



CHADREQUE LUÍS NHANENGUE

**SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES DE
DNA E FENOTÍPICA PARA TEMPO DE
COCCÃO DO FEIJÃO COMUM**

LAVRAS - MG

2014

CHADREQUE LUÍS NHANENGUE

**SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES DE DNA E FENOTÍPICA
PARA TEMPO DE COCÇÃO DO FEIJÃO COMUM**

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

Orientador

Dr. João Bosco dos Santos

LAVRAS – MG

2014

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

Nhanengue, Chadreque Luís.

Seleção assistida por marcadores de DNA e fenotípica para
tempo de cocção do feijão comum / Chadreque Luís Nhanengue. –
Lavras : UFLA, 2014.

77 p. : il.

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

Orientador: João Bosco dos Santos.

Bibliografia.

1. Plantas – Melhoramento genético. 2. *Phaseolus vulgaris*. 3.
Marcadores genéticos. 4. Cocção. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 635.6523

CHADREQUE LUÍS NHANENGUE

**SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES DE DNA E FENOTÍPICA
PARA TEMPO DE COCÇÃO DO FEIJÃO COMUM**

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

APROVADA em 26 de Fevereiro de 2014.

Dr.^a Ângela de Fátima Barbosa Abreu

EMBRAPA/Arroz e Feijão

Dr. César Augusto Brasil Pereira Pinto

UFLA/DBI

Dr. João Bosco dos Santos
Orientador

LAVRAS – MG

2014

A Deus.

OFEREÇO

A toda minha família pelo carinho, apoio incondicional e suporte.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela constante presença em minha vida.

À Universidade Federal de Lavras e ao programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade concedida para realização do mestrado.

Ao Banco Mundial e ao Ministério da Ciência e Tecnologia de Moçambique (MCT), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da UFLA, pelos ensinamentos transmitidos e pela harmoniosa convivência durante o curso.

Ao professor Dr. João Bosco dos Santos pela valiosa orientação, serenidade, paciência, competência, confiança e por todos os ensinamentos transmitidos que foram de grande relevância para a realização deste trabalho e meu crescimento profissional.

À Dra. Ângela de Fátima Barbosa Abreu, por ter participado na banca de defesa e pelas valiosas sugestões.

Ao professor Dr. César Augusto Brasil Pereira Pinto pela participação na banca de defesa e pelas valiosas sugestões.

Ao Sr. Lamartine, laboratorista, pela disponibilidade sempre que solicitado, competência e por tornar as atividades do laboratório mais fáceis e prazerosas.

Aos funcionários do Departamento de Biologia: Lílian, Zélia, Rafaela, Irondina, Du, Léo, Lindolfo e Ramon pelo carinho e convivência amigável.

A todos os colegas da Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela harmoniosa convivência e amizade.

Aos amigos e colegas de mestrado Danilo, Márcio e Octávio pelos bons momentos que passamos juntos e por tornar a vida em Lavras mais alegre.

A todos os colegas do Laboratório de Genética Molecular, em especial Filipe, Lucas e Danuza, pela preciosa ajuda na realização deste trabalho e pela amizade.

A todos os meus familiares, pelo apoio incondicional, incentivo, amizade e carinho.

A todos que, embora não citados, contribuíram para o sucesso deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O tempo de cocção de feijão é um atributo importante e determinante para a aceitação de uma nova cultivar pelo consumidor. A seleção fenotípica tem sido feita com sucesso. No entanto, ela é realizada no fim do ciclo da cultura e em gerações avançadas, além disso, o procedimento de avaliação é demorado e trabalhoso. Com o advento dos marcadores moleculares de DNA, surge a possibilidade de serem utilizados na seleção assistida, principalmente porque ela pode ser realizada já nas plantas F_2 . Este trabalho objetivou avaliar a eficiência da seleção assistida por marcadores de DNA (SAM) para o tempo de cozimento, em comparação com a seleção fenotípica, em progênies $F_{2:4}$ oriundas do cruzamento entre a cultivar BRSMG-Madrepérola e a linhagem RP-2. A BRSMG-Madrepérola e a RP-2 possuem tipo de grão carioca, porém, apresentam tempo de cozimento curto e prolongado, respectivamente. Os experimentos foram instalados no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras. Foram tomadas aleatoriamente 192 plantas F_2 e tiveram seu DNA extraído para a SAM. Adicionalmente foram tomadas aleatoriamente mais 97 plantas F_2 para a seleção fenotípica, totalizando 289 plantas F_2 e todas foram multiplicadas a campo para a obtenção de progênies $F_{2:4}$. A avaliação da porcentagem de cozimento do grão foi realizada 60 dias após a colheita. Foi utilizado o delineamento látice triplo 17 x 17, com 289 progênies e dois tratamentos comuns, representados pelos genitores, totalizando 291 tratamentos. A parcela tinha 50 grãos inteiros e sadios de cada tratamento. Cada grupo de 17 progênies e dois tratamentos comuns (constituindo o bloco) foi colocado em conjunto na panela de pressão elétrica durante 30 minutos, após a estabilização da pressão. A porcentagem de grãos cozidos foi medida através do aparelho de Mattson. De um total de 12 marcadores de DNA testados para a SAM (um RAPD e 11 microsatélites), apenas dois microsatélites foram polimórficos nos genitores e em plantas F_2 . Os marcadores polimórficos explicaram 32,16% (PV 141) e 9,57% (X04001) da variação fenotípica, isoladamente; em simultâneo, os dois explicaram 41,73%, portanto, estão associados a QTLs de grande efeito. Foram comparados os melhores 10% de 192 progênies $F_{2:4}$ selecionados com base na avaliação fenotípica e em um índice obtido com informações fenotípicas e dos marcadores. A SAM apresentou eficiência de 34,19%, portanto, foi inferior à seleção fenotípica. A eficiência da SAM também foi avaliada pela coincidência das progênies selecionadas por marcadores e pelo fenótipo. Das 192 progênies avaliadas, 76 progênies tiveram maior número de marcadores favoráveis e representaram eficiência de 62,28%, embora alta, foi inferior à fenotípica.

Palavras-chave: Melhoramento de plantas. *Phaseolus vulgaris*. Seleção assistida por marcadores moleculares de DNA. Propriedades culinárias.

ABSTRACT

Common bean cooking time is an important and determining attribute for the acceptance of a new cultivar by consumer. Phenotypic selection has been done successfully. However, it is performed at the end of the crop cycle and in advanced generations. Furthermore, the assessment procedure is time consuming and laborious. With the advent of DNA markers, arises the possibility for its application in marker-assisted selection, especially since it can be performed in F_2 plants. This study aimed at evaluating the efficiency of DNA marker-assisted selection (MAS) in cooking time compared to phenotypic selection in $F_{2:4}$ progenies derived from the cross between the BRSMG-Madrepérola cultivar and the RP-2 line. The BRSMG-Madrepérola and RP-2 have carioca grain type, however, present short and elongated cooking time, respectively. The experiments were installed in the Biology Department at the Universidade Federal de Lavras. We randomly selected 192 F_2 plants and extracted their DNA for MAS. Additionally, we randomly selected 97 F_2 plants for phenotypic selection, totalizing 289 F_2 plants, which were multiplied in the field to obtain $F_{2:4}$ progenies. The evaluation of the bean cooking percentage was performed 60 days after harvest. We used the 17 x 17 triple lattice design, with 289 progenies and two common treatments, represented by the genitors in a total of 291 treatments. The plot had 50 whole and healthy grains from each treatment. Each group of 17 progenies and two common treatments (constituting the block) were placed together in electric pressure cooker for 30 minutes after pressure stabilization. The percentage of cooked grains was measured with the Mattson apparatus. Of a total of 12 DNA markers tested for MAS (one RAPD and 11 microsatellites), only two microsatellites were polymorphic on the genitors and F_2 plants. The polymorphic markers individually explained 32.16% (PV 141) and 9.57% (X04001) of the phenotypic variation; simultaneously, both explained 41.73%, therefore, are associated with large effect QTLs. We compared the best 10% $F_{2:4}$ progenies out of 192, selected based on phenotypic evaluation and an index obtained with marker phenotypic information. MAS showed an efficiency of 34,19% and, therefore, was lower than the phenotypic selection. The MAS efficiency was also evaluated through the coincidence between progenies selected by DNA markers and phenotype. Of 192 evaluated progenies, 76 presented higher number of favorable markers and represented an efficiency of 62,28%, although high, it was inferior to that of phenotypic selection.

Keywords: Plant breeding. *Phaseolus vulgaris*. DNA marker assisted selection. Cooking properties.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição de frequência da média de porcentagem de grãos cozidos em progênies $F_{2:4}$52
----------	--

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resumo da análise de variância da porcentagem de grãos cozidos em progênies $F_{2;4}$. Análise realizada no delineamento em látice 17 x 17, sem e com o uso de tratamentos comuns.....	50
Tabela 2	Porcentagem média de grãos cozidos das 30 melhores progênies.....	51
Tabela 3	Análise de variância das porcentagens de grãos cozidos.....	54
Tabela 4	Análise da associação por marcas simples por meio da comparação entre médias de porcentagem de cozimento para cada marcador polimórfico	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Feijão como alimento e sua importância sócio-econômica.....	14
2.2	Tempo de cocção do feijão	16
2.2.1	Efeitos do armazenamento no tempo de cocção.....	18
2.2.2	Correlação entre absorção da água e o tempo de cocção.....	20
2.2.3	Efeito do tegumento e cotilédones no tempo de cozimento	23
2.2.4	Controle genético do tempo de cocção do feijão	24
2.3	Marcadores moleculares de DNA	25
2.3.1	Mapeamento genético de QTLs.....	29
2.3.2	Seleção assistida por marcadores de DNA	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	Local	36
3.2	Linhagens utilizadas.....	36
3.3	Obtenção e avaliação fenotípica das progênies.....	37
3.4	Extração de DNA e seleção assistida com marcadores de DNA....	39
3.5	Análise dos dados.....	41
3.6	Estimativa do ganho com a seleção fenotípica	45
3.7	Estimativa do ganho com a seleção assistida por marcadores moleculares	45
3.8	Eficiência da Seleção assistida por marcadores	48
4	RESULTADOS	49
4.1	Avaliação fenotípica	49
4.2	Análise com marcadores moleculares.....	54
5	DISCUSSÃO	58
5.1	Avaliação fenotípica	58
5.2	Análise com marcadores moleculares.....	60
5.3	Comparação da seleção assistida por marcadores de DNA e fenotípica	63
6	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	66
	ANEXO	77

1 INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) é um dos principais alimentos consumidos no Brasil e no mundo. Ele é fundamental para a segurança alimentar e nutricional, sobretudo para classes mais carentes da população e representa um dos pilares da dieta brasileira (BARBOSA; GONZAGA, 2012). O feijão é reconhecidamente uma excelente fonte protéica, contém grandes quantidades de carboidratos complexos, fibras e compostos fenólicos com ação antioxidante, que podem reduzir a incidência de doenças (COUTO et al., 2010; SATHE et al., 1984). Ele é extremamente diversificado em termos de cultivo, utilização, variabilidade morfológica, e possui um forte impacto na cadeia produtiva e na distribuição da renda no país (GARCIA et al., 2005).

O consumo *per capita* é superior a 17 kg/ano (BARBOSA; GONZAGA, 2012). Contudo, nos últimos cinco anos, foi registrada a redução em 27% no consumo doméstico médio do feijão, ou seja, de 12,4 para 9,1 kg e o prolongado tempo de cocção é considerado como uma das causas importantes para o decréscimo verificado (GARCIA et al., 2012). É importante notar que o consumo *per capita* é a média anual do consumo de feijão por pessoa, independentemente do local onde tenha sido preparado (casa, restaurante, entre outros), já o consumo doméstico é referente à quantidade média de feijão preparada e consumida em casa.

Assim, contribuem para este declínio as mudanças no cotidiano dos consumidores, cada vez com menos tempo para o preparo de refeições, decorrente da redução do tempo de trabalho doméstico. Assim sendo, aos poucos o feijão vem sendo substituído por alimentos de menores preços e de rápido preparo. Adicionalmente, há maior número de pessoas fazendo suas refeições fora do lar e a substituição do feijão por outras fontes de proteína, principalmente de origem animal (FERREIRA; DEL PELOSO; FARIA, 2002).

Outro fato que contribui para o decréscimo no consumo, é que, durante o armazenamento o feijão perde qualidade nutricional e sensorial, além de requerer maior tempo para a cocção dos grãos, o que induz a diminuição no consumo na entressafra, já que o consumidor tem preferência pelo produto recém-colhido (BERTOLDO et al., 2010). Com o aumento das exigências do consumidor torna-se necessário o desenvolvimento de cultivares que, além de boa produtividade, apresentem também boas propriedades culinárias.

A seleção para a produtividade e outras características agrônômicas de interesse, incluindo resistência a fatores bióticos e abióticos, arquitetura da planta, hábito de crescimento, e fisiológicas como a qualidade nutricional e tempo de cocção, são práticas utilizadas pelos melhoristas com intuito de desenvolver cultivares superiores. O melhoramento para redução do tempo de cocção visa obter linhagens com grãos que possuem o cozimento mais rápido, adequando o seu consumo ao ritmo de vida de grande parte da população brasileira (GARCIA et al., 2005).

Elia et al. (1997) estimaram a herdabilidade no sentido restrito de tempo de cozimento de 0,90. A herdabilidade alta deste carácter indica a possibilidade de ganho com a seleção fenotípica. No entanto, o procedimento de avaliação é demorado e trabalhoso. Com o advento dos marcadores moleculares de DNA, surge a possibilidade de sua utilização na seleção assistida, principalmente porque ela pode ser realizada já nas plantas F_2 e permite avaliar maior número de plantas.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da seleção assistida por marcadores de DNA para o tempo de cozimento, em comparação com a seleção fenotípica, em progênies oriundas do cruzamento entre a cultivar BRSMG-Madrepérola e a linhagem RP-2.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Feijão como alimento e sua importância sócio-econômica

Pesquisas sobre propriedades nutracêuticas do feijão comum destacaram a importância desta cultura na dieta humana por conter proteínas, minerais, vitaminas, fibras e carboidratos complexos, o que torna este alimento uma boa fonte de nutrientes (BORÉM; CARNEIRO, 2011; FIALHO et al., 2006; KUTOS et al., 2003).

A proteína do feijão é rica no aminoácido essencial lisina, porém pobre nos aminoácidos sulfurados, como metionina e cisteína, essenciais ao homem. Os cereais, como o arroz, são pobres em lisina, mas ricos em aminoácidos sulfurados, o que torna a tradicional dieta brasileira, arroz com feijão, complementar em termos de aminoácidos essenciais (BORÉM; CARNEIRO, 2011).

O consumo do feijão tem sido associado à redução de doenças crônicas, particularmente diabetes e obesidade, e à redução do risco de mortalidade por doenças cardiovasculares (NÖTHLINGS et al., 2008; PREUSS, 2009). De acordo com Cardador-Martínez, Loarca-Piña e Oomah (2002), o consumo de feijão produz efeitos fisiológicos que podem ser devidos à presença de fitoquímicos abundantes incluindo polifenóis, que possuem tanto propriedades anticancerígenas quanto antioxidantes. Para esses autores, os antioxidantes removem radicais livres e espécies reativas de oxigênio e podem ser extremamente importantes na inibição de mecanismos oxidativos que conduzem a doenças degenerativas. A revisão sobre aspectos nutricionais importantes de feijão, bem como a sua contribuição na diminuição dos riscos de doenças crônico-degenerativas é apresentada por vários autores (HAYAT et al., 2013; RONDINI; BARRET; BENNINK, 2013).

Entretanto, apesar dos atributos nutricionais positivos do feijão, há relatos de problemas relacionados ao seu consumo, Saha et al. (2009) mencionaram fatores antinutricionais, como inibidores da protease, taninos e ácido fítico. O feijão contém vários oligossacarídeos, principalmente de estaquiose e rafinose, os quais não podem ser hidrolisados no sistema digestivo humano. Como resultado, os oligossacarídeos são metabolizados pela microflora do cólon, que subsequentemente produz gás, causando desconforto intestinal e flatulência (MATELLA; MISHRA; DOLAN, 2013). Estudos feitos por Doria et al. (2012) levaram à conclusão de que o ácido fítico e taninos podem ligar-se a proteínas e a alguns minerais essenciais na dieta, tornando-os indisponíveis ou somente parcialmente disponíveis para absorção pelo organismo. No quadro 1 são apresentados os principais fatores antinutricionais e seus efeitos biológicos.

Fatores antinutricionais	Efeitos biológicos/fisiológicos
Inibidores de tripsina	Reduz a atividade da enzima tripsina, que está relacionada com a digestão de proteínas
Ácido fítico (fitatos)	Compromete a biodisponibilidade de minerais (K, Mg, Ca, Fe, Zn)
Fenóis/taninos	Reduz digestibilidade através da ligação com proteínas
Lectinas (fitohemaglutininas)	Reduz a absorção de nutrientes pela ligação celular dentro de mucosa intestinal
Saponinas	Causa irritação no trato gastrointestinal e interfere com a absorção de nutrientes

Quadro 1 Principais fatores antinutricionais e seus efeitos biológicos.

Fonte: Adaptado de Matella, Mishra e Dolan (2013) e Sathe (2013)

De acordo com Aragão et al. (2008), o feijão além de fornecer proteína na dieta de mais de 300 milhões de pessoas em todo o mundo, particularmente em países tropicais e subtropicais em vias de desenvolvimento, é um dos produtos agrícolas de maior importância econômico-social. Por exemplo, no Brasil, onde é produzido em grandes áreas, a mão-de-obra empregada durante a cadeia de produção e de valor é muito significativa. Estima-se que no cultivo de feijão estejam envolvidos aproximadamente 295.000 produtores só em Minas Gerais (BORÉM; CARNEIRO, 2011).

O feijão apresenta variações regionais significativas quanto ao gosto e à preferência do tipo de grão (CASTELLANOS et al., 1997). Assim, em muitas regiões do Brasil há preferência pelo feijão do tipo carioca. Por isso, estão disponíveis no mercado linhagens e ou cultivares com grão do tipo carioca que diferem, principalmente, quanto à tonalidade da cor creme do tegumento.

2.2 Tempo de cocção do feijão

O desenvolvimento de cultivares de feijão adaptadas a regiões de cultivo, estáveis e com elevado potencial produtivo, tem sido o maior objetivo do melhoramento desta cultura. Contudo, para o registro de uma nova cultivar é necessário que esta preencha certas exigências de mercado, e dentre elas, tão importantes quanto à produtividade e à resistência a doenças, está a qualidade tecnológica do grão comercializado (CORRÊA et al., 2010).

As qualidades tecnológicas e nutricionais dos grãos são determinadas pelo genótipo e influenciadas pelas condições do ambiente prevaletentes durante o crescimento e desenvolvimento da planta e produção do grão (DALLA CORTE et al., 2003; KIGEL, 1999). Para esses autores, os fatores ambientais que influenciam a qualidade do grão incluem os climáticos, tais como altas

temperaturas durante o enchimento do grão, manejo da cultura, beneficiamento pós-colheita, condições de armazenamento e tecnologia de processamento.

A qualidade de grãos de feijão é determinada por fatores como aceitação pelo consumidor, características de embebição, qualidades culinárias, sensoriais e valor nutricional. É necessário enfatizar que características de aceitabilidade incluem uma ampla variedade de atributos. Dentre os quais, pode-se citar o tamanho do grão, a forma, a cor, a aparência, a estabilidade sob condições de armazenagem, as propriedades de cozimento e sabor (REYES-MORENO; PAREDES-LÓPEZ; GONZALEZ, 1993). Há preferência por grãos com melhor aptidão culinária, que reúnam aspectos positivos, tais como facilidade de embebição, menor tempo de cocção, alta expansão volumétrica do grão e grãos inteiros após o cozimento (OLIVEIRA et al., 2012). O consumidor deseja grãos com embebição rápida e reduzido tempo de cozimento; que produza caldo com boa aparência, sabor e aroma, e com tegumento fino (JACINTO-HERNANDÉZ et al., 2002). Um estudo conduzido no México, por Castellanos et al. (1997), evidenciou que os consumidores usam o tempo de cozimento como base para a seleção de tipo de feijão para o consumo.

O cozimento de feijão aumenta a digestibilidade e a biodisponibilidade dos nutrientes, visto que assegura a inativação dos elementos antinutricionais e proporciona as qualidades sensoriais demandadas pelo consumidor (THARANATHAN; MAHADEVAMMA, 2003). O termo “fator antinutricional” refere-se a compostos ou classes de compostos presentes numa variedade de alimentos de origem vegetal que, quando consumidos, reduzem o valor nutritivo desses alimentos e que em grandes quantidades podem causar reações de toxicidade (CAMPOS et al., 2011).

Com objetivo de estudar o efeito do cozimento no teor de nutrientes e fatores antinutricionais, Ramírez-Cárdenas, Leonel e Costa (2008) trabalharam com cinco cultivares de feijão comum: branco (Ouro Branco), negro (Diamante

Negro) e marrom rajado (BRS Radiante, Pérola e Talismã) e observaram que o processo de cozimento reduziu o teor de taninos e fitatos. Esses autores observaram ainda, que o cozimento também provocou um aumento no teor de fibra alimentar insolúvel e redução de fibra alimentar solúvel em relação às cultivares cruas.

Deve ser comentado que, o tempo de cozimento de feijão é o período necessário para que os grãos atinjam um grau de maciez aceitável pelo consumidor. Vários fatores interferem na capacidade de cozimento do feijão como: armazenamento, absorção de água e as propriedades de tegumento (PAULA; RAMALHO; ABREU, 2004) e a interação genótipos por ambientes (JACINTO-HERNANDEZ et al., 2003; KIGEL, 1999).

2.2.1 Efeitos do armazenamento no tempo de cocção

Durante o armazenamento ocorre uma deterioração gradual, irreversível e cumulativa, cuja velocidade depende do ambiente, do produto em si e de sua condição no início da estocagem. A temperatura de armazenamento e a atividade da água no feijão são fatores chave na velocidade e na perda de qualidade (PAULA, 2004).

O armazenamento prolongado do feijão sob condições adversas, especialmente à temperatura elevada e umidade relativa alta, que predominam nas regiões tropicais, promove o defeito hard-to-cook (HTC) “difícil de cozinhar” (GARCIA et al., 1998; KIGEL, 1999). Esta alteração no grão aumenta o tempo, energia e água necessários para a preparação do feijão (BALAMAZE et al., 2008; KIGEL, 1999). Como consequência, o fenômeno HTC reduz a qualidade estrutural do produto final, e, finalmente, a aceitação pelo consumidor (STANLEY; AGUILERA, 1985).

O efeito das condições de armazenamento vem sendo estudado há algum tempo. Jackson e Varriano-Marston (1981) armazenaram feijão preto por 7 e 14 dias a 41 °C, com 100% de umidade relativa e observaram que foi necessário mais tempo de cocção do que cozinhar feijão fresco. Contudo, o tempo de cozimento foi similar ao necessário para o feijão armazenado por mais de 1 ano em temperatura ambiente.

Várias causas são sugeridas para explicar o desenvolvimento do fenômeno HTC, entre elas a formação de pectatos insolúveis, lignificação da lamela média, oxidação ou polimerização lipídica, ligações cruzadas de proteínas hidrolisadas e/ou compostos polifenólicos (GARCIA et al., 1998).

O material utilizado para a conservação do feijão influencia no fenômeno hard-to-cook. Desse modo, Balamaze et al. (2008) com objetivo de investigar a influência da variedade de feijão, teor de umidade e recipientes de armazenamento no desenvolvimento do defeito HTC concluíram que o aumento desse fenômeno foi maior para grãos armazenados em sacos de polipropileno e baldes de plástico, enquanto o feijão armazenado em sacos de sisal e em potes de cerâmica teve menor aumento. Para esses autores, o recipiente utilizado está mais diretamente associado à acumulação da umidade do que com a variação da temperatura. Por exemplo, o armazenamento em sacos de sisal manteve a temperatura em torno de 25°C e umidade relativa a 74%, o que permitiu o equilíbrio da temperatura e umidade relativa do ar nos sacos com a do ambiente, controlando, por conseguinte, o desenvolvimento do defeito HTC, mais do que outros recipientes. Na sequência, o pote de cerâmica manteve a temperatura por volta de 22°C e a umidade relativa de 93%, os sacos de polipropileno (temperatura de 25,8°C e umidade relativa de 80 %) e balde de plástico (temperatura de 27,9 ° C e umidade relativa de 84%).

A perda de capacidade de cozimento em grãos de feijão armazenados sob condições de alta temperatura e de alta umidade provavelmente resulta de

uma diminuição do fósforo, ácido fítico e alterações na proporção de cátions monovalentes para cátions bivalentes no tegumento (MOSCOSO; BOURNE; HOOD, 1984).

2.2.2 Correlação entre absorção da água e o tempo de cocção

A imersão do feijão em solução aquosa constitui o passo preliminar ao cozimento. Durante a imersão ocorre a absorção da água pelo grão. De acordo com Souza (2004), esta absorção é um processo físico e varia de acordo com a permeabilidade do tegumento (espessura e permeabilidade do tegumento), temperatura (dentro de determinados limites, a absorção aumenta com a temperatura), composição química (grãos ricos em proteínas geralmente absorvem água mais rapidamente que sementes ricas em amido) e condições fisiológicas (os grãos imaturos e mais deteriorados absorvem água com maior velocidade, porque estão associados à sua maior desestruturação).

Em geral, ocorre rápida absorção de água no início da hidratação e atinge um patamar (durante as primeiras 6 horas), após este período a taxa de absorção abranda, resultado de ter atingido o ponto de saturação do grão ao fim da hidratação (BRESSANI, 1993; MOSCOSO; BOURNE; HOOD, 1984). A quantidade de água absorvida pelo feijão está associada à umidade inicial do grão. Existe correlação forte e positiva ($r = 0,94$) entre o teor de umidade inicial dos grãos e a taxa de absorção de água durante a primeira hora de imersão (MOSCOSO; BOURNE; HOOD, 1984), indicando que quanto maior o teor de umidade inicial do grão, maior será a taxa de absorção da água.

Durante a imersão dos grãos de feijão em água, enzimas da parede celular tornam-se hidratadas e ativadas para começar a hidrólise da pectina e outros polissacarídeos da parede celular, afetando mais a absorção de água. Este tipo de ativação da enzima tem contribuído para reduzir significativamente a

quantidade de tempo de processamento térmico necessário para atingir a qualidade ideal da textura do grão (MATELLA; MISHRA; DOLAN, 2013; MOSCOSO; BOURNE; HOOD, 1984).

A hidratação dos grãos é uma propriedade importante e básica para cozimento. Além de amolecimento das sementes, a água participa em processos de transferência de calor e em reações químicas tais como a desnaturação de proteínas e a transformação do amido em gelatina. A penetração de água encontra pelo menos três estruturas físicas do grão de feijão. O primeiro é o revestimento da semente, o segundo é a lamela média, que mantém as células individuais em conjunto, e o terceiro, a parede celular da célula (BRESSANI, 1993).

O processo de cozimento de feijão envolve pelo menos duas etapas: a absorção de água a uma condição de equilíbrio com a água livre, seguida por amolecimento da textura pelo calor (JACKSON; VARRIANO-MARSTON, 1981). Por isso, a capacidade de cocção tem sido associada à absorção da água pelos grãos antes do cozimento. Estudos prévios relataram que existe correlação forte e negativa entre o tempo de cocção e a capacidade de hidratação, sugerindo a utilização da absorção de água como critério de seleção indireta para o tempo de cozimento (COELHO et al., 2009; CORRÊA et al., 2010; ELIA, 2003; ELIA et al., 1997). Entretanto, nem sempre a maior capacidade de hidratação dos grãos indica menor tempo de cocção (BALDONI; SANTOS, 2005; DALLA CORTE et al., 2003), sendo que, neste último caso, o tempo de cozimento deve ser avaliado para fins de seleção de linhagens.

Além da hidratação, a busca por feijão com reduzido tempo de cocção tem viabilizado o planejamento de métodos alternativos, tais como a hidratação em soluções salinas. Aguilera e Rivera (1992) e Bertoldo et al. (2008) verificaram que a hidratação do feijão em solução salina promove uma boa

redução do tempo de cozimento. No entanto, o uso de sal para diminuir o tempo de cozimento pode trazer consequências nefastas à saúde humana.

Diante do exposto, o programa de melhoramento objetivando o desenvolvimento de cultivares com aceitação comercial deve considerar a seleção de genótipos que apresentem o tempo de cocção reduzido. Para o Brasil, tendo em consideração as mudanças no cotidiano, o tempo de preparo do feijão deve ser reduzido, no sentido de atender parte da população que não encontra disponibilidade de tempo para um cozimento prolongado. Além disso, Kigel (1999) relata que períodos prolongados de cozimento resultam em mudanças estruturais em nível celular, provocando perdas de nutrientes.

Com objetivo de determinar os mecanismos moleculares envolvidos na redução do tempo de cozimento com a absorção de água, Martínez-Manrique et al. (2011) avaliaram alterações nos polissacarídeos pécticos e nas enzimas da parede celular. Constataram o aumento da atividade de enzimas da parede da célula (ramnogalacturonase, galactanase e poligalacturonase), que resultaram na diminuição da ramnose e da atividade da poligalacturonase, ambas com correlação alta e significativa ($p=0.01$) com menor tempo de cozimento após imersão, de $r = 0,933$ e $r = 0,725$, respectivamente.

O fenômeno “hardshell” (casca dura) ocorre quando os grãos maduros e secos não absorvem água dentro de um período razoavelmente longo, quando hidratados. Este fenômeno é acelerado quando o armazenamento ocorre em ambientes de baixa umidade relativa e alta temperatura (BERRIOS; SWANSON; CHEONG, 1999; STANLEY, 1992). O defeito “hardshell” pode ser reversível, particularmente em culturas colhidas recentemente, e irreversível, durante o prolongado armazenamento (PIRHAYATI; SOLTANIZADEH; KADIVAR, 2011). Por sua vez, o defeito HTC ocorre quando os grãos requerem um tempo de cozimento prolongado para amolecerem, ou não amolecem, mesmo depois de um cozimento prolongado (REYES-MORENO; PAREDES-

LÓPEZ; GONZALEZ, 1993). O fenômeno HTC reduz a taxa de absorção de água, causando, durante a embebição, perda de sais, e é acelerado por uma elevação da temperatura e umidade baixa (BERRIOS; SWANSON; CHEONG, 1999; STANLEY, 1992; STANLEY; AGUILERA, 1985). O defeito HTC é basicamente reversível, desde que os grãos sejam armazenados em condições desejáveis tais como baixa temperatura e umidade sem efeito direto da radiação e a imersão dever ser realizada em soluções de cátions monovalentes (PIRHAYATI; SOLTANIZADEH; KADIVAR, 2011).

2.2.3 Efeito do tegumento e cotilédones no tempo de cozimento

Comparando os tempos de cozimento de amostras de feijão intactas e descascadas Jackson e Varriano-Marston (1981) observaram que o tegumento é a principal barreira para o amaciamento de feijão durante o cozimento. Esses autores constataram, ainda, a ocorrência de alterações no cotilédone durante o armazenamento. Estas alterações representam um aumento em 45-60% do tempo de cozimento do feijão intacto armazenado por 14 dias, 55 dias e 1 ano. Outro fato relatado por esses autores foi que o feijão armazenado por mais de 55 dias não cozia quando inteiro, já quando foi removido o tegumento, apresentou o tempo de cozimento de 120 minutos.

A influência dos constituintes do grão no cozimento do feijão foi estudada por Ribeiro, Ramalho e Abreu (2006). Esses autores avaliaram os genitores, as gerações F_1 , F_2 , F_3 dos cruzamentos: CI-107 x Carioca-80, CI-107 x Amarelinho e CI-107 x G2333 e seus respectivos recíprocos. Os resultados obtidos confirmaram a ocorrência do efeito materno na expressão do caráter, isso porque o tegumento foi o principal constituinte do grão de feijão responsável pelo cozimento.

O feijão perde rapidamente o valor comercial após a colheita, devido, principalmente, ao escurecimento do tegumento e ao aumento no tempo necessário para o cozimento (BRESSANI, 1993). Além disso, os consumidores associam a cor do grão com o prolongado tempo de cozimento. Portanto, qualquer tipo de feijão com escurecimento precoce do grão é considerado velho e difícil de cozinhar (ARAÚJO; RAMALHO; ABREU, 2012). Os mesmos autores encontraram uma correlação genética e fenotípica, respectivamente, de 0,87 e 0,69 entre o escurecimento do grão e o tempo de cozimento aos 60 dias após a colheita, o que sugere que o escurecimento do grão pode ser uma característica auxiliar para a seleção indireta do tempo de cocção.

2.2.4 Controle genético do tempo de cocção do feijão

Vários estudos revelaram a existência da variabilidade genética no feijão para o tempo de cocção (CORRÊA et al., 2010; ELIA, 2003; ELIA et al., 1997). Além disso, Elia (2003) e Jacinto-Hernandez et al. (2003) estimaram herdabilidades no sentido restrito de 90% e 78%, respectivamente. A magnitude alta da herdabilidade deste caráter sugere a possibilidade de ganhos consideráveis com a seleção. Entretanto, também foram relatadas herdabilidades variando de 13,78% a 70,35%, devido à interação genótipos por ambientes (GARCIA et al., 2012).

Elia (2003) e Elia et al. (1997), avaliando 16 cultivares divergentes de feijão em duas épocas de cultivo, elucidaram que esse caráter é controlado por poucos genes, com efeitos genéticos aditivos e de dominância parcial, sendo os aditivos os mais expressivos. Esse estudo e o trabalho realizado por Paula, Ramalho e Abreu (2004) evidenciaram que este caráter tem efeito materno, portanto, depende do tegumento do grão. Assim, o genitor feminino utilizado vai influenciar na expressão do caráter na descendência.

Outros estudos visando determinar o controle genético deste caráter foram realizados por Jacinto-Hernandez et al. (2002, 2003). Para isso, realizaram cruzamentos entre Bayo Mecentral (BM) com Bayo Victoria (BV) de curto e longo tempo de cozimento, respectivamente e, avaliaram 104 linhagens resultantes. Essas linhagens foram avaliadas por três gerações consecutivas, a partir da F₆ até a F₈, juntamente com os genitores quanto ao tempo de cozimento. Esses autores observaram que nas três gerações a distribuição da frequência foi contínua e que a maioria dos genótipos teve tempos de cozimento semelhantes aos do genitor de menor tempo de cozimento. Segundo esses autores, isto sugere que a sua contribuição para o tempo de cozimento era dominante.

Além disso, Jacinto-Hernandez et al. (2003) concluíram que o caráter tempo de cozimento é oligogênico, sendo controlado por dois genes. Garcia et al. (2012) mapearam características quantitativas (QTLs) para tempo de cocção, tendo identificado seis regiões do genoma do feijão que contribuem para a expressão deste caráter, reforçando o fato de este caráter ser oligogênico.

2.3 Marcadores moleculares de DNA

Para que um programa de melhoramento registre progresso é fundamental que o melhorista consiga selecionar genitores e identificar genótipos superiores em populações segregantes. Os marcadores genéticos podem ser uma ferramenta preciosa para discriminar genótipos através de diferenças nas suas características genéticas. Estes marcadores podem ser classificados em morfológicos e moleculares (enzimáticos e de DNA). Segundo Alzate-Marin et al. (2005), marcadores moleculares do DNA são segmentos de DNA que estão fisicamente ligados a locos ou até mesmo dentro de regiões que determinam características de interesse.

Marcadores de DNA foram primeiramente empregados no melhoramento de plantas no início da década de 1980, com a descoberta do marcador RFLP por Botstein et al. (1980). Nessa altura, a utilização de marcadores moleculares no melhoramento era limitada devido a custos proibitivos relacionados a infraestruturas, equipamentos e falta de pessoal qualificado, principalmente em países em desenvolvimento (RIBAUT; VICENTE; DELANNAY, 2010). As inovações em tecnologias de sequenciamento de DNA estão tornando mais rápido e mais barato, o processo da análise de locos de características quantitativas (QTLs) e abordagens da seleção assistida por marcadores. Além disso, os avanços tecnológicos neste domínio contribuem para que os marcadores moleculares sejam cada vez mais utilizados no processo de melhoramento, com o objetivo de acelerá-lo e melhorar sua precisão (BOOPATHI, 2013; FRANCIA et al., 2005; RASMUSSEN; PARSONS; JONES, 2012; XU; CROUCH, 2008).

Os marcadores de DNA podem ser evidenciados por métodos que combinam o uso de enzimas de restrição e hibridação entre sequências complementares de DNA, como no caso de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP - “*Restriction Fragment Length Polymorphisms*”) ou pela técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR - “*Polymerase Chain Reaction*”). O grande potencial do uso destes marcadores reside no fato de serem praticamente ilimitados em número. Após serem encontrados, são de fácil detecção e se comportam como “caracteres” de herança simples e previsível. Além disso, são neutros, não sendo afetados pelo ambiente (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Os marcadores mais referenciados na literatura são: “polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (“RFLP” - *Restriction Fragment Length Polymorphisms*”); polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (“RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*”), polimorfismo de comprimento de

fragmentos amplificados (“AFLP - *Amplified Fragmente Length Polymorphisms* AFLPs”), sequências simples repetidas (“SSR - *Single Sequence Repeats* (SSRs) ou, simplesmente, microssatélites e polimorfismos de um nucleotídeo (“SNPs - *Single Nucleotide Polymorphisms*”).

Cada tipo de marcador apresenta vantagens e desvantagens e a utilização de um ou de outro vai depender, entre outros fatores, do objetivo do estudo, da infraestrutura disponível, dos recursos financeiros para o investimento, da disponibilidade de recursos humanos com treinamento apropriado e do nível de conhecimento da genética molecular da espécie a ser estudada (FALEIRO, 2007). Entre os marcadores, o SSR vem sendo amplamente usado, principalmente pela facilidade de sua reprodução.

Os microssatélites consistem de pequenas sequências com 1 a 6 nucleotídeos de comprimento, repetidas em tandem (XU, 2010). As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre indivíduos de uma mesma espécie, permitindo seleção de primers específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo. O polimorfismo detectado através de microssatélites resulta da permuta desigual ou o escorregamento durante a replicação do DNA, causando inserções/deleções (CAIXETA et al., 2009). Geralmente, os microssatélites identificam um único loco no genoma e, por sua alta taxa de mutação, são frequentemente multialélicos, além de segregarem de modo codominante (BRAMMER, 2000; XU, 2010).

A análise de RAPD envolve o emprego da PCR. A PCR é baseada na amplificação enzimática de um fragmento de DNA flanqueado por dois primers hibridizados em fitas de DNA opostas. Ciclos repetitivos de desnaturação, anelamento dos primers e extensão do DNA resultam na amplificação do DNA alvo (ALZATE-MARIN et al., 2005). Os primers são oligonucleotídeos de até 20 ou 25 bases que servem de iniciação para a síntese de DNA pela enzima Taq

polimerase. A técnica de RAPD é caracterizada pela utilização de primers com sequências aleatórias (portanto, sua sequência alvo é desconhecida) com tamanho ao redor de 10 bases. Desta forma, sempre que o genoma do indivíduo a ser analisado apresentar uma sequência de nucleotídeos correspondentes ao do primer, o processo de amplificação será iniciado, sendo que diferenças ao nível de DNA são inferidas pela presença ou ausência de um determinado fragmento amplificado (BERED; BARBOSA NETO; CARVALHO, 1997; SCHLÖTTERER, 2004), portanto, o RAPD apresenta herança do tipo dominante.

A baixa temperatura necessária para a ligação do primer ao DNA molde torna o sucesso do uso do RAPD bastante dependente das condições de amplificação, fato que pode impedir que dados sejam comparados entre diferentes laboratórios (REITER, 2001). Para contornar essa limitação, marcadores RAPD podem ser transformados em marcadores denominados por regiões amplificadas caracterizadas por sequências (SCAR - “Sequence Characterized Amplified Regions”). Neste caso, a banda de DNA correspondente ao marcador RAPD é clonada, sequenciada, e dois “primers” mais longos que o original são identificados. Os marcadores SCARs são sintetizados e utilizados para amplificar o mesmo marcador, só que agora numa temperatura de anelamento mais elevada. Nessa condição, o processo de amplificação é mais estável e reprodutível (PARAN; MICHELMORE, 1993).

Em feijão, Jacinto-Hernandez et al. (2003) identificaram marcadores RAPD ligados a QTLs associados ao tempo de cozimento, o que sugere o uso destes marcadores para a seleção assistida desta característica.

2.3.1 Mapeamento genético de QTLs

A identificação de marca fisicamente situada perto ou dentro do gene de interesse permite implementar a seleção assistida por marcadores (SAM), ou seja, selecionar marcas polimórficas associadas ao gene de interesse. O mapeamento de alelos associados a características qualitativas ou características cujos fenótipos observados apresentam segregações Mendelianas (3:1; 1:2:1; 1:1) é bastante simples. Neste caso, a cossegração do fenótipo e os marcadores são analisados diretamente, ou seja, a característica qualitativa é considerada como se fosse um marcador (FALEIRO, 2011). O resultado desse tipo de mapeamento são distâncias em centiMorgan (cM) entre os marcadores moleculares e o gene associado à característica qualitativa. No caso de mapeamento de genes associados a características quantitativas (QTLs), o resultado será a porcentagem da variação fenotípica da característica de interesse explicada pelos marcadores moleculares de forma isolada e conjunta (FALEIRO, 2011; SEMAGN; BJØRNSTAD; XU, 2010).

A correlação genética entre o marcador molecular e a característica principal é definida pelo mapeamento genético. O mapa genético fornece a localização da marca no genoma e a distância relativa entre a marca e o alelo de interesse. Com base em trabalhos de mapeamento genético, já foram identificados vários marcadores moleculares associados tanto a locos para características de herança qualitativa quanto a locos para QTLs.

O desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares na análise genética de espécies, e, potencialmente, no melhoramento de plantas. No contexto de melhoramento de plantas, mapas genéticos possibilitam: (1) a cobertura e análise completa de genomas; (2) a decomposição de características genéticas complexas nos seus componentes mendelianos; (3) a quantificação do

efeito destas regiões genômicas que controlam caracteres de importância; (4) a quantificação do efeito destas regiões na característica estudada e; (5) a canalização de toda esta informação para uso em programas de melhoramento, principalmente pensando na seleção assistida por marcadores moleculares (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Assim, dois requisitos básicos são necessários para o desenvolvimento de um mapa genético: (1) reprodução sexuada e produção de descendência; (2) uma fonte de marcadores moleculares com comportamento mendeliano. A construção de um mapa contempla um grande número de técnicas que incluem o desenvolvimento de linhagens genitoras e populações segregantes adequadas, a identificação de genótipos nos locos marcadores através de técnicas de biologia molecular, e a utilização de diversas técnicas de análise estatística e computacional para a estimativa de ligação e distância entre marcadores (COLLARD et al., 2005).

Diferentes tipos de gerações têm sido utilizados para o mapeamento de QTLs. Essas gerações podem ser plantas F_2 , F_3 ou S_1 , duplo-haplóides, linhagens endogâmicas recombinantes e retrocruzamentos entre a F_1 com o genitor 1 (RC_{11}) e com o genitor 2 (RC_{21}), (KNAPP; BRIDGES; BIRKES, 1990). Deve ser enfatizado que nos retrocruzamentos o primeiro número indica qual o genitor recorrente e o segundo, quantos retrocruzamentos efetuados. A geração F_2 e os retrocruzamentos RC_{11} e RC_{21} podem ser obtidos em poucas gerações (YOUNG, 2001). Entretanto, como o desenvolvimento destas populações requer relativamente poucas meioses, isso contribui para que mesmo os marcadores que estão longe de QTLs permaneçam fortemente associados com ele. Tais associações com marcadores distantes dificulta a localização precisa dos QTLs. Outro aspecto é que gerações F_2 e de retrocruzamentos são populações temporárias, pois são altamente heterozigóticas e não podem ser propagados indefinidamente através de

sementes, ou seja, estas populações não podem ser avaliadas várias vezes em diferentes condições ambientais, anos e locais (SEMAGN; BJØRNSTAD; XU, 2010). Para contornar esse problema as gerações F_3 , os retrocruzamentos RC_{12} e RC_{22} são recomendados (ARÚS; MORENO-GONZÁLEZ, 1993). Neste caso, a ocorrência de várias gerações de acasalamento aumenta o potencial número de eventos de recombinação e melhora a resolução do mapa, isto é, terem ocorrido meioses suficientes para reduzir o desequilíbrio entre os marcadores moderadamente ligados (SEMAGN; BJØRNSTAD; XU, 2010).

Para a escolha de genitores, deve-se considerar a necessidade de maximizar a probabilidade de detectar polimorfismo ao nível de DNA. A facilidade com a qual marcadores polimórficos são detectados varia muito com a espécie. Assim, Ferreira e Grattapaglia (1998) mencionam que espécies autóгамas, essencialmente homozigotas na grande maioria dos locos, são menos polimórficas do que espécies preferencialmente alógamas, altamente heterozigotas.

O primeiro mapa de ligação do feijão foi publicado no ano 1961, por Lamprecht. Este mapa continha 26 características morfológicas e muitos genes controlavam a cor da flor, da semente ou características relacionadas com as vagens. Desde então, até 1990, foram desenvolvidos mapas utilizando isoenzimas, proteínas de sementes e mutações induzidas. Segundo Miklas e Singh (2007), esses mapas eram rudimentares e forneciam pouca cobertura genômica e pouca utilidade para a seleção assistida por marcadores. Para esses autores, com o advento de marcadores moleculares de DNA na década de 1980, genitores muito divergentes foram utilizados para construção de mapas de forma a maximizar o polimorfismo em nível de nucleotídeos, diversidade fenotípica e variabilidade na resistência a doenças, entre outras características.

Posteriormente foram desenvolvidos mapas integrados, utilizando diferentes tipos e tamanhos de população (por exemplo, F_2 , retrocruzamentos) e tipos de marcadores (RFLP, AFLP, RAPD, SCAR). Esses mapas tinham como finalidade a localização de genes associados a vários caracteres de interesse como resistência a doenças, *fingerprintings* genômicos e estudos evolutivos.

O primeiro mapa genético molecular para o feijoeiro foi desenvolvido utilizando a população F_2 , derivado do cruzamento de BAT93 x Jalo EEP558, com base em marcadores RFLP, permitindo a cobertura de 827 cM, sendo considerado mapa núcleo para esta cultura. Os genótipos parentais foram selecionados com base em origem evolucionária, isoenzimas, e por várias características agrônômicas (NODARI et al., 1993). Mais tarde, uma nova versão mais completa do mapa foi desenvolvida por Freyre et al. (1998), incluiu 563 marcadores e cobertos 1.226 cM do genoma utilizando a mesma população de mapeamento.

Em se tratando do mapeamento do feijão para o tempo de cocção foram avaliadas 140 progênies na geração $F_{2:4}$ e $F_{2:5}$ utilizando 922 marcadores microssatélites, sendo 105 com boa amplificação e mapearam para 12 grupos de ligação, cobrindo 1.303,7 cM do genoma. Além disso, seis QTLs significativos foram encontrados em dois ambientes e explicaram entre 11,54 – 21,63% da variação fenotípica (GARCIA et al., 2012).

2.3.2 Seleção assistida por marcadores de DNA

A SAM é uma seleção indireta de características de interesse com base em marcadores moleculares. Assim, a estratégia de uso de marcadores requer conhecimento básico sobre a natureza genética do caráter estudado. Desta forma, sua utilização tem como pressuposto a identificação e ou mapeamento prévio do gene que controla o caráter e a existência de marcadores que permitam

monitorar a presença de alelos favoráveis (COLLARD et al., 2005; MORRIS et al., 2003; TORRES et al., 2010). Deve ser comentado que a SAM, além da sua utilização para características monogênicas, também é útil em características quantitativas (LANDE; THOMPSON, 1990).

Os QTLs são detectáveis quando estão em desequilíbrio de ligação com um marcador genético. O desequilíbrio de ligação refere-se ao desvio das frequências alélicas observadas em relação às frequências esperadas na segregação independente. Este fato ocorre quando existe uma associação entre locos ou entre marcadores e QTL.

As aplicações empíricas deste procedimento revelaram que o sucesso de SAM depende de vários fatores, incluindo a base genética da característica, o grau de associação entre o marcador molecular e o gene alvo, o número de indivíduos que podem ser analisados e, no caso da introgressão, o background genético em que o alelo alvo tem de ser transferido (FRANCIA et al., 2005). Em trabalho de simulação visando avaliar a seleção assistida em populações de tamanho finito, Moreau et al. (1998) constataram que a eficiência da seleção assistida é influenciada pelo tamanho da população, distância do marcador ao QTL e pela herdabilidade, ou seja, pelos parâmetros biológicos (número e efeitos dos QTLs) e aqueles dependentes apenas de condições experimentais (tamanho da população, distância entre marcadores e QTLs, e a probabilidade α de cometer o erro tipo I). A herdabilidade do caráter resulta do genótipo e das condições experimentais e pode ser incrementada pelo aumento de número de repetições de genótipos. Vale ressaltar, portanto, que nesse estudo, para um dado tamanho da população (N) e nível de significância (α), a eficiência relativa diminui com o aumento do número de QTLs.

Se um determinado marcador de fácil identificação fenotípica estiver fisicamente ligado a uma pequena distância de um gene que controla um caráter de interesse agrônômico, a seleção deste marcador resulta na seleção indireta do

gene de interesse. A eficiência deste processo de seleção indireta, baseado na segregação conjunta do marcador e do gene, é uma função da distância entre os dois expressa em probabilidade de recombinação genética (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). O princípio da seleção assistida por marcadores é a correlação genética entre a marca e os diferentes genes envolvidos no controle do caráter. A correlação genética pode ocorrer devido à pleiotropia ou à ligação. A pleiotropia ocorre quando um gene afeta mais de um caráter ao mesmo tempo. No caso dos marcadores, seria preciso que a marca estivesse dentro do gene, de modo que eles estariam sempre juntos. Assim, espera-se que os diferentes marcadores estejam ligados com os locos que contenham o alelo de interesse (RAMALHO; LAMBERT, 2004).

Para o sucesso da seleção indireta, é necessário que a herdabilidade do marcador e a correlação deste com a característica de interesse sejam altos. Como a herdabilidade dos marcadores de interesse é igual a 1, o sucesso da seleção indireta depende da identificação de marcadores moleculares altamente correlacionados com as características de interesse, ou seja, a qualidade e resolução do mapeamento gênico é a base para a seleção assistida por marcadores moleculares (FALEIRO, 2011).

Deve ser enfatizado que a eficiência da seleção assistida será tanto maior quanto mais próxima for a ligação entre marcadores e os QTLs. Assim, Guimarães et al. (2009) comentam que a seleção utilizando marcadores flanqueando o QTL é mais eficiente do que a seleção baseada em único marcador. Ganhos na ordem de 38% foram obtidos utilizando marcadores flanqueando o QTL em relação à seleção com base em único marcador, quando a distância do marcador ao QTL era de 20% de recombinação. Com 5% de recombinação, o ganho reduziu para 11% (EDWARDS; PAGE, 1994).

Existem muitos trabalhos abordando aplicação de marcadores moleculares na seleção assistida e incluem a escolha de genitores, mapeamento

genético e a atribuição de linhagens a grupos heteróticos. Os resultados variam de concretos e positivos, a controversos e pouco significativos, no que concerne a ganhos genéticos, econômicos e de eficiência quando comparados com a seleção fenotípica (TORGA, 2008).

Deste modo, podem ser listadas algumas situações em que a seleção indireta através de marcadores se torna estratégica: quando a determinação do fenótipo é complexa e ou possui custos elevados, em situações que requerem a destruição da planta (resistência de nematóide-de-cisto em raiz), que requerem quarentena ou quando se objetiva introduzir várias características simultaneamente (piramidação) (BOOPATHI, 2013). Além disso, em situações em que a análise fenotípica necessita ser realizada em fase vegetativa mais avançada (por exemplo, o tempo de cozimento do feijão), a seleção em fases juvenis pode resultar em redução significativa de tempo. Como a seleção fenotípica dos caracteres de baixa herdabilidade somente se torna eficiente em gerações mais avançadas, porque requer maior número de indivíduos para serem avaliados, a SAM pode contribuir para acelerar o ganho. Também, quando a característica é expressa em somente um sexo, a seleção assistida pode ser realizada em ambos os sexos, maximizando os ganhos com a seleção (TORGA, 2008). Revisão de cultivares lançadas em programas de melhoramento que utilizaram a seleção assistida por marcadores moleculares é apresentada por Boopathi (2013) e Xu e Crouch (2008). No caso específico do feijão, Gepts et al. (2008) mencionam as cultivares desenvolvidas com auxílio da SAM e disponibilizadas aos produtores.

Em alguns casos, a SAM não é tão eficiente quanto esperada (SHEN et al., 2001). Uma das causas para o insucesso é que as estimativas dos efeitos de QTLs, para características complexas, muitas vezes são inconsistentes (BERNARDO, 2008; HOSPITAL, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O experimento de campo foi conduzido na área experimental do Departamento de Biologia (DBI), setor de Melhoramento da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizada na região sul do estado de Minas Gerais, a 910 metros de altitude, 21°14' de latitude Sul e 45°00' de longitude Oeste. As reações de PCR, utilizando marcadores SSR e RAPD, foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular do DBI.

3.2 Linhagens utilizadas

Foram cruzadas a cultivar BRSMG-Madrepérola e a linhagem RP-2. A cultivar BRSMG-Madrepérola é proveniente do Programa conjunto de Melhoramento do Feijoeiro da UFLA, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). É resultante do cruzamento entre as linhagens AN512666-0 e AN 730031. Apresenta porte prostrado, hábito de crescimento indeterminado, tipo III, com baixa tolerância ao acamamento (ABREU et al., 2011). A linhagem RP-2 é proveniente do Programa de Melhoramento Genético de Plantas da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e apresenta porte ereto tipo II. Ambas têm grãos tipo carioca. A BRSMG – Madrepérola possui grãos com fundo creme bem claro que é preservado por longo período de tempo e menor tempo de cocção e a RP-2 apresenta grãos com fundo creme com escurecimento precoce e maior tempo de cocção (ARAÚJO; RAMALHO; ABREU, 2012).

3.3 Obtenção e avaliação fenotípica das progênies

A hibridação dos genitores para obtenção das sementes F_1 foi realizada no campo experimental da UFLA. As sementes da geração F_1 foram semeadas, a campo, para obtenção da geração F_2 . Na F_2 , 192 plantas individuais foram tomadas aleatoriamente e tiveram seu DNA extraído para seleção assistida por marcadores de DNA. Também foram tomadas aleatoriamente 97 plantas F_2 para a seleção fenotípica juntamente com as 192 das quais foi extraído o DNA. Assim, ao todo foram tomadas 289 plantas F_2 , todas foram multiplicadas a campo para a obtenção de progênies $F_{2,4}$.

Em todas as gerações o espaçamento entre linhas foi de 50 cm e densidade de semeadura de 15 sementes por metro linear. Na semeadura, a adubação utilizada foi de 300 kg/ha da fórmula 8-28-16 (N- P_2O_5 - K_2O , respectivamente). A adubação de cobertura foi realizada cerca de vinte dias após a emergência das plantas, a dosagem aplicada foi de 150 kg/ha de sulfato de amônio.

Depois da maturação fisiológica, as plantas foram colhidas e as vagens debulhadas manualmente. Após a separação de impurezas, os grãos foram acondicionados em sacos de papel e colocados por 3 dias ao sol para secar. Depois, os grãos foram armazenados em câmara fria a 12°C e retirados após 55 dias. Aproximadamente 60 dias após a colheita, as progênies foram retiradas da câmara fria e avaliadas quanto ao tempo de cocção dos seus grãos.

Para avaliar a porcentagem de cozimento de feijão foi utilizado o delineamento em látice triplo 17x 17, com dois tratamentos comuns por bloco representados pelos genitores. Nesse experimento, o grande número de progênies avaliadas e a capacidade da panela (pode comportar até 25 sacos de filó, portanto, o bloco de tamanho 17 e dois tratamentos comuns é razoável) utilizada para o cozimento foram os fatores determinantes para a escolha deste

delineamento. Desse modo, as parcelas se constituíram de 50 grãos de feijão de cada progênie. Foram avaliados 291 tratamentos, constituídos por 192 progênies $F_{2:4}$, cujo DNA foi extraído na F_2 para seleção assistida por marcadores, 97 progênies tomadas aleatoriamente para a seleção fenotípica e 2 genitores.

Em cada progênie foi retirada uma amostra contendo 50 grãos inteiros e sadios. A amostra foi acondicionada em saquinho de filó contendo a respectiva identificação e foi feito o amarrio do saquinho. Os saquinhos foram colocados em água destilada durante duas horas para hidratação. Posteriormente, os saquinhos foram dispostos no fundo da panela de pressão elétrica, de marca comercial Mondial, com capacidade de 3,5 litros, para evitar o efeito do posicionamento na discriminação das progênies. Na panela foram colocados 1,6 litros de água destilada, descartando aquela utilizada na hidratação dos grãos.

O cozimento teve a duração de 50 minutos, sendo os primeiros 20 minutos para a estabilização da pressão, segundo recomendações do fabricante da panela. Após o cozimento e liberação da pressão da panela, as amostras foram retiradas e deixadas esfriar em bancada por 5 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, 20 grãos cozidos e inteiros foram tomados aleatoriamente e colocados no aparelho de Mattson, conforme o método proposto por Carvalho (2013). Em geral, têm sido utilizados 25 grãos, o correspondente ao número de hastes do aparelho, contudo, tem havido dificuldades de colocar grãos no centro. Os pinos foram colocados simultaneamente sobre os grãos, em seguida, foram contados e registrados os grãos atravessados completamente pelas hastes. A porcentagem de cozimento foi obtida pela divisão do número de grãos perfurados por 20 e multiplicados por 100.

3.4 Extração de DNA e seleção assistida com marcadores de DNA

Foi extraído o DNA de 192 plantas F_2 que originaram as progênes $F_{2,4}$ e dos genitores BRSMG Madrepérola e RP-2, de acordo com os procedimentos utilizados por Rodrigues e Santos (2006).

Cerca de 2 gramas de folhas jovens de cada planta F_2 foram maceradas em nitrogênio líquido e acrescidas de 10 ml de tampão de extração CTAB a 65°C em um almofariz. O tampão é composto por 2% de CTAB, 100 mM de TRIS (pH 8,0), 1,4M de NaCl e 1% de polivinilpirrolidona (PVP). Assim, a suspensão foi transferida para um tubo falcon de 50 ml e incubada por cerca de 30 minutos em banho-maria a 65°C. Nesse período, o material macerado foi homogeneizado a cada 10 minutos.

A primeira extração de DNA foi realizada com a adição de clorofórmio: álcool isoamil, na proporção de 24:1 em um volume de 10 ml. O tubo de centrífuga foi agitado suavemente para a homogeneização da suspensão. Neste estágio, as fases orgânicas e aquosas foram separadas através da centrifugação, a 10.000 rpm durante 5 minutos, e coletado o sobrenadante. Em seguida, os ácidos nucleicos foram precipitados, em uma mistura de 30 ml de álcool 95%: acetato de amônia 7,5M (6:1), por 24 horas no freezer, a -20°C. Após a precipitação, os ácidos nucleicos foram transferidos para tubos de microcentrífuga e centrifugados novamente. O sobrenadante foi descartado e o pellet deixado em temperatura ambiente para secagem. Depois de secos, os ácidos nucleicos foram hidratados de novo em tampão TE (1mM TRIS e 0,1mM EDTA).

Na segunda extração foi misturado o fenol: clorofórmio: álcool isoamil (25:24:1), ao que seguiu a separação da fase orgânica da aquosa através da centrifugação a 14000 rpm por 5 minutos, coletando-se o sobrenadante para um microtubo de 2 ml. Em um novo tubo, à fase aquosa, foi acrescentado clorofórmio: álcool isoamil, na proporção de 24:1 e, realizada a centrifugação. O

sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo de 2 ml. O sobrenadante foi precipitado pela adição de pelo menos três volumes de uma mistura de acetato de sódio 3M: etanol 95% (1:20), por pelo menos uma hora no freezer, a -20 °C. Após a precipitação e secagem do DNA, este foi hidratado de novo em tampão TE e quantificado em eletroforese horizontal em gel de agarose 1% utilizando-se marcadores de DNA com concentrações conhecidas. O material quantificado foi diluído em água pura para a concentração de 10 ng/μL para ser utilizado na PCR de microssatélites e RAPD.

Deve ser enfatizado que os 12 marcadores, dos quais 11 microssatélites e um RAPD, utilizados neste trabalho foram identificados por Garcia et al. (2012) e Jacinto-Hernandez et al. (2003), respectivamente, como ligados a QTLs associados ao tempo de cozimento do feijão (ver Tabela 1A, anexo). Desse modo, esses marcadores foram utilizados nos genitores, em PCR, a fim de identificar a ocorrência de polimorfismo. Os marcadores polimórficos nos genitores foram também utilizados em 192 plantas F₂. Os *primers* foram sintetizados pela Invitrogen Brasil.

Para cada reação foram utilizados 20 mg de DNA genômico, 100 μM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1U de taq DNA polimerase, tampão (composto de 50 mM de TRIS pH 8,3, 20 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 0,25% de ficol 400, 10 mM de tartrazine) e água pura, para perfazer o volume final 12 μl para cada reação.

A amplificação dos microssatélites foi realizada em termociclador modelo Mastercycler Eppendorf, utilizando o programa: dois minutos a 95°C para a desnaturação inicial do DNA genômico; 20 segundos para anelamento do primer, a temperaturas que variaram de 48°C a 60°C de acordo com o primer; 20 segundos a 72°C para síntese de DNA; 25 ciclos a 20 segundos, à temperatura de 94°C para desnaturação do DNA; 20 segundos para anelamento do primer, 20 segundos a 72°C para síntese de DNA e 5 minutos de extensão final a 72°C. Os

produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata e fotografado com câmera digital.

As reações de RAPD foram realizadas de acordo com Jacinto-Hernandez et al. (2003), com algumas modificações que consistiram no volume final de 12 µl para cada reação. Assim, a amplificação foi realizada em um termociclador modelo Labnet MultiGene, seguindo o programa: um ciclo de desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos; três ciclos envolvendo a desnaturação a 94°C durante 15 segundos, o anelamento a 37°C por um minuto e a extensão a 72°C durante dois minutos; seguidos de 36 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 94°C, 15 segundos de anelamento a 37°C, 2 minutos de extensão a 72°C; e a extensão final teve duração de 5 minutos a 72°C. Os produtos de amplificação foram resolvidos por electroforese em gel de agarose de 1,5% (w/v), por três horas, e corados com brometo de etídio a 0,5 µg/ml. A visualização foi feita por meio de transluminador de luz ultra-violeta de marca Fotodyne e as fotografias foram obtidas através da câmera digital Kodak.

3.5 Análise dos dados

Depois de verificar os pressupostos de normalidade das distribuições de erros pelo teste de Shapiro-Wilk, os dados da porcentagem de cozimento do feijão foram transformados para arcosseno, utilizando a fórmula 1.

$$\text{arco seno}\left(\sqrt{\frac{X}{100} * \frac{180}{\pi}}\right) \quad (1)$$

Onde:

X é a porcentagem de grãos cozidos e atravessados pelo pino;

Π é uma constante.

Algumas progênies apresentaram 0% e 100% de grãos cozidos, nesta situação, os dados foram substituídos por $(\frac{1}{4n})$ e $(100 - \frac{1}{4n})$, respectivamente, de acordo com Parsad (2003). O n corresponde ao número total de grãos submetidos ao cozimento por progênie e levados ao aparelho de Mattson para serem avaliados. Neste caso, n é igual a 20 grãos.

Depois de observados os pressupostos da normalidade da distribuição de erros, os dados foram submetidos à análise de variância considerando todos os efeitos do modelo como aleatórios, exceto a média, a repetição e os tratamentos comuns. A análise estatística dos dados foi feita como auxílio do *software* estatístico SAS (CARY, 2013). O modelo adotado foi:

$$Y_{ijk} = m + r_k + t_{i(jk)} + b_{j(k)} + bt_{ki'} + e_{ijk}$$

Onde:

Y_{ijk} : valor observado da porcentagem de cozimento da progênie i , no bloco j da repetição k ;

m : efeito fixo e corresponde à média geral do experimento;

r_k : efeito fixo da repetição k , tal que $k = 1, 2, 3$;

$t_{i(jk)}$: efeito aleatório da progênie i (tratamento regular) dentro do bloco j e na repetição k , tal que $i = 1, 2, 3, \dots, 289$;

$b_{j(k)}$: efeito aleatório do bloco j dentro da repetição k , sendo $j = 1, 2, \dots, 17$;

$bt_{ki'}$: efeito aleatório da interação entre o tratamento comum i' e a repetição k e o , sendo $i' = 1, 2$;

e_{ijk} : efeito aleatório do erro experimental associado à observação Y_{ijk} , assumindo que os erros são independentes e normalmente distribuídos com média zero e variância comum σ_e^2 .

Para estimar a precisão experimental, além do coeficiente de variação, foi calculada a acurácia seletiva (\hat{r}_{gg}), por meio da expressão apresentada por Resende e Duarte (2007):

$$\hat{r}_{gg} = \sqrt{\left(1 - \frac{1}{F}\right)} \quad (2)$$

Em que:

F: é o teste de Snedecor, em nível de significância ($\alpha = 5\%$).

Com base nas esperanças dos quadrados médios da análise de variância foram estimados os seguintes parâmetros genéticos e fenotípicos:

Variância genética entre progênies

$$\sigma_p^2 = \frac{QM_{Prog} - QM_{Erro}}{r} \quad (3)$$

Onde:

σ_p^2 : estimativa da variância genética entre progênies;

QM_{Prog}: quadrado médio entre progênies;

QM_{Erro}: quadrado médio do erro;

r: número de repetições.

Foi estimado também o intervalo de confiança para esses componentes, a 5% de probabilidade, por meio da estimativa de suas variâncias como proposto por Wricke e Weber (1986), utilizando as seguintes expressões:

$$\frac{g_1 \sigma_p^2}{\chi_{\alpha/2}^2} < \sigma_p^2 < \frac{g_1 \sigma_p^2}{\chi_{1-\alpha/2}^2}$$

g_1 : número de graus de liberdade associados à estimativa,

$\chi^2_{\alpha/2}$ e $\chi^2_{1-\alpha/2}$: valores da distribuição teórica de χ^2 para g_l graus de liberdade, no nível de probabilidade igual a 5%.

A herdabilidade (h_a^2) da capacidade de cozimento, pela expressão proposta por Falconer e Mackay (1996):

$$h_a^2 = \frac{\sigma_p^2}{\sigma_F^2} \quad (4)$$

Onde:

σ_p^2 : é a variância genética de progênies;

σ_F^2 : corresponde a variância fenotípica das progênies.

A variância fenotípica, obtida pela fórmula:

$$\sigma_F^2 = \frac{QMProg}{r} \quad (5)$$

Os intervalos de confiança da herdabilidade foram estimados através das expressões propostas por Knapp, Stroup e Ross (1985).

$$LI = \left\{ 1 - \left[\left(\frac{QMProg}{QMErro} \right) F_{1-\frac{\alpha}{2}; v_2; v_1} \right]^{-1} \right\}$$

$$LS = \left\{ 1 - \left[\left(\frac{QMProg}{QMErro} \right) F_{\frac{\alpha}{2}; v_2; v_1} \right]^{-1} \right\}$$

Em que:

LI e LS: limites inferior e superior, respectivamente, da estimativa de herdabilidade;

F : valor tabelado a $1 - \alpha/2$ e $\alpha/2$, em que $\alpha = 0,05$;

ν_1 e ν_2 : graus de liberdade de QMProg e QMErro, respectivamente.

3.6 Estimativa do ganho com a seleção fenotípica

O ganho com a seleção, na média de progênies, para a porcentagem de cozimento do feijão foi estimado por meio da expressão:

$$GS = ds \times h^2 \quad (6)$$

Em que:

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

h^2 : herdabilidade no sentido amplo da porcentagem de cozimento.

3.7 Estimativa do ganho com a seleção assistida por marcadores moleculares

O ganho com a seleção assistida por marcadores foi estimado de duas maneiras: a primeira, por meio de um índice para a seleção assistida (I) de acordo com Stromberg, Dudley e Rufener (1994), a segunda estimativa obtida através da intensidade de seleção derivada pela expressão proposta por Hamblin e Zimmermann (1986).

Para obter a estimativa de I foram utilizadas 192 progênies que tiveram seu DNA extraído na geração F_2 . Nesse índice, cada marcador foi considerado como se fosse uma característica em um índice de seleção convencional. O vetor com os valores do índice I para cada uma das progênies foi estimado pela seguinte expressão:

$$I = MQ \quad (7)$$

Em que:

M: É a matriz com “n” linhas (número de progênie) e “m” colunas (número de marcadores). O valor de cada progênie para determinado marcador corresponde à média da porcentagem de cozimento de todos os indivíduos que apresentem o mesmo genótipo do marcador;

Q: Corresponde a um vetor coluna de pesos associados com cada marcador utilizado com “m” linhas. Os pesos foram determinados através do teste F.

Uma vez disponíveis os dados de I para cada progênie, foi efetuada a seleção daquelas progênie que apresentaram os maiores valores de I. Foi estimado o coeficiente de determinação R_m^2 do modelo, através da análise de regressão linear *forward* utilizando o pacote estatístico SAS (CARY, 2013). O coeficiente de determinação foi utilizado na expressão do ganho esperado com a SAM. O ganho com a SAM foi estimado pela expressão:

$$GS_{SAM\ 1} = ds_m \times R_m^2 \quad (8)$$

Onde:

ds_m : é o diferencial de seleção utilizando intensidade de seleção de 10%, dado pela diferença entre a média das progênie selecionadas pelo índice de seleção (I) e a média geral das progênie;

R_m^2 : É o coeficiente de determinação.

Visando observar qual método foi mais eficiente para a seleção de progênie para a capacidade de cozimento de grãos foi feita a comparação entre o ganho com a SAM e o ganho obtido com a seleção fenotípica. Desse modo, foi

aplicada a intensidade de seleção de 10% das progênies para maior porcentagem de cocção e comparados com 10% das melhores progênies da avaliação fenotípica.

A segunda forma utilizada para estimar o ganho com a SAM foi por meio da intensidade de seleção obtida pela expressão de coincidência proposta por Hamblin e Zimmermann (1986):

$$E(\%) = \frac{Y-A}{X-A} \times 100 \quad (9)$$

Nessa expressão:

E: é a porcentagem de coincidência de progênies selecionadas por marcas e pelo fenótipo.

Y: é o número de progênies selecionadas por marcadores que apresentaram maior número de marcas favoráveis e que coincidiram com progênies da seleção fenotípica. Portanto, o Y fornece a intensidade de seleção, com a qual foi estimado o ganho com a seleção assistida pelo método de coincidência.

X é o número total de plantas selecionadas fenotipicamente;

A: refere-se a 5% do valor de X. Portanto, o A é assumido ser o número de coincidências, entre as duas estratégias, que ocorra por acaso.

Em posse do diferencial de seleção foi estimado o ganho com a seleção assistida por marcadores, pela expressão:

$$GS_{SAM\ 2} = ds_{SAM\ 2} x h^2 \quad (10)$$

Onde:

h^2 é a herdabilidade no sentido amplo determinada em nível de média das progênies.

3.8 Eficiência da Seleção assistida por marcadores

A eficiência da SAM para a porcentagem de cozimento de feijão foi determinada pela seguinte expressão:

$$Es(\%) = \frac{GS_{SAM}}{GS} \times 100 \quad (10)$$

Em que:

GS_{SAM} : ganho com a SAM que pode obtido pelo índice para a seleção assistida (I) de acordo com a expressão 8 de Stromberg, Dudley e Rufener (1994), ou pela intensidade de seleção obtida por meio da expressão 9 proposta por Hamblin e Zimmermann (1986), assim esses ganhos têm a denominação $GS_{SAM 1}$ e $GS_{SAM 2}$, respectivamente. Na expressão 8 a intensidade de seleção é fixada pelo melhorista e na expressão 9 a intensidade de seleção é variável e dependerá do número de progênies com maior número de marcas favoráveis.

GS: ganho esperado com a seleção fenotípica em nível de média das progênies.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação fenotípica

Na Tabela 1 é apresentado o resumo da análise de variância da porcentagem de cozimento de grãos de feijão, em látice, com e sem emprego dos tratamentos comuns nos blocos. Depreende-se que com ou sem o uso dos tratamentos comuns o coeficiente de variação (CV) foi baixo e a acurácia (r_{gg}) alta, indicando boa precisão experimental.

Em ambos os casos, com e sem emprego dos tratamentos comuns, o látice aumentou a precisão experimental na discriminação dos efeitos dos tratamentos quando comparado com o delineamento em blocos casualizados (DBC). Com efeito, o uso do látice com tratamentos comuns foi 2% mais eficiente, já sem o uso dos tratamentos comuns o látice apresentou a eficiência de 5%. Portanto, o látice com tratamentos comuns foi 3% menos eficiente.

Tabela 1 Resumo da análise de variância da porcentagem de grãos cozidos em progênies $F_{2:4}$. Análise realizada no delineamento em látice 17 x 17, sem e com o uso de tratamentos comuns

	Sem tratamento comum		Com tratamento comum	
	GL	QM	GL	QM
Progênies	288	564,5432**	288	565,6765**
Erro efetivo	528	39,7856	628	40,4921
ER (%)		104,52		102,23
$\hat{r}_{\hat{g}g}$ (%)		96,50		96,48
Média (%)		46,83		46,84
CV (%)		13,32		13,36
h^2 (%)		93,13		93,11
(LI-LS) ¹		(91,58-94,40)		(91,60-94,37)
R^2 (%)		89,98		88,53

** Significativo a 1% de probabilidade pelo Teste de F.

^{1/} Limites do intervalo de confiança da herdabilidade (h^2);

ER, R^2 Eficiência relativa do látice ao DBC e coeficiente de determinação;

$\hat{r}_{\hat{g}g}$, $\hat{g}g$ acurácia e resposta a seleção, respectivamente.

É importante comentar que com e sem tratamentos comuns a herdabilidade foi alta, indicando que grande proporção da expressão fenotípica é explicada por fatores genéticos. Nota-se, ainda, que ocorre a sobreposição dos seus intervalos de confiança, o que sugere que as progênies poderiam ser avaliadas com a mesma eficácia sem o emprego dos tratamentos comuns. É importante notar que o uso dos tratamentos comuns nos blocos teve efeito na discriminação dos efeitos dos tratamentos. Pois, nas 30 melhores progênies, além da mudança do ranqueamento, houve uma nova progênie em cada grupo (Tabela 2).

Tabela 2 Porcentagem média de grãos cozidos das 30 melhores progênes

Classificação	Com trat. Comum		Sem trat. Comum	
	Progênie	Média	Progênie	Média
1	253	78,98	253	79,46
2	40	76,88	40	78,81
3	123	76,18	21	75,50
4	21	75,32	123	75,39
5	221	75,10	221	74,72
6	279	72,40	230	72,44
7	47	72,39	279	72,33
8	147	72,22	47	72,21
9	236	72,08	160	71,98
10	144	72,05	236	71,91
11	203	72,05	147	71,41
12	160	71,12	181	71,25
13	181	71,10	144	70,58
14	230	70,45	6	69,76
15	6	70,23	203	69,73
...
25	257	66,18	240	66,25
26	233	66,17	224	66,07
27	27	66,14	233	66,05
28	38	65,35	257	66,01
29	224	65,21	60	65,31
30	155	65,17	38	65,23

Em negrito, progênes coincidentes entre as 30 mais produtivas com e sem testemunhas no látice.

A porcentagem média de cozimento (PMC) foi 46,84% e 46,83% com e sem tratamentos comuns, respectivamente. Nos dois casos, a PMC foi superior à média de 42,48% do genitor com menor porcentagem de cozimento, ou seja, com maior tempo de cocção e inferior em relação à média de 55,46% do genitor com menor tempo de cozimento. Vale comentar que a porcentagem média de

grãos cozidos por progênie variou de 9,14% a 78,98% e de 8,74% a 79,46%, com e sem o uso dos tratamentos comuns, respectivamente. A Figura 1 ilustra a distribuição de frequência das progênies em relação à média da porcentagem de grãos cozidos. Observa-se que o caráter apresenta uma distribuição contínua. Esta variabilidade entre genótipos permite realizar a seleção das progênies com maior porcentagem de grãos cozidos, ou seja, que apresentam reduzido tempo de cozimento.

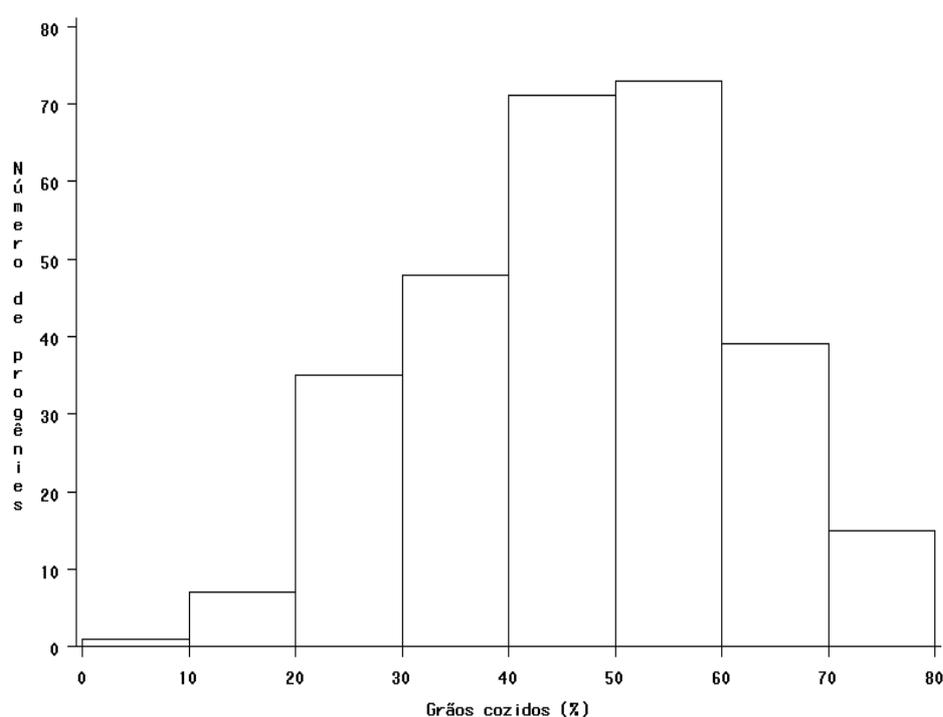


Figura 1 Distribuição de frequência da média de porcentagem de grãos cozidos em progênies $F_{2:4}$

Deve ser comentado que a avaliação fenotípica da porcentagem de cozimento foi realizada em 289 progênies $F_{2:4}$, incluindo as 192 progênies resultantes de plantas individuais F_2 , nas quais foi extraído o DNA para também

serem avaliadas através de marcadores. Desse modo, houve necessidade de verificar se há diferença quanto à herdabilidade e ao ganho com a seleção fenotípica, realizada em nível de médias de 192 progênies $F_{2:4}$ quando comparada com a obtida na média de 289 progênies, que igualmente foram avaliadas pelo seu fenótipo. Os resultados obtidos mostram que não há diferença, pois, quando consideradas 192 progênies a herdabilidade foi de 93,15%, e nas 289 progênies foi obtida a herdabilidade de 93,11%; os ganhos obtidos com a intensidade de seleção de 10% foram 20,62% e 21,60%, respectivamente. Assim, pode-se considerar que as 192 progênies são representativas das 289, o que torna válidas as inferências a serem feitas para esta população a partir da análise estatística das 192 progênies.

Os dados de análise de variância mostram que há diferenças significativas entre os genitores ($P < 0.01$), o que possibilita fazer seleção em populações segregantes resultantes (Tabela 3). É importante notar que há diferenças significativas ($p < 0,01$) entre progênies, indicando a possibilidade de ganho com a seleção.

Os limites dos intervalos de variância de progênies (σ_p^2) foram positivos, evidenciando que a σ_p^2 é diferente de zero. Alinhado com a herdabilidade alta, o ganho com a seleção em nível de média das progênies foi expressivo e corresponde a 46,12% em relação à média das progênies.

Tabela 3 Análise de variância das porcentagens de grãos cozidos

Fonte de variação (FV)	G. L.	Q.M.
Repetições	2	638,9172**
Blocos dentro de repetição (ajustado)	48	53,8507
Progênieis (ajustados)	288	564,5432**
Entre genitores (trat. comuns)	1	4292,9810**
Contraste genitores Vs progênieis	1	419,4029*
Interação tratamentos comuns x blocos	100	40,7573
Resíduo	528	38,8851
		185,53
σ_p^2		(162,62-213,99)
(LI-LS) ¹		
GS (%)		21,60

*, ** Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente pelo Teste de F.
 σ_p^2 , GS variância entre progênieis e ganho com a seleção fenotípica em média das progênieis, respectivamente.

^{1/} Limites do intervalo de confiança da variância de progênieis (σ_p^2);

4.2 Análise com marcadores moleculares

a) Análise de associação por marcas simples

Foram testados 12 marcadores nos genitores (Tabela 1A, ver anexo), no entanto, apenas dois microssatélites apresentaram polimorfismo. Os polimórficos foram usados na genotipagem de plantas F₂. Vale ressaltar que o marcador RAPD, embora tenha sido polimórfico nos genitores, foi monomórfico quando avaliado simultaneamente com plantas F₂.

A partir dos dados de genotipagem de plantas F₂ e com a informação fenotípica do cozimento do feijão em progênieis F_{2:4} resultantes, foram efetuadas as análises de associação por marcas simples. Assim, os dados fenotípicos de cozimento das 192 progênieis foram associados aos marcadores polimórficos. Os

resultados da associação por marcas simples são apresentados na Tabela 4. Da tabela depreende-se que existe associação entre os dois marcadores e os QTLs respectivos, visto que, o efeito dos genótipos foi significativo pelo teste F a 1% de probabilidade. Em ambos os marcadores foi detectado o efeito aditivo dos QTLs e a não significância do efeito de dominância, a 1% de probabilidade.

Tabela 4 Análise da associação por marcas simples por meio da comparação entre médias de porcentagem para cada marcador polimórfico

Marcador	F.V	G.L.	Q.M.	F	Marcador	F.V	G.L.	Q.M.
	Genótipos ¹	2	5914,7614	45,58**		Genótipos	2	4565,2087
PV 141	Aditividade	1	11828,9174	91,16**	X04001	Aditividade	1	7153,6135
	Dominância	1	136,9523	1,06		Dominância	1	927,2900
	Erro	189	129,7647			Erro	189	144,0457
Média (%)			47,35					
ds_m (%)			16,88					
R_m^2			41,73					
GS_{SAM} (%)			7,05					

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

^{1/} Genótipos relativos ao marcador.

ds_m , R_m^2 e GS_{SAM} : diferencial de seleção, coeficiente de determinação e ganho com a SAM, respectivamente.

É importante mencionar que os marcadores polimórficos explicaram 32,16% (PV 141) e 9,57% (X04001) da variação fenotípica, pela regressão linear *forward*, quando seus efeitos foram analisados de forma individual; em conjunto, explicaram 41,73% da expressão fenotípica do caráter.

b) Análise pela coincidência das progênies selecionadas por marcas e fenotipicamente

Das 192 progênies avaliadas, 76 progênies apresentaram maior número de marcas favoráveis. Pela expressão 9, a coincidência entre progênies selecionadas por marcadores com a seleção fenotípica foi 36,40%. Deve ser comentado que, a coincidência será máxima quando o número de progênies selecionadas pelo marcador for igual ao número de progênies selecionadas apenas com base no fenótipo, e será mínima quando não houver concordância entre as progênies selecionadas com o marcador com aquelas selecionadas fenotipicamente.

As progênies selecionadas correspondem à intensidade de seleção de 40%. Assim, a média das 76 progênies foi de 55,73% e o diferencial de seleção obtido foi de 8,38%, portanto, o ganho com a SAM em 76 plantas foi de 7,81%. Vale ressaltar que na seleção fenotípica, quando aplicada a intensidade de seleção de 40%, a média da porcentagem de grãos cozidos obtida foi 60,81%, o diferencial de seleção foi 13,46%, o que resultou em ganho de 12,54%. Desse modo, a SAM pelo método de coincidência apresentou a eficiência de 62,28%.

5 DISCUSSÃO

5.1 Avaliação fenotípica

Para avaliar a porcentagem de cozimento de feijão foi utilizado o delineamento látice triplo 17x17, com dois tratamentos comuns por bloco representado pelos genitores. O látice deve ser preferido quando o número de tratamentos é grande, ou muito heterogêneo, ou ainda, quando certas limitações restringem o tamanho dos blocos (HINKELMANN; KEMPTHORNE, 2008; PIMENTEL-GOMES; GARCIA, 2002). O grande número de progênes avaliadas nesse experimento e a pequena capacidade da panela (pode comportar até 25 sacos de filó, portanto, o bloco de tamanho 17 e dois tratamentos comuns é razoável) utilizada para o cozimento foram os fatores determinantes para a escolha deste delineamento.

O emprego do látice foi eficiente, em relação ao DBC, com e sem o uso de tratamentos comuns, o que é confirmado pelas estimativas da ER. Em ambos os casos, as estimativas da \hat{r}_{gg} e do CV indicam a precisão experimental na discriminação dos efeitos das progênes na porcentagem de cozimento. Entretanto, o uso dos tratamentos comuns não foi eficiente na discriminação dos efeitos dos tratamentos, visto que houve sobreposição dos intervalos das estimativas das herdabilidades, embora tenha ocorrido alteração do ranqueamento de 30 melhores progênes quanto à porcentagem de cozimento. Estes resultados indicam que o látice sem o emprego dos tratamentos comuns nos blocos deve ser preferido para avaliar as progênes quanto à capacidade de cozimento. Assim, o uso dos tratamentos comuns não compensa o tempo e recursos adicionais. A ineficiência dos tratamentos comuns nos blocos do látice também foi reportada por Carvalho (2013). Vale ressaltar que apesar de os tratamentos comuns terem sido menos eficientes, seu emprego poderá ser

estratégico como indicativo das condições de condução do experimento, já que seu comportamento em relação ao cozimento é conhecido. Por exemplo, se o tratamento comum com maior porcentagem de cozimento apresentar-se com menor porcentagem de cozimento em um determinado experimento chama a atenção dos melhoristas sobre as condições experimentais que podem não ser adequadas, permitindo, por conseguinte, a tomada de medidas necessárias para contornar o problema, já que estes tratamentos servem como referência.

A estimativa da σ_p^2 foi positiva, pois os seus intervalos de confiança foram superiores a zero. É importante enfatizar que, na geração $F_{2:4}$, a variância genética entre progênies contém 1 de σ_A^2 (variância aditiva) e 1/16 de σ_D^2 (variância de dominância), conseqüentemente, a herdabilidade estimada é no sentido amplo. Contudo, nesta geração a σ_D^2 é desprezível porque só explora 1/16 de σ_D^2 , além de não ter sido detectado efeito de dominância nos QTLs identificados ($P \leq 0,01$), portanto, pode-se considerar que a variância genética nesta geração é aditiva, por conseguinte, assumir que a herdabilidade obtida é no sentido restrito. Em termos práticos, a variância estimada nesta geração reflete mudanças no fenótipo decorrentes de alterações na dosagem de alelos ou substituições alélicas. Segundo Bernardo (2010) e Moose e Mumm (2008), os efeitos genéticos aditivos também são referidos como o valor reprodutivo, porque são previsivelmente transmitidos à descendência.

A magnitude da herdabilidade é alta, indicando maior contribuição de fatores genéticos no controle do caráter. Resultados similares foram reportados por Elia (2003) e Elia et al. (1997) que estimaram herdabilidade no sentido restrito de 90%, por sua vez, Jacinto-Hernandez et al. (2003) obtiveram a herdabilidade de 78%. A herdabilidade de magnitude alta pode estar relacionada a caráter controlado por poucos genes de grande efeito. Isso confirma o expressivo ganho obtido no presente trabalho, com a seleção fenotípica em nível de médias de progênies. Contudo, para este caráter também foram relatadas

herdabilidades variando de 13,78% a 70,35% (GARCIA et al., 2012). Esses autores atribuíram esta variação ao efeito da interação genótipos por ambientes; nesta situação, plantas com QTLs idênticos apresentaram fenótipos diferentes em diferentes ambientes. O ganho com a seleção fenotípica em nível de médias de 192 progênies foi de 20,62%. Este resultado representa uma vantagem em 43,55% quando comparado com a média geral destas progênies.

5.2 Análise com marcadores moleculares

Dos 12 marcadores testados, apenas dois foram polimórficos nos genitores e em plantas F_2 (Tabela 1A, em anexo). O marcador RAPD, embora tenha sido polimórfico nos genitores, foi monomórfico quando avaliado simultaneamente com plantas F_2 . A baixa reprodutibilidade de marcadores RAPD tem sido reportada na literatura por vários autores em diversas culturas (DAS; SAMIK; PAL, 2005; HERNÁNDEZ; MARTÍN; DORADO, 1999; PARAN; MICHELMORE, 1993) e no feijão (ADAM-BLONDON et al., 1994). Visando contornar essa limitação, marcadores RAPD são transformados em marcadores SCAR. Portanto, a banda de DNA correspondente ao marcador RAPD é clonada, sequenciada e dois “*primers*” mais longos que o original são identificados. Os marcadores SCARs são sintetizados e utilizados para amplificar o mesmo marcador, só que agora numa temperatura de anelamento mais elevada. Nessa condição, o processo de amplificação é mais estável e reprodutível (HERNÁNDEZ; MARTÍN; DORADO, 1999; PARAN; MICHELMORE, 1993; YANG et al., 2013).

O baixo polimorfismo em linhagens de feijão provenientes de programas de melhoramento é considerado normal, visto que, muitos locos favoráveis já se encontram fixados, portanto, os genótipos são pouco divergentes quando comparados aos genótipos selvagens. Vale ressaltar que ambos os genitores

utilizados neste estudo são do tipo carioca, por isso, têm origem comum. Por outro lado, o reduzido número de marcadores polimórficos pode resultar do fato de terem sido utilizados poucos marcadores. Em feijão, resultados similares foram encontrados por Garcia et al. (2011, 2012) que relataram percentagens de polimorfismos de 11,12% e 24%, respectivamente; mesmo com emprego de um número de marcadores relativamente maior. Por exemplo, entre os 315 SSR testados por Garcia et al. (2011) na população proveniente do cruzamento de BAT93 com JALO EEP558, 24% (76) foram polimórficos, por sua vez, Garcia et al. (2012), dentre 944 marcadores microssatélites utilizados, apenas 11,12% (105) foram polimórficos devido à baixa divergência genética (ou contraste) entre os genitores utilizados nestes cruzamentos, por serem da origem comum.

Os marcadores polimórficos PV141 e X04001 explicaram 32,16% e 9,57% da variação fenotípica, respectivamente, quando analisados isoladamente pela regressão linear *forward*; sendo que a utilização simultânea dos dois explicou 41,73% da expressão fenotípica do caráter. Esses resultados indicam que os marcadores polimórficos explicaram uma parte considerável da variação fenotípica, portanto estão associados a QTLs de grande efeito, considerando que somente dois marcadores foram utilizados. Outro fato importante é que os efeitos dos marcadores foram validados em comparação com o estudo original, quando eles foram identificados por Garcia et al. (2012), mesmo em população diferente. Isso indica que os QTLs foram relativamente estáveis. Entretanto, de acordo com Garcia et al. (2012) o marcador PV141 explicou 19,24% na $F_{2:4}$ e o marcador X04001 explicou entre 21,36% e 12,34%, na $F_{2:4}$ e $F_{2:5}$, respectivamente. Esses autores observaram que o marcador X04001 encontra-se a 11,7 cM de distância com o QTL, já o marcador PV 141 está localizado a 17,6 cM em relação ao pico do QTL e apresentaram intervalos de 25,8 cM e 29,8 cM, respectivamente.

O fato de a ação simultânea dos marcadores corresponder à soma dos seus efeitos individuais, sugere que esses QTLs apresentam segregação independente. Portanto, essa observação é apoiada pelo estudo de Garcia et al. (2012), segundo o qual o marcador X04001 e PV141 estão localizados nos grupos de ligação 1 e 9, respectivamente (Tabela 1A).

O ganho alcançado com a SAM por meio da associação por marcas simples foi de 7,05%, o que corresponde a um aumento em 14,88% em relação à média das 192 progênies e representa 34,19% do ganho obtido com a seleção fenotípica. Provavelmente se maior número de marcadores pudesse ter sido utilizado, o ganho com a seleção assistida seria maior. Além disso, é importante notar que embora esses QTLs tenham sido identificados em genitores diferentes e tenham se expressado em ambientes diversos ao desse estudo, eles mostraram-se estáveis e, portanto, úteis para seleção assistida em nível de plantas individuais, como F_2 . Pois, há até efeitos maternos na expressão fenotípica do caráter. Assim, por essas razões, a seleção fenotípica foi mais eficiente do que assistida. A baixa eficiência da seleção assistida devido ao emprego de um número reduzido de marcadores polimórficos foi também relatada por Pereira (2006). Por isso, sempre que possível, a utilização de maior número de marcadores polimórficos para SAM é desejável.

Como o DNA foi extraído em plantas individuais da geração F_2 , a seleção de plantas portadoras de três ou mais alelos favoráveis tem mais possibilidades de originar linhagens com maior porcentagem de cozimento. Neste contexto, das 192 progênies avaliadas por marcadores, 76 apresentaram maior número de marcas favoráveis, por isso, foram selecionadas. Dentre 76 progênies com marcadores favoráveis, 30 progênies tiveram quatro alelos favoráveis e 46 progênies apresentaram três alelos favoráveis. Deve ser ressaltado que as plantas selecionadas correspondem à intensidade de seleção de 40%, esta quantidade é razoável já que se trata da seleção assistida por

marcadores, pois permite a aplicação de fraca intensidade de seleção e isso possibilita praticar seleção para outros caracteres e continuar a obter ganho.

O ganho com a seleção de 76 progênies, por marcadores, pelo método de coincidência foi de 7,81%. Com a seleção fenotípica, quando aplicada a intensidade de seleção de 40% o ganho obtido foi de 12,54%. Desse modo, a SAM pelo método de coincidência apresentou a eficiência de 62,28%, que pode ser considerada alta, levando-se em conta o pequeno número de marcadores utilizados e também ao fato dela ter sido realizada em planta F₂ em um caráter influenciado em parte por efeito materno.

5.3 Comparação da seleção assistida por marcadores de DNA e fenotípica

É importante observar que com a seleção assistida por marcadores utilizando o índice derivado por Stromberg, Dudley e Rufener (1994), ou seja, associando a informação da marca com o fenótipo, a eficiência relativa foi de 34,19%. Embora tenha alcançado algum ganho (Tabela 4), a SAM foi menos eficiente; sendo preferível a seleção fenotípica. Pelo método proposto por Hamblin e Zimmermann (1986), que consiste na análise da coincidência das progênies selecionadas por marcas com as selecionadas fenotipicamente, a eficiência relativa foi de 62,28%, apesar de ser alta ela é inferior à seleção fenotípica. Observa-se que o método de Hamblin e Zimmermann (1986) permitiu um incremento 28,11% em relação ao método proposto por Stromberg, Dudley e Rufener (1994); esse aumento era esperado, pois, no primeiro método foi utilizada a herdabilidade cuja magnitude é alta (93,15%) e no segundo, foi usado o coeficiente de determinação baixo (41,73%).

Mesmo utilizando apenas dois marcadores, como no presente trabalho, tomando em conta que o caráter apresenta o efeito materno (necessita de mais uma geração para avaliar) e sua avaliação fenotípica é laboriosa e realizada no

fim do ciclo, ainda é compensador praticar a seleção assistida em plantas F_2 . Nesse caso, poder-se-ia praticar a seleção assistida em 1000 ou mesmo mais plantas F_2 , aplicando intensidade de seleção fraca, selecionando uma proporção maior de plantas, por exemplo, de 10 a 30%; escolhendo-se aquelas com o máximo de marcadores favoráveis. Esse procedimento permitiria reduzir o número de progênies a serem avaliadas, entre as quais se espera a grande maioria com boa capacidade de cozimento. Além disso, entre elas seria possível praticar a seleção para outros caracteres agronômicos e comerciais importantes.

Aplicando esse princípio neste trabalho, que é o que ocorre na prática com os melhoristas, e selecionando 10% em 76 plantas previamente selecionadas por marcadores, o ganho obtido foi de 15,79%. Considerando que inicialmente foram selecionadas 76 plantas F_2 somente com base no marcador o ganho foi de 7,81%, assim, o ganho total com a seleção de 8 plantas (10% em 76 plantas F_2) é de 23,60 e corresponde à soma do ganho obtido com a seleção de 76 plantas com 8 plantas todas da F_2 . Comparativamente a 20,62% alcançado com a seleção fenotípica com intensidade de 10% realizada somente uma vez em 192 progênies. Entretanto, houve aumento de 2,98% pois, com a seleção de 76 plantas seguidas da seleção de 8 plantas o ganho foi de 23,60%, apesar disso, a seleção somente com base em marcadores, ou seja, sem dados fenotípicos, provavelmente não pudesse registrar este aumento, pois a probabilidade de se selecionar as 8 melhores em 76 plantas é 0,05%, portanto, é muito baixa. Deve notar-se que a herdabilidade em 192 progênies foi de 93,15%, portanto, em 76 progênies a herdabilidade reduziu para 89,33%. A redução que ocorreu foi devido a problema de amostragem, ou seja, devido à redução do tamanho da população. No entanto, a redução foi muito pequena, o que mostra a enorme variação genética na população de progênies e também é uma indicação de que o número de QTLs (genes) segregantes não é muito grande.

6 CONCLUSÕES

A seleção assistida por marcadores de DNA apresentou ganho equivalente a 62,28% da seleção fenotípica, devido a pouca disponibilidade de marcadores polimórficos. Assim, um procedimento recomendável é o uso de marcadores em plantas F₂ para eliminar aquelas menos promissoras e a seleção fenotípica para outros caracteres na população de progênies previamente selecionada.

REFERÊNCIAS

ABREU, Â. F. B. et al. **BRSMG madreperola**: cultivar de feijão tipo carioca com escurecimento tardio dos grãos. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2011. 4 p. (Comunicado Técnico).

ADAM-BLONDON, A. F. et al. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to a dominant gene (*Are*) conferring resistance to anthracnose in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 88, n. 6/7, p. 865-870, 1994.

AGUILERA, J. M.; RIVERA, R. Hard-to-cook defect in black beans: hardening rates, water imbibition and multiple mechanism hypothesis. **Food Research International**, Barking, v. 25, n. 1, p. 101-108, 1992.

ALZATE-MARIN, A. L. et al. Seleção assistida por m moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 333-342, 2005.

ARAGÃO, F. J. L. et al. Common bean. In: KOLE, C. K.; HALL, T. C. (Ed.). **Compendium of transgenic crop plants**: transgenic cereals and forage grasses. Cambridge: Blackwell, 2008. p. 2270.

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

ARÚS, P.; MORENO-GONZÁLEZ, J. Marker-assisted selection. In: HAYWARD, M.; BOSEMARK, N.; ROMAGOSA, I. (Ed.). **Plant breeding**: principles and prospects. Torquay: Chapman & Hall, 1993. p. 550.

BALAMAZE, J. et al. Influence of variety, growth location and storage conditions on development of Hard-to-cook defect in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development**, Nairobi, v. 8, n. 3, p. 333-348, Sept. 2008.

BALDONI, A. B.; SANTOS, J. B. dos. Capacidade de cozimento de grãos de famílias de feijão do cruzamento ESAL 693 x Rosinha. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 27, n. 2, p. 233-236, 2005.

BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. de O. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2012. 248 p.

BERED, F.; BARBOSA NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 3, p. 513-520, maio/jun. 1997.

BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. 2nd ed. Cambridge: Stemma, 2010. 390 p.

BERNARDO, R. Molecular markers and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years. **Crop Science**, Madison, v. 48, n. 5, p. 1649-1654, 2008.

BERRIOS, J. D. J.; SWANSON, B. G.; CHEONG, W. A. Physico-chemical characterization of stored black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Research International**, Barking, v. 32, p. 669-676, Dec. 1999.

BERTOLDO, J. G. et al. Concentrações salinas combinadas com tempos de hidratação: efeito no tempo de cocção em feijão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 510-515, 2010.

BERTOLDO, J. G. et al. Efeito de diferentes concentrações salinas na redução do tempo de cocção de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Biotemas**, Florianópolis, v. 21, n. 3, p. 39-44, 2008.

BOOPATHI, N. M. **Genetic mapping and marker assisted selection: basics, practice and benefits**. New Delhi: Springer, 2013. 293 p.

BORÉM, A.; CARNEIRO, J. E. S. A cultura. In: VIEIRA, C. et al. (Ed.). **Feijão**. 2. ed. Viçosa, MG: UVF, 2011. p. 13-18.

BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 32, n. 3, p. 314-331, May 1980.

BRAMMER, S. P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo, 2000. 7 p.

BRESSANI, R. Grain quality of common beans. **Food Reviews International**, New York, v. 9, n. 2, p. 237-297, 1993.

CAIXETA, E. T. et al. Tipos de marcadores. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. p. 11-93.

CAMPOS, F. L. A. et al. Identification and analysis of antinutritional factors in possible interactions between medications and food/nutrients in hospitalized patients. **Einstein**, São Paulo, v. 9, n. 3, p. 319-325, 2011.

CARDADOR-MARTÍNEZ, A.; LOARCA-PIÑA, G.; OOMAH, B. D. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 6975-6980, Nov. 2002.

CARVALHO, B. L. **Estratégia para avaliação do cozimento dos grãos de progênies de feijoeiro e estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos**. 2013. 75. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

CARY, N. S. **Statistical analysis system**. Cary, 2013. Software.

CASTELLANOS, J. Z. et al. Preferential habits of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) consumers in Mexico. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 47, n. 2, p. 163-167, 1997.

COELHO, S. R. M. et al. Alterações no tempo de cozimento e textura dos grãos de feijão comum durante o armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 539-544, mar./abr. 2009.

COLLARD, B. C. Y. et al. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. **Euphytica**, Wageningen, v. 142, p. 169-196, Jan. 2005.

CORRÊA, M. M. et al. Water absorption, hard shell and cooking time of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **African Journal of Food Science and Technology**, Nairobi, v. 1, n. 1, p. 13-20, July 2010.

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.

DALLA CORTE, A. et al. Environment effect on grain quality in early common bean cultivars and lines. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 3, n. 3, p. 193-202, 2003.

DAS, M.; SAMIK, B.; PAL, A. Generation and characterization of SCARs by cloning and sequencing of RAPD products: a strategy for species-specific marker development in bamboo. **Annals of Botany**, Oxford, v. 95, n. 5, p. 835-841, 2005.

DORIA, E. et al. Anti-nutrient components and metabolites with health implications in seeds of 10 common bean (*Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus lunatus* L.) landraces cultivated in southern Italy. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 26, p. 72-80, May 2012.

EDWARDS, M. D.; PAGE, N. J. Evaluation of marker-assisted selection through computer simulation. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 88, p. 376-382, June 1994.

ELIA, F. M. Heritability of cooking time and water absorption traits in dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) using a North Carolina Design mating scheme. **Tanzania Journal of Science**, Dar es Salaam, v. 29, n. 1, p. 25-34, 2003.

ELIA, F. M. et al. Genetic analysis and interrelationships between traits for cooking time, water absorption, and protein and tannin content of andean dry beans. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 122, n. 4, p. 512-518, 1997.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4th ed. Malaysia: Pearson Prentice Hall, 1996. 464 p.

FALEIRO, F. G. Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. de (Ed.). **Biociencia**: estado da arte e aplicações na agropecuária. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2011. p. 730.

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

- FERREIRA, C. M.; DEL PELOSO, M. J.; FARIA, L. C. **Feijão na economia nacional**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz Feijão, 2002. 47 p.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.
- FIALHO, L. da S. et al. Biochemical composition and indigestible oligosaccharides in *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 61, p. 87-89, June 2006.
- FRANCIA, E. et al. Marker assisted selection in crop plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 82, n. 3, p. 317-342, Sept. 2005.
- FREYRE, R. A. et al. Towards an integrated linkage map of common bean 4: development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, p. 847-856, 1998.
- GARCIA, E. et al. Hard-to-cook beans (*Phaseolus vulgaris* L.): involvement of phenolic compounds and pectates. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 6, p. 2110-2116, June 1998.
- GARCIA, R. A. V. et al. The characterization of a new set of EST-derived simple sequence repeat (SSR) markers as a resource for the genetic analysis of *Phaseolus vulgaris*. **BMC Genetics**, London, v. 12, n. 41, p. 1-14, Jan. 2011.
- GARCIA, R. A. V. et al. Mapeamento genético do feijoeiro comum utilizando marcadores SSRs para a identificação de QTLs associados à característica tempo de cocção. In: SEMINÁRIO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO, 2., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: UFG, 2005. p. 1-3.
- GARCIA, R. A. V. et al. QTL mapping for the cooking time of common beans. **Euphytica**, Wageningen, v. 186, p. 779-792, Dec. 2012.
- GEPTS, P. et al. Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. In: MOORE, P. H.; MING, R. (Ed.). **Genomics of tropical crop plants**. New York: Springer, 2008. p. 113-143.
- GUIMARÃES, C. T. et al. Marcadores moleculares no melhoramento. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, MG: Folha de Viçosa, 2009. p. 532.

HAMBLIN, J.; ZIMMERMANN, M. J. de O. Breeding common bean for yield in mixtures. **Breeding Reviews**, Tokyo, v. 4, p. 245-272, 1986.

HAYAT, I. et al. Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): an overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 54, n. 5, p. 580-592, Jan. 2013.

HERNÁNDEZ, P.; MARTÍN, A.; DORADO, G. Development of SCARs by direct sequencing of RAPD products: a practical tool for the introgression and marker-assisted selection of wheat. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 5, n. 3, p. 245-253, 1999.

HINKELMANN, K.; KEMPTHORNE, O. **Design and analysis of experiments**. New Jersey: J. Wiley, 2008. 631 p.

HOSPITAL, F. Challenges for effective marker-assisted selection in plants. **Genetica**, Dordrecht, n. 136, p. 303-310, 2009.

JACINTO-HERNANDEZ, C. et al. Characterization of a common bean population of inbred lines regarding cooking quality and some nutritional components. **Agrociencia**, Montevideo, v. 36, p. 451-459, June 2002.

JACINTO-HERNANDEZ, C. et al. Genetic analysis and Random Amplified Polymorphic DNA markers associated with cooking time in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 43, n. 1, p. 329-332, 2003.

JACKSON, M. G.; VARRIANO-MARSTON, E. Hard-to-cook phenomenon in beans: effects of accelerated storage on water absorption and cooking time. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 46, p. 799-803, May 1981.

KIGEL, J. Culinary and nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* seeds as affected by environmental factors. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, Gembloux, v. 3, n. 4, p. 205-209, 1999.

KNAPP, S. J.; BRIDGES, W. C.; BIRKES, D. Mapping quantitative trait loci using molecular marker linkage maps. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 79, n. 5, p. 583-592, May 1990.

- KNAPP, S. J.; STROUP, W. W.; ROSS, W. M. Exact confidence intervals for heritability on a progeny mean basis. **Crop Science**, Madison, v. 25, p. 192-194, 1985.
- KUTOS, T. et al. Dietary fibre content of dry and processed beans. **Food Chemistry**, London, v. 80, n. 2, p. 231-235, Feb. 2003.
- LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. **Genetics**, Austin, v. 124, n. 3, p. 743-56, Mar. 1990.
- MARTÍNEZ-MANRIQUE, E. et al. Enzymatic changes in pectic polysaccharides related to the beneficial effect of soaking on bean cooking time. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 91, n. 13, p. 2394-2398, Oct. 2011.
- MATELLA, N. J.; MISHRA, D. K.; DOLAN, K. D. Culinary perspective of dry beans and pulses. In: SIDDIQ, M.; UEBERSAX, M. A. (Ed.). **Hydration, Bbanching and thermal processing of dry beans**. Ames: J. Wiley, 2013. p. 129-154.
- MIKLAS, P. N.; SINGH, S. P. Common bean. In: KOLE, C. (Ed.). **Genome mapping and molecular breeding in plants: pulses, sugar and tuber crops**. Berlin: Springer, 2007. v. 3, p. 1-31.
- MOOSE, S. P.; MUMM, R. H. Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 147, n. 3, p. 969-977, July 2008.
- MOREAU, L. et al. Marker-assisted selection efficiency in populations of finite size. **Genetics**, Austin, v. 148, p. 1353-1365, Mar. 1998.
- MORRIS, M. et al. Money matters (II): costs of maize inbred line conversion schemes at CIMMYT using conventional and marker-assisted selection. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 11, n. 3, p. 235-247, Apr. 2003.
- MOSCOSO, W.; BOURNE, M. C.; HOOD, L. F. Relationships between the Hard-to-Cook phenomenon in red kidney beans and water absorption, puncture force, pectin, phytic acid, and minerals. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 49, n. 6, p. 1577-1583, Nov. 1984.

- NODARI, R. O. et al. Towards an integrated linkage map of common bean 2: development of an RFLP-based linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, p. 513-520, 1993.
- NÖTHLINGS, U. et al. Intake of vegetables, legumes, and fruit, and risk for all-cause, cardiovascular, and cancer mortality in a European diabetic population. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 138, p. 775-781, Apr. 2008.
- OLIVEIRA, D. P. et al. Qualidade tecnológica de grãos de cultivares de feijão-comum na safra das águas. **Ciências Agrárias**, Teresina, v. 33, n. 5, p. 1831-1838, Oct. 2012.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, n. 8, p. 985-993, 1993.
- PARSAD, R. Transformation of data. In: PARSAD, R.; SRIVASTAVA, R.; GUPTA, V. K. (Ed.). **Design and analysis of experiments**. New Delhi: IASRI, 2003. p. 637-647. Disponível em: <<http://iasri.res.in/iasriwebsite/designofexpapplication/Electronic-Book/index.htm>>. Acesso em: 10 dez. 2013.
- PAULA, S. R. de. **Efeito materno associado à capacidade de cozimento do feijoeiro**. 2004. 53 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- PAULA, S. R. de; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B. Effects of reciprocal crossing on the cooking time of dry bean. **Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 47, p. 223-224, 2004.
- PEREIRA, H. S. **Seleção assistida por marcadores microssatélites para produtividade de grãos em feijoeiro**. 2006. 135 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- PIMENTEL-GOMES, F.; GARCIA, C. H. **Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais: exposição com exemplos e orientações para uso de aplicativos**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 309 p.

- PIRHAYATI, M.; SOLTANIZADEH, N.; KADIVAR, M. Chemical and microstructural evaluation of “hard-to-cook” phenomenon in legumes: pinto bean and small-type lentil. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 46, n. 9, p. 1884-1890, Sept. 2011.
- PREUSS, H. G. Bean amylase inhibitor and other carbohydrate absorption blockers: effects on diabetes and general health. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 28, n. 3, p. 266-276, June 2009.
- RAMALHO, M. A. P.; LAMBERT, E. de S. Biometria e o melhoramento de plantas na era da genômica. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 2, p. 228-249, 2004.
- RAMÍREZ-CÁRDENAS, L.; LEONEL, A. J.; COSTA, N. M. B. Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 200-213, jan./mar. 2008.
- RASMUSSEN, S.; PARSONS, A. J.; JONES, C. S. Metabolomics of forage plants: a review. **Annals of Botany**, London, v. 110, n. 6, p. 1281-90, Nov. 2012.
- REITER, R. PCR: based marker systems. In: PHILLIPS, R.; VASIL, I. K. (Ed.). **DNA-based markers in plants**. 2nd ed. London: Elsevier, 2001. p. 513.
- RESENDE, M. D. V.; DUARTE, J. B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 3, p. 182-194, 2007.
- REYES-MORENO, C.; PAREDES-LÓPEZ, O.; GONZALEZ, E. Hard-to-cook phenomenon in common beans: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 33, n. 3, p. 227-286, 1993.
- RIBAUT, J. M.; VICENTE, M. C. de; DELANNAY, X. Molecular breeding in developing countries: challenges and perspectives. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 13, p. 213-218, Apr. 2010.
- RIBEIRO, S. R. R. de P.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, Â. de F. B. Maternal effect associated to cooking quality of common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 6, p. 303-309, 2006.

- RODRIGUES, T. B.; SANTOS, J. B. dos. Effect of natural selection on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) microsatellite alleles. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 345-352, 2006.
- RONDINI, E. A.; BARRET, K. G.; BENNINK, M. R. Nutrition and human health benefits of dry beans and pulses. In: SIDDIQ, M.; UEBERSAX, M. A. (Ed.). **Dry beans and pulses production, processing and nutrition**. Ames: J. Wiley, 2013. p. 335-357.
- SAHA, S. et al. Variability of nutritional and cooking quality in bean (*Phaseolus vulgaris* L) as a function of genotype. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 64, p. 174-180, June 2009.
- SATHE, S. K. Chemistry and implications of antinutritional factors in dry beans and pulses. In: SIDDIQ, M.; UEBERSAX, M. A. (Ed.). **Dry beans and pulses production, processing and nutrition**. Ames: J. Wiley, 2013. p. 359-377.
- SATHE, S. K. et al. Dry beans of phaseolus: a review, part 2, chemical composition: carbohydrates, fiber, minerals, vitamins, and lipids. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 21, n. 1, p. 37-41, 1984.
- SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers: just a matter of fashion? **Nature**, London, v. 5, p. 63-69, Jan. 2004.
- SEMAGN, K.; BJØRNSTAD, Å.; XU, Y. The genetic dissection of quantitative traits in crops. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 13, n. 5, p. 1-45, Sept. 2010.
- SHEN, L. et al. Evaluation of near-isogenic lines of rice introgressed with QTLs for root depth through marker-aided selection. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 103, p. 75-83, July 2001.
- SOUZA, L. V. de. **Estimação de parâmetros genéticos e fenotípicos associados com a qualidade fisiológica de sementes de feijão**. 2004. 52 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- STANLEY, D. W. A possible role for condensed tannins in bean hardening. **Food Research International**, Barking, v. 25, n. 1, p. 187-192, 1992.

STANLEY, D. W.; AGUILERA, J. M. A review of textural defects in cooked reconstituted legumes: the influence of structure and composition. **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v. 9, p. 277-323, 1985.

STROMBERG, L. D.; DUDLEY, J. W.; RUFENER, G. K. Comparing conventional early generation selection with molecular marker assisted selection in Maize. **Crop Science**, Madison, v. 34, p. 1221-1225, 1994.

THARANATHAN, R. N.; MAHADEVAMMA, S. Grain legumes: a boon to human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 14, n. 12, p. 507-518, Dec. 2003.

TORGA, P. P. **Seleção de famílias de feijoeiro baseada na produtividade e tipo de grãos e informações de QTLs**. 2008. 62 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

TORRES, A. M. et al. Marker-assisted selection in faba bean (*Vicia faba* L.). **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 115, n. 3, p. 243-252, Feb. 2010.

WRICKE, G.; WEBER, E. **Quantitative genetics and selection in plant breeding**. Berlin: Gruyter, 1986. 406 p.

XU, Y. **Molecular plant breeding**. London: CABI, 2010. 734 p.

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

YANG, L. et al. Molecular cloning and development of RAPD-SCAR markers for *Dimocarpus longan* variety authentication. **SpringerPlus**, Heidelberg, v. 501, n. 2, p. 1-8, 2013.

YOUNG, N. D. **DNA-based markers in plants: advances in cellular and molecular biology of Plants**. 2nd ed. London: Springer, 2001. 513 p.

ANEXO

Tabela 1A. Primers SSR e RAPD utilizados, temperaturas de anelamento (TA), padrão de bandas (PB) encontrado, referências da identificação dos QTLs ligados ao tempo de cozimento, grupos de ligação (GL) e QTLs respectivos.

Primers	TA (°C)	PB	Referência do primer e de QTLs	GL	QTL
BM200	58-60	M	Garcia et al. (2012)	1	Ct 1.2
BM 202	58-60	M	Garcia et al. (2012)	9	Ct9.2
PVESTBR270	60-60	M	Garcia et al. (2012)	1	Ct1.3
PvM34	55-55	M	Garcia et al. (2012)	9	Ct9.1
IAC28	48-48	M	Garcia et al. (2012)	1	Ct1.1
PV 131	58-60	M	Garcia et al. (2012)	9	Ct9.1
PV 141	55-55	P	Garcia et al. (2012)	9	Ct9.2
X04001	55-55	P	Garcia et al. (2012)	1	Ct1.1
X 13329	58-60	M	Garcia et al. (2012)	1	Ct1.3
PVESTBR_272	60-60	M	Garcia et al. (2012)	9	Ct9.3
F					
X80051	46-46	M	Garcia et al. (2012)	9	Ct9.3
UNAM 16 ¹	37	M	Jacinto-Hernandez et al. (2003)	N. D	N.D

^{1/} Todos os marcadores são microssatélites exceto o UNAM16 que é RAPD; **M** – monomórfico; **P**-polimórfico em pelo menos um dos genitores; **N.D** – informação não disponível.