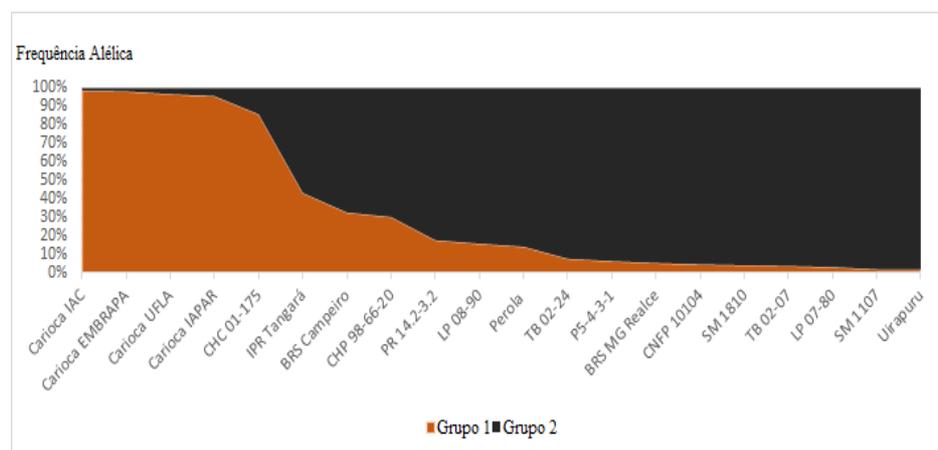


Figura 4. Representação gráfica da divergência genética entre as cultivares tipo Carioca e Preto.

O grupo 1 foi composto pela maioria das cultivares do tipo comercial Carioca e o grupo 2 pela maior parte das cultivares de tipo comercial Preto. Entretanto, houveram cultivares do tipo Carioca que se apresentaram mais similares às do tipo Preto e vice-versa evidenciando a existência de alelos característicos de um grupo que também podem ser encontrados no outro grupo devido a existência de parentesco entre as cultivares de ambos os grupos. No processo de melhoramento para obtenção de algumas das cultivares avaliadas foram realizados cruzamentos utilizando-se genitores dos dois grupos comerciais

(Preto e Carioca) visando associar alelos favoráveis de ambos (Tabela 1). No caso das cultivares BRS MG Realce e TB 02-24, pertencentes respectivamente ao tipo comercial Rajado e Vermelho, provavelmente possuem a maioria dos alelos SSRs similares aos do grupo Preto; entre esses alelos, podem figurar QTLs de caracteres agronômicos (Tabela 3).

Vale ressaltar que na figura 4 a localização da cultivar LP 07-80 está mais próxima do grupo Preto, mesmo se tratando de uma cultivar pertencente ao tipo comercial Carioca. Isso pode ser explicado pelo fato dela possuir genitores andinos como a BRS MG Realce e a Great North Nebraska 1. sel. 27 e podemos observar também que na figura 4, a BRS MG Realce possui a maioria dos alelos típicos do grupo 2.

É importante ressaltar, que em parte o parentesco observado pode ser devido ao fato das cultivares apresentarem locos aparentemente em heterozigose (Ho) em quantidade superior ao esperado para plantas autógamas, refletindo pelo menos em parte a ocorrência de mistura e em parte a heterozigose mantida pela seleção natural em autógamas como o feijoeiro (RODRIGUES; SANTOS, 2006) (Tabela 5). Esse fato também pode ser observado pelo dendograma (Figura 3). A ocorrência de poucos locos em heterozigose era esperada porque as cultivares melhoradas de feijão em geral são derivadas de cruzamento de genitores diferentes e, na população segregante uma planta da geração F₂ ou derivada é autofecundada gerando uma progênie. As progênies assim obtidas são autofecundadas sucessivamente e seleciona-se a melhor que irá constituir a nova cultivar. Portanto, é esperado que cada cultivar seja constituída por uma mistura de linhagens.

Considerando os dois grupos formados, foi realizada a análise de variância molecular - AMOVA (Figura 5). De acordo com análise, a divergência genética entre cultivares (61%) é maior que a divergência entre os grupos Carioca e Preto (12%) e a divergência existente dentro de cada cultivar (27%).

Considerando que o feijoeiro é uma planta autógama, era esperado menor divergência dentro de cultivares. Essa estimativa, juntamente com os altos valores de heterozigosidade observados indica a ocorrência de mistura em cada cultivar e certamente heterozigose. Em relação à divergência entre cultivares nota-se que ela é relativamente acentuada, mesmo nesse conjunto de apenas 20 cultivares já melhoradas, indicando menor risco de vulnerabilidade como o que se observa em relação à resistência a patógenos em soja, por exemplo. Além disso, indica também considerável variabilidade entre essas cultivares melhoradas que pode ser explorada no melhoramento.

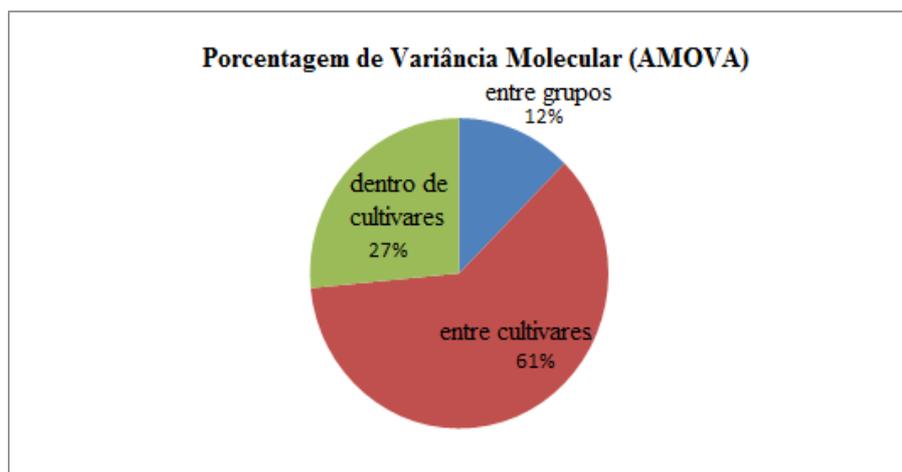


Figura 5. Representação gráfica da divergência genética entre e dentro dos cultivares e entre os grupos Carioca e Preto.

5 CONCLUSÃO

Entre as cultivares Carioca, a da UFLA e da EMBRAPA Arroz e Feijão são as mais similares (0,03571), já a utilizada no IAPAR é a mais distinta entre elas. Entretanto, as amostras de cultivares Carioca são mais semelhantes entre elas do que em relação às demais cultivares.

Dentre as cultivares estudadas, a CNFP 10104 e BRS MG Realce foram as mais distintas (0,8125) provavelmente devido ao fato de pertencerem a tipos comerciais e grupos gênicos diferentes, respectivamente, Preto/mesoamericano e Rajado/andino.

A heterozigosidade observada foi mais alta do que o esperado para plantas autógamas (0,05), indicando a ocorrência de mistura de linhagens e em parte a heterozigose mantida pela seleção natural. Entretanto, as cultivares estudadas apresentaram maior variação genética entre cultivares do que dentro de cultivares ou entre os grupos Carioca e Preto.

As análises de agrupamento foram eficientes para separar as cultivares em grupos de maior similaridade genética; porém não houve formação de grupos definidos que separassem o tipo comercial Carioca do tipo comercial Preto em razão da origem das cultivares e dos marcadores utilizados.

REFERÊNCIAS

AGUILERA, J. C. et al. Genetic variability by ISSR markers in tomato (*Solanum lycopersicon* Mill.). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 6, n. 2, p. 243-252, 2011.

ALCÂNTARA NETO, F. Marcadores microssatélites na identificação de cultivares de soja. 2001. 46 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

ALMEIDA, L. D. et al. Características do feijão carioca, um novo cultivar. **Bragantia**, Campinas, v. 30, n. 7, p. 33-38, abr. 1971.

ANDRADE, M. T. et al. Paternity test for IAPAR 139 cultivar of common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 56, p. 161-162, 2013.

ANTONIO, R. P. **Controle genético da resistência do feijoeiro ao mofo branco e seleção assistida por marcadores moleculares.** 2008. 74 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

ANTUNES, I. F.; COSTA, J. G. C. da; OLIVEIRA, E. A. **Determinação da porcentagem de cruzamentos naturais em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no município de Pelotas, RS, Brasil.** Pelotas: IPEAS, 1973. 5 p. (Comunicado Técnico, 1).

AVIANI, D. M. et al. Abordagem sobre registro e proteção de cultivares. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L.; RIBEIRO JUNIOR, W. Q. (Ed.). **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: uma abordagem estratégica.** Planaltina: EMBRAPA Cerrados; Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2008. p. 152-168.

BAEZINGER, P. S.; PETERSON, C. J. Genetic variation: it's origin and use for breeding self-pollinated species. In: STALEKR, H. T.; MURPHY, J. P. (Ed.). **Plant breeding in the 1990's.** Raleigh: North Carolina State University, 1991. p. 69-100.

BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. de O. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central-brasileira.** Goiânia: EMBRAPA, 2012. 247 p.

BECHER, S. A. et al. Microsatellites for cultivar identification in pelargonium. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, n. 4, p. 643-651, Sept. 2000.

BERNET, G. P. et al. Applicability of molecular markers in the context of protection of new varieties of cucumber. **Plant Breeding**, Berlin, v. 122, n. 2, p. 146-152, Apr. 2003.

BLAIR, M. W.; IRIARTE, G.; BEEBE, S. QTL analysis of yield traits in an advanced backcross population derived from a cultivated Andean X wild common bean (*Phaseolus vulgaris*) cross. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, n. 6, p. 1149-1163, Apr. 2006.

BOLTSTEIN, D. et al. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 32, p. 314-331, 1980.

BONOW, S. et al. Caracterização morfológica de cultivares de arroz visando a certificação da pureza varietal. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 619-627, maio/jun. 2007.

BORBA, T. C. O. et al. Microsatellite marker-mediated analysis of the EMBRAPA Rice Core Collection genetic diversity. **Genetica**, Dordrecht, v. 137, p. 293-304, July 2009.

BORÉM, A. **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 546 p.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. 532 p.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 2009. 529 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Perfil do feijão no Brasil**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao/saiba-mais>>. Acesso em: 20 mar. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Proteção de cultivares no Brasil**. Brasília, 2011. 202 p.

BRONDANI, C. et al. Determination of genetic variability of traditional varieties of Brazilian rice using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 4, p. 676-684, 2006.

CABRAL, P. D. S. et al. Genetic diversity in local and commercial dry bean (*Phaseolus vulgaris*) accessions based on microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 1, p. 140-149, 2011.

CARDOSO, J. M. K. **Estimativa da diversidade genética entre acessos do tipo carioca de feijão comum com base em marcadores moleculares**. 2009. 72 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura tropical e Subtropical) - Instituto Agrônômico de Campinas, Campinas, 2009.

CARDOSO, L. R. et al. Variabilidade genética de acessos de Agupapé coletados no Estado de São Paulo. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 20, p. 1-5, 2002. Número especial.

CARDOSO, P. C. B. et al. Discrimination of common beans cultivars using multiplexed microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 1, p. 1964-1978, 2014.

CARDOSO, P. C. B. et al. Molecular characterization of high performance inbred lines of Brazilian common beans. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 4, p. 5467-5484, 2013.

CARGNELUTTI FILHO, A. C.; RIBEIRO, N. D.; BURIN, C. Consistência do padrão de agrupamento de cultivares de feijão conforme medidas de dissimilaridade e métodos de agrupamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 3, p. 236-243, mar. 2010.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Registro e proteção de cultivares pelo setor público: a experiência do programa de melhoramento Capsicum da Embrapa Hortaliças. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 135-138, 2009.

CASTRO, C. C. **A influência da incerteza no desenvolvimento de pesquisas com organismos geneticamente modificados no Brasil**. 2006. 252 p. Tese (Doutorado em Agronegócios) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

CHEIDIAK, G. L. C. et al. **Análise de pureza genética de sementes de feijoeiro comum utilizando marcadores microsatélites em sistema de Genotipagem Multiplex**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2007. 20 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 28).

CHOER, E.; BARBIERI, R. L.; CASTRO, C. M. **Qualidade genética de sementes de feijão utilizadas em regiões produtoras do Estado do Rio Grande do Sul**. Pelotas: EMBRAPA Clima Temperado, 2002. 18 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 3).

COLE, C. T. Genetic variation in rare and common plants. **Annual Reviews Ecology Systems**, Palo Alto, v. 34, p. 213-237, Nov. 2003.

COLOMBO, L. A. et al. Aclimação de um híbrido de *Cattleya* em substratos de origem vegetal sob dois sistemas de irrigação. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 145-150, 2005.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Conjuntura semanal**.

Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_07_02_17_12_48_feijao23a27062014.pdf>. Acesso em: 28 jul. 2014.

COSTA, F. R. et al. Marcadores RAPD e caracteres morfoagronômicos na determinação da diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 1-9, May/June 2009.

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. **Programa Genes: diversidade genética**. Viçosa, MG: UFV, 2008. v. 1, 278 p.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 585 p.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Viçosa, MG: UFV, 2011. 620 p.

DEBOUCK, D. Systematics and morphology. In: SCHOONHOVEN, A. van; VOYSEST, O. (Ed.). **Common beans: research for crop improvement**. Cali: CAB Internacional, 1994. p. 55-118.

DORNELES, L. M. C. et al. Diversidade genética entre linhagens de soja semiprecoce no município de Goiatuba, GO, safra 2009/2010. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 6, n. 1, p. 22-27, jan./mar. 2011.

EARL, D.; VONHOLDT, B. Structure Harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resource**, Berlin, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Austin, v. 131, n. 2, p. 479-491, June 1992.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: EMBRAPA, 2007. 102 p.

FEHR, W. R. **Principles of cultivate development**. New York: MacMillan, 1987. 525 p.

FERREIRA, C. A. et al. Identificação de cultivares e certificação da pureza genética de gladiolo por meio de marcadores morfológicos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 4, p. 692-700, jul./ago. 2011.

FERREIRA, J. L. **Análise do fluxo Gênico em feijoeiro**. 2004. 33 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA, 1998. 220 p.

GARCIA, F. A. et al. Microsatellite molecular markers in the cultivar identification of Brazilian Soybean for human consumption. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 7, n. 1, p. 155-164, 2007.

HONGWEI, G. et al. Application of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Yersinia enterocolitica* in pork meat. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 77, n. 2, p. 198-201, May 2009.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Associação internacional para testes em sementes**. Disponível em: <<http://www.seedtest.org>>. Acesso em: 10 maio 2014.

JESUS, O. N. et al. Diferenciação molecular de cultivares elite de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1739-1748, dez. 2006.

KAZANIDOU, A. et al. A multiplex PCR assay for simultaneous genotyping of kdr and ace-1 Loci in *Anopheles gambiae*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 80, n. 2, p. 236-238, 2009.

KUMAR, L. D. et al. DNA profiling of diputed Chilli Sample (*Capsicum annuum*) using ISSR-PCR and FISSR-PCR markers assay. **Forensic Science International**, Lausanne, v. 116, n. 1, p. 63-68, 2001.

LARA, L. A. de C. et al. Identification of QTLs for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in carioca common bean by the moving away method. **ISRN Microbiology**, Cairo, v. 2014, p. 1-7, 2014.

MACHADO, C. F. et al. Choice of common bean parents based on combining ability estimates. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 179-183, 2002.

MATA, T. L. da. **Diversidade genética em germoplasma de arroz filipino identificada por marcadores moleculares e caracteres agromorfológicos**. 2010. 99 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queirós", Piracicaba, 2010.

MÉTAIS, I. et al. Description and analysis of genetic diversity between commercial bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, n. 8, p. 1207-1214, Dec. 2000.

MIRANDA, Z. F. S. et al. Genetic characterization of ninety elite soybean cultivars using coefficient of parentage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 3, p. 363-396, mar. 2007.

NADERI, R. et al. Inter- and intra-specific genetic diversity among cyclamen accessions investigated by RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 122, n. 4, p. 658-661, Nov. 2009.

NASCIMENTO, A. T. B. et al. Análise de diversidade em genótipos de feijão-caupi do programa de melhoramento da Embrapa Meio-Norte. In: CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO CAUPI, 3., 2013, Recife. **Anais...** Recife: CONAC, 2013. 1 CD-ROM.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University, 1987. 512 p.

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

PAPA, R. et al. A genome-wide analyses of differentiation between wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* from Mesoamerica. **Theoretica and Applied Genetics**, Berlin, v. 111, n. 6, p. 1147-1158, Oct. 2005.

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.

PINHEIRO, L. R. et al. Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 298, n. 10, p. 1-11, Dec. 2012.

PINHEIRO, P. V.; FARIA, J. C. **Fluxo gênico em feijoeiro comum: ocorrência e possíveis consequências**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA, 2005. 28 p. (Documentos, 185).

POSSE, S. C. P. et al. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central-brasileira: 2009-2011**. Vitória: INCAPER, 2010. 245 p.

PRIOLLI, R. H. G. et al. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellites markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 185-193, 2002.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Austin, v. 155, n. 2, p. 945-959, June 2000.

RAMALHO, M. A. P. Melhoramento do feijoeiro. In: **SIMPÓSIO SOBRE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2.**, 1997, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 1997. p. 167-196.

RAMALHO, M. A. P. et al. **Genética na agropecuária**. Lavras: UFLA, 2012. 566 p.

RAMOS, N. P. **Determinação da pureza varietal em lotes de sementes de milho através de marcadores morfológicos e microssatélites**. 2004. 104 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", Piracicaba, 2004.

RAMOS, N. P. et al. Sensibilidade do microssatélites para determinar a pureza varietal em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 99-105, 2006.

RIEGER, R.; MICHAELIS, A.; GREEN, M. M. **Glossary of genetics and cytogenetics: classical and molecular**. 4th ed. Berlin: Springer-Verlag, 1976. 647 p.

RODRIGUES, D. H.; ALCÂNTARA NETO, F. de; SCHUSTER, I. Identification of essentially derived soybean cultivars using microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 8, n. 1, p. 74-78, 2008.

RODRIGUES, T. B.; SANTOS, J. B. dos. Effect of natural selection on common bean (*Phaseolus vulgaris*) microsatellite alleles. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 345-352, 2006.

SCHAFFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A. L. C. Diversidade genética de porta-enxertos cítricos baseada em marcadores moleculares RAPD. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1437-1442, set./out. 2004.

SCHUSTER, I. et al. Determinação da pureza varietal de sementes de soja com o auxílio de marcadores moleculares microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 3, p. 247-253, mar. 2004.

SCHUSTER, I. et al. Genetic variability in brazilian wheat cultivars assessed by microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 32, n. 3, p. 557-563, 2009.

SILVA, J. S. de. **Marcação do alelo de resistência do feijão comum à mancha angular por meio de microssatélites e RAPD**. 2003. 40 p. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SINGH, S. P. Breeding for seed yield. In: SCHOONHOVEN, A. van; VOYSEST, O. (Ed.). **Common beans: research for crop improvement**. Cali: CAB Internacional, 1993. p. 383-443.

SOULE, M. et al. Comparativa QTL map for white mold resistance in common bean, and characterization of partial resistance in dry bean lines VA19 and I9365-31. **Crop Science**, Madison, v. 51, n. 1, p. 123-139, 2011.

SOUZA, D. A. de. **Efeito da seleção recorrente para resistência à mancha angular na reação ao mofo branco e em alelos SSR de progênies de feijão**. 2012. 95 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SOUZA, G. A. de et al. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 7, p. 843-849, jul. 2008.

SPIEGELAERE, W. de et al. Elimination of amplification artifacts in real-time RT-PCR using laser capture microdissected samplers. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 382, n. 1, p. 72-74, Nov. 2008.

TEIXEIRA, F. F. et al. QTL mapping for angular leaf spot in common bean using microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 5, p. 272-278, 2005.

VAZ, A. R. de C. et al. Genetic analysis of a local population of *Oryza glumaepatula* using SSR markers: implications for management and conservation programs. **Genetica**, Dordrecht, v. 137, n. 2, p. 221-231, 2009.

VELOSO, J. S. et al. Pureza da cultivar carioca com marcadores microssatélites. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 25., 2012, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2012. 1 CD-ROM.

VIANA, A. A. N. et al. **Proteção de cultivares no Brasil**. Brasília: UFV, 2011. 202 p.

VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; BORÉM, A. **Feijão**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2011. 600 p.

VIEIRA, E. S. N. **Marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares na caracterização de cultivares de soja e café**. 2004. 137 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

VIEIRA, E. S. N. et al. Variabilidade genética em cultivares de soja determinada com marcadores microssatélites em gel de agarose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 11, p. 1460-1466, nov. 2009.

VIEIRA, E. H. N.; RAVA, C. A. Características botânicas e fisiológicas da semente. In: _____. **Sementes de feijão: produção e tecnologia**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2000. p. 25-38.

VIEIRA, R. L.; NODARI, R. O. Diversidade genética de cultivares de alho avaliada por marcadores RAPD. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 51-57, jan./fev. 2007.