

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES DE
QTL DE FEIJÃO RELACIONADO AO ESCURECIMENTO DE
GRÃOS**

KARLA RODRIGUES COUTO

2010

KARLA RODRIGUES COUTO

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES DE
QTL DE FEIJÃO RELACIONADO AO ESCURECIMENTO DE
GRÃOS**

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

Orientador

Prof. Dr. João Bosco dos Santos

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2010

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

Couto, Karla Rodrigues.

Identificação de marcadores microssatélites de QTL de feijão
relacionado ao escurecimento de grãos / Karla Rodrigues Couto. –
Lavras : UFLA, 2010.

34 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: João Bosco dos Santos.

Bibliografia.

1. *Phaseolus vulgaris*. 2. Marcador molecular. 3. SSR. 4.
Qualidade. 5. Seleção assistida. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

CDD – 635.65223

KARLA RODRIGUES COUTO

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES DE
QTL DE FEIJÃO RELACIONADO AO ESCURECIMENTO DE
GRÃOS**

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

APROVADA em 26 de fevereiro de 2010

Dr. Juliano Lino Ferreira

EMBRAPA

Dra. Flávia Maria Avelar Gonçalves

UFLA

Prof. Dr. João Bosco dos Santos

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

*“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a
quem se atreve... e a vida é muito para ser insignificante”.
(Charles Chaplin)*

À minha **Mãe** que sempre foi meu exemplo de vida, dedicação e força.
Ao meu Namorado, **Marcelo**, cujo carinho e amor, foram
indispensáveis.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me ter permitido mais esta vitória.

Aos meus pais, Cecília e José, pelo amor, caráter, ensinamentos, formação e por toda confiança que depositaram em mim.

Ao meu namorado, e mais que companheiro Marcelo, pelo amor, carinho e pelo apoio em todas as horas, não me deixando fraquejar nem nos momentos mais difíceis dessa trajetória.

A minha irmã Kamila, pelo carinho não só de irmã, mas de uma grande amiga, sempre minha confidente.

À Universidade Federal de Lavras, ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento de plantas, pela oportunidade de realização deste curso e ao CNPq, pelo financiamento para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Bosco dos Santos, pela orientação, paciência, disponibilidade, conselhos e exemplo de profissional, foi um grande privilégio tê-lo como orientador.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia minha gratidão.

Aos meus grandes amigos do Laboratório de Genética Molecular, Monik, Rafa, Fer, Mary, Flávia, Paulinho, Letícia, Evelyn e Tha, com os quais aprendi muito, em especial ao querido Lamart, por toda ajuda, e grande paciência durante a realização deste trabalho.

As minhas grandes amigas biólogas, e futuras madrinhas, Ana, Gabi e Grazi. Amo muito vocês meninas.

Aos amigos da Pós-Graduação, Igor, Jerônimo, Gui's, Paulo, Dênis e Constantino, pela companhia, amizade e pelos tão merecidos momentos de descontração.

Aos meus sogros, Vânia e Bosco, por serem meus anjos da guarda em Lavras, sempre me ajudando e apoiando a qualquer hora, e por terem me recebido tão bem em sua família.

A todos que não foram citados, mas nem por isso esquecidos, e que contribuíram de alguma maneira para o êxito desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO ----- | i |
| ABSTRACT ----- | ii |
| 1 INTRODUÇÃO ----- | 01 |
| 2 REFERÊNCIAL TEÓRICO ----- | 02 |
| 2.1.1 O Feijoeiro ----- | 03 |
| 2.1.2 Importância nutricional ----- | 03 |
| 2.1.3 Importância econômica ----- | 03 |
| 2.1.4 Importância genética ----- | 04 |
| 2.1.5 Melhoramento do feijoeiro ----- | 05 |
| 2.1.6 Fatores que afetam a aceitação do feijão pelos consumidores ----- | 08 |
| 2.1.7 Escurecimento de grãos de feijão ----- | 09 |
| 2.1.8 Controle genético do escurecimento precoce dos grãos tipo carioca----- | 10 |
| 2.2 Marcadores moleculares----- | 11 |
| 2.2.1 Identificação de alelo ou QTL de grande efeito pelo método do <i>bulk</i> segregante - <i>Bulked Segregant Analysis</i> (BSA) ----- | 12 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS ----- | 15 |
| 3.1 Obtenção do material vegetal ----- | 15 |
| 3.2 Extração e quantificação do DNA total ----- | 16 |
| 3.3 Reações de microssatélites ----- | 18 |
| 3.4 Análise dos microssatélites ----- | 19 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO ----- | 20 |
| 4.1 Marcadores microssatélites ----- | 20 |
| 4.2 Segregação dos marcadores na população segregante ----- | 21 |
| 4.3 Análise de ligação ----- | 23 |
| 5 CONCLUSÃO ----- | 27 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ----- | 28 |

RESUMO

COUTO, Karla Rodrigues. **Identificação de marcadores microssatélites de QTL de feijão relacionado ao escurecimento de grãos**. 2010. 34p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

As linhagens e ou cultivares de feijão carioca diferem com relação ao tempo de escurecimento do tegumento após a colheita. O escurecimento precoce dos grãos diminui a possibilidade de aceitação de uma cultivar. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a associação de marcadores microssatélites ligados ao QTL responsável pelo escurecimento tardio do tegumento de feijões do tipo carioca, a fim de reduzir o tempo de avaliação para essa característica. Foram utilizados os dados de avaliação fenotípica de 185 progênies $F_{2:3}$ derivadas do cruzamento VC-3 x Majestoso, para o escurecimento dos grãos. A partir desses dados foram confeccionados dois *bulks* segregantes de DNA que foram empregados para a avaliação de 444 pares de primers SSR. Os aplicativos computacionais GQMOL e SISVAR foram utilizados para avaliar as segregações, confecção de um mapa de ligação, análises de marca simples e regressão múltipla utilizando o método backward. Oito marcadores apresentaram polimorfismo nos *bulks*. Seis desses marcadores foram agrupados em um grupo de ligação de 80,49cM, e destes, três se mostraram intimamente ligados ao QTL de interesse. O marcador PVM02TC116 co-segregou com o QTL em questão, e os marcadores PVESTBR-98 (2cM) e PV176 (12,24cM) flanqueiam essa região, conferindo elevada eficiência na seleção assistida.

*Orientador: João Bosco dos Santos – UFLA

ABSTRACT

COUTO, Karla Rodrigues. **Identification of SSR markers to the darkening seed-coat QTL of common Bean.** 2010. 34 p. Dissertation (Master's degree in Plant Genetics and Breeding) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Cultivars and lines of Carioca grain type are different concerning the seed-coat darkening ability after the harvest. The fast darkening reduces the acceptance of the cultivar by the market. The objective of this research was to identify SSR (Simple Sequence Repeat) markers of the QTL (Quantitative Trait Loci) for slow darkening of the seed coat, aiming at reducing the time for evaluation and selection. Data of seed coat darkening were used of 185 F_{2:3} progenies derived from the VC-3 x Majestoso cross. DNA bulks segregating for slow and fast darkening were used for evaluating 444 SSR primers. The phenotypic and molecular data were analyzed using the QMOL and SISVAR software. Partial linkage map was obtained, as well as single marker analyses of variance of the darkening per progenie, and multiple regression (backward), were set up. Eight markers were polymorphic in the DNA bulks, although six of them were mapped in a linkage group of 80.49 cM. Out of these six markers three were very close to the QTL. The PVM02TC116 marker co-segregate with the QTL, and the PVESTBR-98 (2cM) and PV116 (12.4cM) are flanking it. Thereby those three markers are very useful for the marked assisted selection of the trait.

*Senior Advisor: João Bosco dos Santos - UFLA

1 INTRODUÇÃO

O feijão é um dos mais importantes componentes da dieta alimentar do brasileiro. Os tipos de feijões preferencialmente consumidos variam amplamente de acordo com a região. No entanto, os feijões do tipo carioca, isto é, claro com estrias marrons, são os preferidos em grande parte do Brasil. Encontra-se disponível um grande número de linhagens e ou cultivares com esse tipo de grãos que diferem, principalmente, com relação à tonalidade da cor creme do tegumento.

Entre os caracteres que afetam a aceitação das cultivares do feijão tipo carioca pelos produtores está o escurecimento precoce do tegumento do feijão, devido à associação da cor escura do grão com a dificuldade de cozimento. Desse modo, todo feijão de fundo mais escuro é considerado feijão velho e de difícil cozimento.

Existem algumas linhagens de feijão carioca que apresentam a cor creme bem clara e essa tonalidade persiste por muito tempo. Há, contudo, outras que, pouco tempo após o armazenamento, apresentam acentuado escurecimento dos grãos. Essa variação de tempo é controlada geneticamente. Como a avaliação do fenótipo ideal demanda de dois a três meses após a colheita, é importante verificar a possibilidade da seleção assistida por marcadores para esse caráter, tornando a seleção a mais rápida possível.

Diante disso, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a associação de marcadores microssatélites ligados aos alelos responsáveis pelo escurecimento precoce do tegumento de feijões do tipo carioca.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O Feijoeiro

O feijoeiro comum é uma planta anual, cresce em todos os continentes, sob variadas condições ambientais. É uma espécie diplóide verdadeira ($2n=2x=22$) e possui um genoma pequeno estimado entre 450 e 650 Mb (Bennett & Leitch, 1995). Outros estudos realizados mostram que 60% do genoma do feijão é composto por sequências de cópias simples (Talbot et al., 1984). O feijoeiro é uma planta autógama, ou seja, a autofecundação é o processo predominante para a obtenção de novos grãos ou sementes. A taxa de fecundação cruzada possui variações de acordo com a cultivar e as condições ambientais. No Estado de Minas Gerais foram encontradas estimativas inferiores a 3,0% (Marques Júnior & Ramalho, 1995). Devido a este sistema de polinização, pode-se inferir que uma cultivar de feijão é constituída por uma linha pura ou por uma mistura de linhas puras. Do ponto de vista genético, uma linha pura, é um genótipo que possui todos os seus locos em homozigose e alelos iguais em todos os genes. Logo, com as sucessivas multiplicações das sementes via autofecundação, a sua constituição genética não é alterada. Portanto, a não ser que ocorra mistura mecânica o/ou mutações, a constituição da cultivar permanece inalterada.

2.1.1 Importância nutricional

O feijão é um dos mais importantes componentes da dieta alimentar do brasileiro, com um consumo per capita superior a 17 kg/ano (Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2010). 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 (Anderson et al., 1999). A maioria das cultivares de feijão apresenta em torno de 25% de proteína, que é rica no aminoácido essencial lisina, mas pobre nos aminoácidos sulfurados. Essa deficiência, contudo, é suprida pelo consumo dessa leguminosa com alguns cereais, especialmente o arroz. Isto torna a tradicional dieta brasileira, o arroz com feijão, complementar no que se refere aos aminoácidos essenciais (Vieira et al., 2006).

2.1.2 Importância econômica

No Brasil, há um enorme contraste nos sistemas de produção utilizados no cultivo do feijoeiro. De um lado, encontram-se os pequenos produtores que empregam, na maioria, mão-de-obra familiar com baixo nível tecnológico. No extremo oposto, encontram-se os grandes produtores rurais que cultivam o feijoeiro em grandes áreas sob irrigação e adotam elevado nível tecnológico para alcançar alta produtividade de grãos. No entanto, a cultura do feijoeiro continua sendo uma atividade de pequenos e médios produtores rurais, uma vez que 75% das lavouras nacionais de feijão são cultivadas em áreas inferiores a 10 hectares (Fuscaldi & Prado, 2005).

O Brasil é o maior produtor e consumidor desta leguminosa, seguido pela Índia, China e México. A previsão para o período agrícola de 2008/2009 foi de 3,65 milhões de toneladas (CONAB, 2010). Contudo, a produção nacional

ainda é inferior ao seu potencial, apresentando produtividade média equivalente a 800 kg/ha (Brasil, 2009). A baixa produtividade ocorre devido a vários fatores, dentre os quais, a incidência de doenças é considerada uma das maiores causas e atualmente a ocorrência de estiagens têm contribuído para acentuar este fator. Considerando que o rendimento desta cultura ainda é baixo, buscam-se alternativas para a obtenção de cultivares mais produtivas através da melhoria do desempenho produtivo da cultura, associado ao conhecimento e exploração da variabilidade genética (Melo, 2007).

2.1.3 Importância genética

A grande variabilidade genética presente no germoplasma do feijão comum que era utilizada na agricultura familiar no Brasil foi extremamente importante. Esta variabilidade, mantida sob cultivo nas pequenas propriedades, auxiliou à estratégia de sobrevivência dos pequenos agricultores, visto que estes selecionavam os genótipos adaptados às condições agromorfológicas e socioeconômicas que possuíam, sendo estas diferentes das encontradas nos cultivos empresariais (Cardoso, 2009). No entanto, a variabilidade genética que foi mantida pelos pequenos produtores está sendo perdida. Isto em decorrência de dois eventos que alteraram a cadeia produtiva do feijão comum: i- o lançamento do feijão comum do tipo Carioca e a conseqüente substituição das outras cultivares e variedades por este tipo de grão, no período de 1968 a 1974 e ii- o desenvolvimento do programa de feijão irrigado (Pró-Feijão) lançado em 1980, sendo que ocorreu uma expansão imediata deste tipo de plantio no norte e oeste do Estado de São Paulo (Cardoso, 2009).

Os melhoristas utilizam os bancos de germoplasma para escolher genitores que serão utilizados para promover cruzamentos e obter novas cultivares, posto que, nos bancos de germoplasma a variabilidade é preservada e

conservada, sendo possível encontrar variedades melhoradas, crioulas, espécies silvestres, que podem possuir diversas características de importância agrônômica (Nass, 2001).

Atualmente, no Brasil, a maior parte dos programas para o melhoramento genético do feijoeiro tem dado maior ênfase à obtenção de cultivares do grupo comercial Carioca pela grande demanda do mercado (Cardoso, 2009). O feijão do tipo Carioca é o mais produzido no país, com 63% do total da produção nacional. A sua produção está distribuída uniformemente entre as três safras (safra das águas, safra da seca e safra de inverno), sendo que cada uma com participação de 33% na produção total desse tipo de feijão (CONAB, 2010). Apesar de ser um único grupo comercial dito “carioca” e pertencer ao *pool* gênico Mesoamericano, os diferentes genótipos de feijão deste grupo apresentam variações agrônômicas e tecnológicas, como diferenças em produtividade e tempo de cozimento (Lemos et al., 2004).

2.1.4 Melhoramento do feijoeiro

O melhoramento genético do feijoeiro no Brasil teve início no Instituto Agrônômico de Campinas (IAC), em 1932, tendo como base realizar avaliações sobre a capacidade produtiva da espécie, porte de planta e resistência à doenças, para posterior utilização na obtenção de linhagens e cruzamentos artificiais. Desta forma, linhagens passaram a ser analisadas quanto às características mencionadas, enquanto plantas eram selecionadas em populações derivadas de cruzamentos. Nesta época, observou-se que as linhagens de tegumento preto eram mais produtivas que as demais por apresentarem resistência à seca e principalmente, ao patógeno da ferrugem. Constatou-se também que as sementes de cor preta não possuíam boa aceitação comercial, o que não acontecia com materiais dos grupos rosinha, roxinho e manteiga (Bulisani, 2008).

Em meados de 1970, trabalhos realizados por pesquisadores do Instituto Agronômico no município de Palmital - SP identificaram uma planta de maior capacidade produtiva, onde a coloração do grão era creme com listras marrom e o proprietário da fazenda a chamava de carioquinha, devido a uma raça de suínos que também possuía as listras pelo corpo. Após vários estudos foi recomendada como cultivar com o nome de Carioquinha. Muitos trabalhos foram realizados pela seção de Genética e Leguminosa do IAC como forma de demonstrar aos agricultores que a cultivar era produtiva. Este trabalho promoveu uma revolução no comércio de feijão no Brasil, pois a cultivar superou a tradição do consumo de feijões dos tipos rosinha, roxinho, manteiga e jalo e viabilizou o agronegócio do feijão no Brasil, sendo o tipo de grão mais cultivado após 40 anos de seu lançamento (Bulisani, 2008). Hoje trabalhos de melhoramento em feijão estão sendo realizados em várias instituições do Brasil, visando à obtenção de novas cultivares com características mais produtivas, eretas, menos suscetíveis às oscilações climáticas e resistentes aos principais patógenos da cultura.

Nas últimas décadas, o cultivo do feijoeiro na maioria das regiões produtoras do Brasil é realizado predominantemente com a cultivar “Carioca” (Vieira et al., 2006). Estima-se que anualmente sejam cultivados mais de dois milhões de hectares com feijões com este tipo de grão. Embora a frequência de mutação por loco seja muito baixa, espera-se que a variabilidade nas cultivares em uso prolongado pelos agricultores seja alta em razão do grande número de locos que podem sofrer mutação, dos muitos indivíduos que são cultivados simultaneamente e pelo fato dos agricultores reutilizarem os grãos colhidos como semente. Contudo, com a ação da seleção natural, deve permanecer somente os alelos favoráveis a uma maior adaptação à região considerada. Muito embora grande parte dessa variação seja perdida, pelo fato de que apenas uma

pequena amostra dos grãos colhidos seja reutilizada como sementes, supõe-se que permaneça variação suficiente para se ter sucesso com a seleção (Santos et al., 2002). A utilização dessa variabilidade bem sucedida é frequentemente relatada na literatura (Santos et al., 1978; Ramalho et al., 1982; Fonseca, 1993). Todas as cultivares do grupo carioca possuem a cultivar “Carioca” como genitor em alguma das etapas dos cruzamentos que lhes deram origem, sendo que, devido a este fator, todas essas cultivares possuem grandes semelhanças com a cultivar “Carioca”, conforme descrito por Ribeiro (2001).

No entanto, existem diferenças quanto à genealogia destas cultivares. Vieira et al. (2000) analisaram características morfológicas quantitativas de seis cultivares cariocas e encontraram que os mais divergentes foram as cultivares “IAPAR 57” e “IAPAR 81”; enquanto a “Carioca MG” e “IAPAR 57” foram as mais similares. Esta semelhança foi atribuída à existência de genitores que apresentam sementes de tegumento de cor preta, como a cultivar “Cornell 49-242” na genealogia da cultivar “Carioca MG” e “Porrilo” na genealogia de “IAPAR 57”. Observou-se um agrupamento pela similaridade genética por meio de análise de marcadores morfológicos quantitativos das cultivares “Carioca” e “Aporé”, o que pode ser entendido já que estas cultivares foram obtidas por meio de cruzamentos com 50% ou mais de alelos da cultivar carioca. Em se considerando características morfológicas qualitativas, foi observado maior similaridade genética entre as cultivares “Carioca” e “Carioca MG”, e entre “Carioca” e “IAPAR57”, enquanto as menores similaridades estão entre a cultivar “IAPAR 81” com as cultivares “Aporé”, “Carioca” e “Pérola”.

Ceolin et al. (2007) avaliaram a divergência genética de 18 genótipos de feijão comum pertencentes ao grupo carioca por meio do método de Tocher (baseado na distância de Mahalanobis) e por gráficos de variáveis canônicas. Os resultados mostraram que as duas primeiras variáveis canônicas foram

suficientes para explicar 88,23% da variabilidade total observada. Os resultados revelaram que as combinações dos genótipos “Pérola” x “CNFC 8008”, “CNFC 8005” x “CNFC 8009”, “Pérola” x “CNFC 8009”, “Princesa” x “CNFC 8008” e “Princesa” x “CNFC 8009” foram as mais indicadas para realizar o melhoramento interpopulacional (os genótipos com prefixo “CNFC” são provenientes da EMBRAPA).

A variabilidade dentro da cultivar “Carioca” foi avaliada por Santos et al. (2002), que coletaram amostras de 289 plantas - linhas puras – em uma lavoura em que as sementes colhidas foram reutilizadas por mais de dez safras. Ficou evidenciada a variabilidade entre as linhas puras para produtividade de grãos e outros caracteres, especialmente aqueles relacionados ao tipo de grão como, por exemplo, tamanho, forma, tonalidade da cor creme do fundo e do marrom das rajas.

2.1.5 Fatores que afetam a aceitação do feijão pelos consumidores

Após a colheita, a respiração e outros processos metabólicos de grãos continuam ativos, ocasionando, na maioria das vezes, perdas significativas de qualidade, motivo pelo qual o consumidor brasileiro prefere produto de colheita mais recente. No armazenamento, pode ocorrer uma deterioração gradual, irreversível e cumulativa, cuja velocidade e intensidade dependerão do tempo e temperatura de armazenamento, das características intrínsecas dos grãos e principalmente da umidade dos mesmos (Rios, 2002).

Estes processos podem ser diminuídos e/ou retardados através da redução da umidade, que é a forma mais usada comercialmente para prolongamento do tempo de conservação. Mas mesmo com uso de baixa umidade, os grãos perdem qualidade devido à perda de peso e consumo de energia pelo processo respiratório, pelo aumento de rachaduras e ocorrência de

pragas e fungos. Além disso, um longo período de armazenamento ainda pode aumentar a dificuldade de cozimento do feijão, diminuir a germinação e ocorrer escurecimento do tegumento de feijão claro, do tipo carioca, depreciando enormemente seu valor comercial (Sartori, 1996).

2.1.6 Escurecimento dos grãos de feijão

O escurecimento do feijão no armazenamento está relacionado com a suscetibilidade da cultivar (Burr et al., 1968). Conforme Sartori (1982), o escurecimento do tegumento não é devido à reação química do tipo Maillard, pois não se verifica acentuado escurecimento em temperatura elevada (25°C) na ausência de oxigênio, mas sim está relacionado à oxidação enzimática, que depende da presença de oxigênio para reação de compostos fenólicos pela polifenoxidase. No entanto, a alteração na coloração e nos compostos fenólicos não é devido à reações enzimáticas (Iaderoza et al., 1989). O armazenamento ao ar, em temperatura ambiente aumenta o escurecimento do tegumento, mas este também é influenciado pela umidade, temperatura e o período de armazenamento (Burr et al., 1968; Sartori, 1982; Iaderoza et al., 1989).

A maneira como os grãos são armazenados influencia o endurecimento do tegumento e dos cotilédones e, conseqüentemente, o tempo de cozimento. As condições que proporcionam maior endurecimento dos grãos são alta umidade e temperatura (Burr et al., 1968; Sievwright & Shipe, 1986).

Estudos demonstraram que sementes armazenadas em ar germinam relativamente menos, quando comparadas com sementes armazenadas em baixo O₂. Verificaram também que, após 14 meses de armazenamento, as cultivares mantiveram maior germinação, menor escurecimento do tegumento, além de baixo tempo de cozimento, em baixa concentração de O₂ ou baixa temperatura (0,5° C), quando comparado com ar em temperatura ambiente. (Cardoso, 2009).

2.1.7 Controle genético do escurecimento precoce dos grãos tipo carioca

As linhagens e ou cultivares de feijão carioca diferem com relação ao tempo de escurecimento do tegumento. É sabido que, durante o envelhecimento, os grãos escurecem. Portanto, grãos escuros são sinônimos de grãos velhos e de difícil cozimento. Uma cultivar do tipo carioca com grãos mais escuros, mesmo novos, seria preterida pelo consumidor, imaginando que o feijão fosse velho. Por isso, a procura tem se concentrado, em feijões com o fundo mais claro possível, denominados tipo “leite” e, sobretudo, naqueles cuja cor clara se mantenha o maior tempo possível (Silva, 2007).

Ainda segundo Silva (2007), a segregação para escurecimento de grãos se ajusta a proporção de 3 escuros : 1 claro, indicando assim que o caráter é controlado por um gene com dominância para o alelo de escurecimento precoce.

A cor do grão está também relacionada à quantidade de tanino presente nos grãos, pois feijões mais escuros apresentam maior concentração de tanino (Silva, 2007). Isso também é constatado em *Vicia faba* onde a concentração de tanino possui herança monogênica (Gutierrez, 2007). No entanto, em *Vicia faba* constatou-se que a correlação entre a quantidade de tanino nos grãos e o envelhecimento precoce possuem correlação negativa, ou seja, grãos que apresentaram escurecimento precoce, também apresentaram menor concentração de tanino (Nassar-Abbas et al., 2008).

A avaliação do escurecimento do grão demanda de dois a três meses após a colheita (Silva, 2007). Assim, dado ser simples o controle genético do caráter, há a possibilidade de identificar marcadores moleculares do alelo ou QTL responsável pelo fenótipo ideal, que contribuirá para agilizar a seleção.

2.2 Marcadores moleculares

O termo marcador genético corresponde a uma característica do organismo que pode ser facilmente detectada a olho nu, ou com a ajuda de algum aparato tecnológico e que co-segrega com alelos de interesse. Uma característica, para ser útil como marcador, deve evidenciar diferenças entre os indivíduos analisados e, além disso, ser reproduzida com precisão na descendência (Silva, 2005).

Atualmente os marcadores de DNA são os mais utilizados na seleção assistida, devido o amplo polimorfismo que eles identificam, permitindo marcar um grande número de genes. Entre os marcadores de DNA, os microssatélites são um dos mais usados, fato que se deve principalmente à simplicidade na sua utilização.

Microssatélites ou SSR consistem de pequenas sequências de um a quatro nucleotídeos de comprimento, repetidas em filas ou tandem no genoma. Esses marcadores possuem expressão co-dominante, permitindo a diferenciação de indivíduos homocigotos para os dois alelos e heterocigotos, sendo assim eles podem ser aplicados a todos os tipos de populações segregantes empregadas no mapeamento genético e estudos de ligação (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Esses marcadores têm sido amplamente utilizados em análise genética, uma vez que se baseia na detecção da variação existente em locos de sequências repetitivas. As sequências que flanqueiam esses locos são mais conservadas, permitindo que *primers* específicos a elas sejam sintetizados e utilizados para amplificar especificamente essa região, via PCR (Litt & Luty, 1989).

O marcador microssatélite permite análise a partir de qualquer tipo de tecido em qualquer estágio de desenvolvimento, sendo necessária pequena quantidade de DNA. Os microssatélites têm sido usados para a análise genética em diferentes espécies de plantas (Santos et al., 2003; Koehlec-Santos et al.,

2003; Bianchi et al., 2004; Díaz & Blair, 2006; Blair et al., 2007). Eles têm sido cada vez mais usados para a análise genética em feijão comum, com os mais variados objetivos, como análises dos efeitos da seleção natural (Rodrigues & Santos, 2006), conhecimento da variabilidade genotípica (Blair et al., 2006a; Buso et al., 2006) e, principalmente, visando o melhoramento por seleção assistida de QTLs, mais especificamente por ligação aos locos de resistência à doenças (Alzate-Marin et al., 2005; Ferreira et al., 2005; Blair et al., 2006b; Miklas, 2006).

2.2.1 Identificação de alelo ou QTL de grande efeito pelo método do *Bulk Segregante - Bulk Segregant Analysis (BSA)*

O método do *Bulk Segregante (BSA)*, ou análise de grupos segregantes, é um procedimento rápido para identificar marcadores ligados em locos de interesse, em regiões específicas do genoma (Michelmore et al., 1991). Este método é uma alternativa ao mapeamento molecular saturado que é uma atividade cara, trabalhosa e que demanda muito tempo. O método de BSA surgiu como uma modificação feita por Michelmore e colaboradores à técnica anteriormente proposta (Arnheim et al., 1985), que consistia na análise de misturas de DNA de indivíduos homocigotos para um determinado loco através da identificação de RFLP em desequilíbrio de ligação de loco associados com doenças em seres humanos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A análise de *bulks* segregantes envolve a comparação de duas amostras misturadas de DNA de uma população segregante de um determinado cruzamento. Em cada grupo ou mistura de DNA, os indivíduos são idênticos para a característica ou gene de interesse, mas são arbitrários para todos os outros genes. Os dois grupos contrastantes são analisados para identificar marcadores que os distinguem. Os marcadores que são polimórficos entre os

grupos estarão potencialmente ligados aos locos que controlam a característica usada para construir os grupos. Esta evidência de ligação gênica entre o marcador polimórfico e o loco alvo é confirmada através de uma análise de segregação de todos os indivíduos da população segregante. Estima-se, desta forma, o valor da frequência de recombinação entre o marcador e o loco genético que controla o caráter (Michelmore et al., 1991; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O método BSA utiliza uma seleção genômica prévia para reduzir o esforço necessário à identificação de ligação gênica e focaliza a análise diretamente na região do genoma associada à característica de interesse. Os marcadores identificados estão, em geral, numa janela genética de 25 cM de cada lado do alvo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Este método tem duas aplicações imediatas no desenvolvimento de mapas genéticos: o desenvolvimento de mapas genéticos detalhados através da análise da segregação de marcadores moleculares selecionados em populações e a localização rápida de genes que não segregam em populações inicialmente usadas para gerar o mapa genético (Michelmore et al., 1991).

O método BSA tem sido aplicado com sucesso na identificação de marcadores ligados a alelos de interesse na maioria das espécies cultivadas e inclusive, com grande intensidade no feijão (Bean Improvement Crop - BIC, 2010).

Após identificar a co-segregação dos marcadores e o caráter de interesse, procede-se a estimativa da frequência de recombinação entre eles. Para isso podem ser utilizados aplicativos computacionais como o GQMOL (Cruz & Schuster, 2004) ou pode-se empregar regressão linear múltipla, ou mesmo a análise por ponto em cada marcador (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do Material Vegetal

Neste trabalho, foram utilizadas 185 progênies $F_{2:3}$ provenientes do cruzamento entre a linhagem VC-3, oriunda do programa de melhoramento da Universidade Federal de Viçosa e a cultivar BRS –MG Majestoso (OPNS-331), denominada aqui apenas de Majestoso, obtida pela Universidade Federal de Lavras. A linhagem VC-3 apresenta grão tipo carioca com fundo creme bem claro e há evidências de que essa tonalidade persiste por um longo período. Já a cultivar Majestoso também possui padrão de grão tipo carioca com fundo claro, porém, escurece rapidamente com o armazenamento (Silva, 2007).

Foram utilizados os dados do escurecimento dos grãos obtidos por Silva (2007), onde cada progênie $F_{2:3}$ foi avaliada individualmente quanto ao escurecimento dos grãos. Para isso, os grãos de cada planta F_2 foram colocadas em uma embalagem plástica transparente com diâmetro de 5 cm e comprimento de 21 cm. Aos 30, 60 e 90 dias após a colheita, foi avaliado o escurecimento de grãos utilizando uma escala de notas variando de 1 a 5, sendo 1 a cor de fundo de grão muito clara, 2 mediantemente claro, 3 claro, 4 mediantemente escuro, 5 muito escuro (FIGURA 1). As notas foram atribuídas por dois avaliadores isoladamente, e para as análises foi considerada a média desses avaliadores.

Para o presente estudo foram utilizadas as notas aos 60 dias, pois segundo Silva (2007) essa seria a melhor época para avaliação dessa característica.



FIGURA 1 Escala de notas utilizada na avaliação do escurecimento das sementes de feijão.

Fonte: Silva (2007).

3.2 Extração e quantificação do DNA total

Uma amostra de 16 sementes de cada progênie foi semeada em bandejas de isopor de 96 células com substrato e germinadas em casa de vegetação com irrigação controlada. Quinze dias após a semeadura foram coletadas folhas para a extração do DNA total dessas plantas. Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (LGMol).

Cerca de 2,0 gramas de folhas jovens de cada progênie, foram maceradas em nitrogênio líquido e posteriormente colocadas em 600 μ L de tampão de extração, em um almofariz. O tampão de extração constituído de 2% de CTAB, 100 mM de Tris (pH 8,0), 20mM de EDTA (pH 8,0), 0,2% de β -mercaptoetanol,

1,4 M de NaCl, 1% PVP. O macerado vegetal foi colocado em tubos *ependorfs* em banho-maria por 30 minutos a 65°C. A extração dos ácidos nucleicos foi realizada com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), separando-se a fase orgânica da fase aquosa por centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos e coletando-se o sobrenadante. À fase aquosa, em um novo tubo, foi acrescentado álcool (95%) acetato de amônio (6M) gelado (6:1), sendo que os ácidos nucleicos foram precipitados por 24 horas no *freezer*.

Após a precipitação do DNA, centrifugou-se novamente por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi deixado em temperatura ambiente para secagem. Posteriormente, os ácidos nucleicos foram solubilizados em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM). À solução foi acrescentado álcool (95%) acetato de sódio (3M) gelado (20:1), deixando-se precipitar os ácidos nucleicos por 24 horas no freezer.

Após a segunda precipitação, uma nova centrifugação foi feita a 12.000 rpm por 10 minutos, o *pellet* foi diluído em tampão TE com RNase-A, a uma concentração final de 10µg/mL e a digestão foi feita a 37°C por 30 minutos. À solução foi acrescentado isopropanol gelado, deixando-se precipitar por uma hora no *freezer*. Após precipitação centrifugou-se novamente por 20 minutos a 10.000 rpm. O *pellet* foi seco à temperatura ambiente e então diluído em água pura.

A concentração do DNA genômico foi estimada em eletroforese de gel de agarose 1%, utilizando-se 5µL de *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) como padrão. Alíquotas das diferentes concentrações de DNA foram usadas para padronizar o estoque de uso para todos os genótipos a 10ng/µL, diluindo-se em água pura. O DNA de cada progênie foi acondicionado em geladeira a 4°C.

3.3 Reações de microssatélites

Os dados da avaliação fenotípica realizados por Silva (2007) foram analisados, e a partir desses, foram selecionadas 13 progênies avaliadas como portadoras de grãos escuros e 13 progênies avaliadas como portadoras de grãos claros, para confecção de dois bulks contrastantes de acordo com a metodologia proposta por Michelmore (1991), a fim de se identificar o polimorfismo relacionado ao escurecimento precoce dos grãos.

Quantidades equimolares de DNA das 13 progênies com grãos escuros e das 13 progênies com grãos claros, foram utilizados para a montagem dos *bulks* contrastantes, juntamente com os *bulks* foram avaliados também dois indivíduos considerados de grãos escuros e dois considerados de grãos claros, para auxiliar na identificação de híbridos dentro dos *bulks*. Foram testados 444 pares de *primers* SSR específicos para feijoeiro disponíveis no LGMol.

Nas reações foram utilizados 25 ng de DNA genômico, 100µM de cada um dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), uma unidade da enzima Taq DNA polimerase, 50mM de Tris pH 8,3, 20mM de KCL, 2mM de MgCl₂, 10µg de BSA, 0,25% de Ficoll 400, 10mM de tartrazina e água, completando um volume final de 12µL. As amplificações foram realizadas em termociclador modelo *Mastercycler Eppendorf*, no qual foi empregado o seguinte programa: dois minutos a 95°C para desnaturação do DNA; seguidos de nove ciclos, sendo 20 segundos à 94° C para desnaturação, 20 segundos para anelamento do *primer*, cujas temperaturas variaram de 46°C a 68° C de acordo com o *primer* e 20 segundos a 72° C para síntese de DNA; seguidos de mais 25 ciclos sendo 20 segundos, à temperatura de 94° C para desnaturação do DNA; 20 segundos, para anelamento do *primer* à temperaturas que variaram de 46 a 60°C,

de acordo com o *primer*; 20 segundos a 72° C para síntese de DNA e uma extensão final de quatro minutos à 72° C.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese, em gel de poliacrilamida 6% não desnaturantes, e corados com nitrato de prata de acordo com protocolo modificado de Creste et al. (2001).

3.4 Análises dos microssatélites

Os marcadores polimórficos foram avaliados em um total de 185 progênies F_{2,3}. Uma matriz de dados foi então gerada, onde as colunas representam os diferentes indivíduos da progênie e as linhas constituem os marcadores moleculares. Quanto a análise fenotípica, as progênies com notas inferiores a 2,5 foram consideradas claras e as progênies com notas superiores ou iguais a 2,5 foram consideradas escuras.

A segregação dos marcadores foi avaliada com o auxílio do programa GQMOL versão 2006.9.1 (Cruz & Schuster, 2004) aplicando o teste estatístico qui-quadrado (χ^2) testando a hipótese de segregação esperada(1:2:1) para um marcador codominante numa população F₂.

Um mapa genético de ligação, baseado nos dados fenotípicos da F₂ para os marcadores microssatélites polimórficos, foi construído utilizando o programa GQMOL. Os critérios utilizados foram um LOD *score* mínimo 3,0 e frequência máxima de recombinação de 30%. As frequências de recombinação foram corrigidas baseadas na função de distância de mapa de Kosambi.

Ainda utilizando o programa GQMOL, foram realizadas análises de QTL para marcas simples de cada marcador com a média das notas. Foram realizadas ainda regressão múltipla utilizando o método backward (Draper & Smith, 1998) com o auxílio do aplicativo computacional SISVAR 5.3 (Ferreira, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Marcadores microssatélites

Dos 444 pares de *primers* testados, 13 apresentaram algum polimorfismo, sendo que apenas oito possibilitaram a diferenciação entre os *bulk* (PV35, PV67, PV59, PV176, PVEST-6, PVEST-98, X57022, PVM02TC116). As sequências desses oito pares de *primers* estão apresentados na TABELA 1. O baixo polimorfismo encontrado entre os locos avaliados pode estar relacionado à estreita base genética da cultura, pois os genitores do cruzamento avaliado são linhagens elites do mesmo centro de domesticação (Mesoamericano), e principalmente, do tipo carioca desenvolvidos no Estado de Minas Gerais, o que justifica a reduzida variabilidade alélica encontrada.

A baixa geração de marcas polimórficas tem sido um problema para construção de mapas em várias espécies com base genética estreita (Fatokun et al., 1992; Menéndez et al., 1997).

TABELA 1 Sequências de nucleotídeos dos oito marcadores polimórficos

| Marcador | Sequência 5'-3' (Fow) |
|--------------------|---|
| PV35 | TCTACGCGTTCCCTCTGTCT AGTGGATGTGTGGGAAAAGC |
| PV67 | TGAGCCATATATTTTTCTCACTCTT ATGGGCATGGTGGATGATTAG |
| PV59 | TTGAGTGAGCCCATATATTTTTCTC GTTGGTGTGGGAAGAGAGGA |
| PV176 | GAGGAAAGAGAAAGCAACAGAGA AGTTTGAGGAGCAGGAGCAG |
| PVESTBR-6 | TTTTGAGGATTGGGAATATTGG TCAAATGGACTCACGATTAACCTGC |
| PVESTBR-98 | TCTTTAACAGCGCACACTTT GTTGGAAAACGACAGTAGGAACC |
| X57022 | AAGGATGGGTTCCGTGCTTG CACGGTACACGAAACCATGCTATC |
| PVM02 TC116 | CGCCATTTGGATTGGATT AGGCGTGGAAGTGGAGTG |

Fonte: Bean Improvement Crop - BIC (2010)

4.2 Segregação dos marcadores na população segregante

Os testes de χ^2 para os oito marcadores foram altamente significativos, indicando que os marcadores apresentaram uma segregação distorcida em relação à esperada (TABELA 2). Vale salientar que a população utilizada possui

185 progênies F_{2,3}, um tamanho mais do que suficiente para evitar a distorção de segregação por acaso. Segundo Xu (2008) se os marcadores apresentam distorção de segregação eles estão associados a genes para a viabilidade onde ocorre seleção gamética ou zigótica.

Evidências mostraram que marcadores com desvio de segregação não agrupam aleatoriamente nos mapas de ligação (Thoquet et al., 2002).

TABELA 2 Teste de χ^2 da segregação fenotípica da geração F₂, e dos oito marcadores microssatélites polimórficos.

| Caráter | Escuro | | Claro | Segregação | χ^2 |
|-----------------------------|--|--|--|-------------------|----------|
| Avaliação fenotípica | 146 | | 39 | 3:1 | 1,515 ns |
| Marcador | A_i¹A_i^{1*} | A_i¹A_i^{2*} | A_i²A_i^{2*} | Segregação | |
| PV35 | 67 | 27 | 91 | 1:2:1 | 98,98** |
| PV67 | 56 | 55 | 74 | 1:2:1 | 33,90** |
| PV59 | 60 | 59 | 66 | 1:2:1 | 24,65** |
| PV17 | 50 | 35 | 100 | 1:2:1 | 98,51** |
| PVESTBR-6 | 64 | 6 | 58 | 1:2:1 | 105,69** |
| PVESTBR-98 | 63 | 72 | 50 | 1:2:1 | 10,91** |
| X57022 | 67 | 44 | 73 | 1:2:1 | 50,48** |
| PVM02 TC166 | 70 | 68 | 47 | 1:2:1 | 18,70** |

*A_i¹A_i¹ refere-se à proporção do homozigoto para o alelo A_i¹ para o iésimo marcador, A_i¹A_i² refere-se a proporção observada de heterozigotos do iésimo marcador e A_i²A_i² refere-se a proporção observada do homozigoto para o alelo A_i² para o iésimo marcador .

Não existem trabalhos relacionados à identificação molecular de QTLs de escurecimento de grãos em feijão na literatura, esse fator foi decisivo para a consideração desses marcadores no mapeamento desse caráter. Entretanto, se marcadores com distorção de segregação são usados no mapeamento de QTLs e a distorção é ignorada a eficiência em detectar o QTL é levemente reduzida. Se o mapa é denso essa perda de eficiência pode ser considerada desprezível. E ainda se o marcador co-segrega com o QTL, este é completamente determinado pelo marcador sendo irrelevante a distorção (XU, 2008).

Harushima et al. (1996) e Lyttle (1991) reportaram que o desvio da proporção de segregação Mendeliana esperada tem sido observado em progênies de cruzamentos intra e interespecíficos e a causa desses desvios são os fatores de distorção da segregação que afetam a competição entre os gametas ou causam a falha do gameta ou zigoto.

Altos níveis de desvios foram encontrados em vários cruzamentos, intra e interespecíficos, envolvendo o gênero *Citrus*, independente da espécie e do tipo de marcador utilizado (Oliveira et al., 2004). Tanksley et al. (1992) sugeriram que rearranjos cromossômicos, seleção gamética, zigótica e/ou pós-zigótica podem causar desvios de segregação em várias espécies. Segundo Ruiz & Asins (2003), a presença de fatores letais recessivos e o favorecimento de alguns alelos na seleção gamética ou aborto do embrião, por exemplo, são possíveis causadores de segregação distorcida em citros em nível gamético e zigótico.

4.3 Análise de ligação

Um grupo de ligação de 80,49cM foi obtido, onde seis dos oito marcadores polimórficos foram agrupados, de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo programa GQMOL. (FIGURA 2)

O marcador PVM02TC116 apresentou frequência de recombinação igual a zero, indicando que ele co-segrega com o QTL em questão, outros dois marcadores, X57022 e PVEST-98 apresentaram distância de 2cM. Esses três marcadores por apresentarem uma frequência de recombinação muito baixa, podem oferecer grande auxílio na realização de seleção assistida contra o escurecimento precoce dos grãos. Esse fato é de extrema importância, pois pode diminuir muito o tempo de avaliação para essa característica, uma vez que a

planta portadora do marcador e do QTL de interesse pode ser identificada logo após a germinação.

Os outros três marcadores polimórficos, PV176, PV35 e PV67, apesar de mais distantes com 12,24, 33,1 e 33,1cM, respectivamente, também foram integrados ao grupo. Embora distantes, esses marcadores podem ser úteis em futuras pesquisas que visem à saturação do mapa de ligação do feijoeiro.

Os marcadores PV59 e PVEST-6 não foram agrupados, por estarem a mais de 50cM dos outros, ou seja, não ligados e portanto, inúteis para auxiliar na seleção indireta.

É inquestionável que o marcador PVM02TC116 é o ideal para a seleção assistida. Apesar de ter apresentado desvio de segregação, seu χ^2 está entre os menores. Aliado a isso, a frequência de recombinação zero indica que um alelo do marcador sempre ocorreu como o genótipo do QTL para grão claro e o outro alelo como genótipo para grão escuro, assegurando assim a sua utilidade, conforme afirma Xu (2008).

Os dois marcadores situados a 2cM juntamente com o PV176, estão flanqueando o QTL e o uso deles também propicia grande eficiência da seleção assistida (FIGURA 2). Por exemplo, o uso do PVESTBR98 e o PV176 simultaneamente, implica em ocorrência de permuta dupla de apenas 0,12%, admitindo-se ausência de interferência, para se selecionar a planta com os dois marcadores sem o QTL de interesse (Ramalho et al., 2008). Como os marcadores microssatélites são do tipo codominante, pode-se selecionar as plantas homozigóticas para os dois marcadores e a seleção assistida será praticamente 100% eficiente.

Os resultados obtidos a partir da regressão múltipla e o método de seleção do modelo backward (Ferreira, 2000), foram concordantes com o mapeamento gerado pelo GQMOL, exceto quanto ao marcador X57022, que não

foi considerado. Isso ocorreu, provavelmente porque no procedimento de análise os dois marcadores, X57022 e PVESTBR-98 foram considerados variáveis multicolineares, isto é, por mapearem-se muito próximas, são correlacionadas, e apenas uma é suficiente para participar do modelo (Draper & Smith, 1998). O coeficiente de determinação do modelo de regressão ajustado foi de 41,2% e corresponde a porcentagem da variação da cor do grão explicada pelos três marcadores (PVESTBR-98, PVM02TC116, PV176) (TABELA 3)

TABELA 3 Análise de variância para as variáveis PVM02TC166, PVESTBR-98, PV176

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|---------------------|-----------|-------------------------|-----------|-----------|-----------------|
| Modelo | 3 | 77.857 | 25.952 | 44.187 | 0.000 |
| Erro | 181 | 106.306 | 0.587 | | |
| Total Corrigido | 184 | 184.163 | | | |
| Total não Corrigido | 2487,312 | | | | |
| Média | 3.528 | Raiz do QME | 0.766 | | |
| R ² | 0.423 | R ² ajustado | 0.413 | | |
| CV(%) | 21.720 | | | | |

É importante mencionar que a avaliação fenotípica dos marcadores foi praticamente isenta de erro. Porém, a avaliação fenotípica da herdabilidade de escurecimento do grãos é passível de algum erro experimental (Silva, 2007).

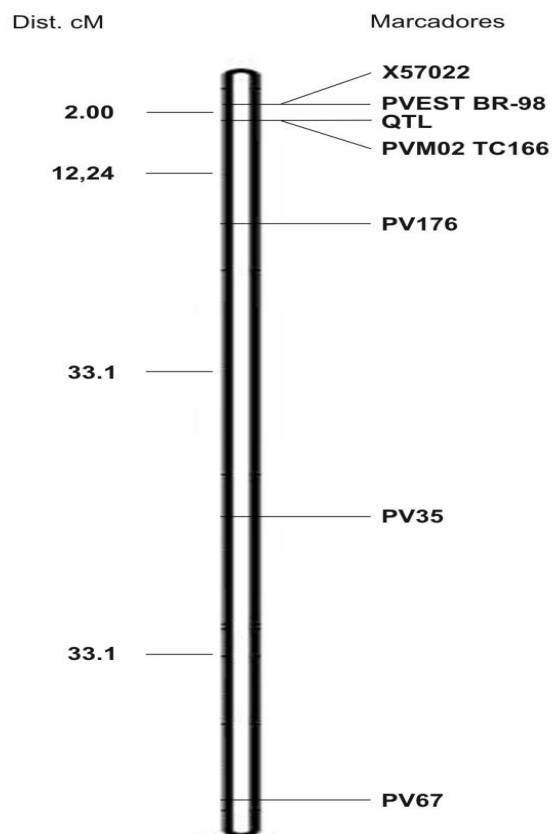


FIGURA 2 Mapa de ligação com o melhor ordenamento e as distâncias estimadas pela função Kosambi (cM) entre os seis marcadores ligados e o QTL.

Nas análises de variância por marca simples, feitas para verificar quais marcadores explicam a variação no escurecimento do grão, novamente os resultados são semelhantes ao da regressão (TABELA 4).

TABELA 4 Resumo das análises de variância das notas de escurecimento de grãos por marcadores.

| Marcador | GL | QM | F | P | Média | | |
|------------|----|-------|-------|------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | | | | $A_i^1 A_i^1$ * | $A_i^1 A_i^2$ * | $A_i^2 A_i^2$ * |
| PV176 | 2 | 13,55 | 15,71 | 0,00 | 4,01 | 3,53 | 3,17 |
| PVM02TC116 | 2 | 34,69 | 55,01 | 0,00 | 4,29 | 3,68 | 2,84 |
| PVESTBR-98 | 2 | 41,70 | 75,32 | 0,00 | 4,31 | 3,65 | 2,70 |
| PV35 | 2 | 0,189 | 0,18 | 1,00 | 3,59 | 3,46 | 3,52 |
| PV59 | 2 | 2,13 | 1,97 | 0,14 | 3,66 | 3,13 | 3,32 |
| PVESTBR-6 | 2 | 0,29 | 0,29 | 1,00 | 3,54 | 3,47 | 3,60 |
| X57022 | 2 | 0,03 | 0,03 | 1,00 | 3,51 | 3,56 | 3,52 |
| PV67 | 2 | 1,02 | 1,02 | 0,36 | 3,44 | 3,67 | 3,47 |

* $A_i^1 A_i^1$ refere-se às médias de escurecimento do homocigoto para o alelo A_i^1 para o iésimo marcador, $A_i^1 A_i^2$ refere-se às médias de escurecimento dos heterocigotos do iésimo marcador e $A_i^2 A_i^2$ refere-se às médias de escurecimento do homocigoto para o alelo A_i^2 para o iésimo marcador .

Observa-se na TABELA 4, as médias de escurecimento de grão dos três genótipos dos marcadores. Entre eles os três primeiros marcadores que correspondem aos mais úteis para seleção assistida, possuem médias particulares para cada genótipo.

Nota-se que o marcador X57022 também não explicou as variações no escurecimento de grão. As médias dos três genótipos foram praticamente iguais. O fato desse marcador ter sido mapeado a 2cM do QTL pode ser devido ao forte desvio de segregação observado para o mesmo. Assim, com a disponibilidade de outros marcadores mais eficientes, seu uso na seleção assistida não é recomendado.

5 CONCLUSÃO

Os marcadores PVM02TC116 e PVESTBR-98 mostraram-se os mais eficientes para o uso na seleção assistida, afim de selecionar linhagens que não apresentem escurecimento precoce dos grãos.

O uso simultâneo dos marcadores PV176 e PVESTBR-98 flanqueando o QTL de interesse, também confere elevada eficiência da seleção assistida.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZATE-MARIN, A. L.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Seleção assistida por marcadores 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, jul. 2005.

ANDERSON, J. W.; SMITH, B. M.; WASHNOCK, C. S. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 70, n. 3, p. 464-474, Mar. 1999.

ARNHEIM, N.; STRANGE, C.; ERLICH, H. Use of pooled DNA samples to detect linkage disequilibrium of polymorphic restriction fragments and human disease: studies of the HLA class II loci. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, v. 82, n. 20 p. 6970-6974, Oct. 1985

BEAN IMPROVEMENT CROP. Disponível em:
<<http://www.css.msu.edu/bic/>>. Acesso em: 15 jan. 2010.

BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany**, London, v. 76, n. 2, p. 113-176, 1995.

BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C.; SCHUCH, M. W.; VINI, S. S. Caracterização molecular de cultivares de pessegueiro e nectarineira com microssatélites. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 26, n. 3, p. 490-493, Dez. 2004.

BLAIR, M. W.; DÍAZ, J. M.; HIDALGO, R.; DÍAZ, L. M.; DUQUE, M. C. Microsatellite characterization of Andean races of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics: international journal of plant breeding research**, Berlin, v. 116, n. 1, p. 29-43, Dec. 2007.

BLAIR, M. W.; GIRALDO, M. C.; BUENDÍA, H. F.; TOVAR, E.; DUQUE, M.C.; BEEBE, S.E. Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics: international journal of plant breeding research**, Berlin, v. 113, n. 1, p. 100-109, June 2006a.

BLAIR, M.W.; MUÑOZ, C.; GARZA, R.; CARDONA, C. Molecular mapping of genes for resistance to the bean pod weevil (*Apion godmani* Wagner) in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**: international journal of plant breeding research, Berlin, v. 112, n. 5, p. 913-923, Mar. 2006b.

BULISANI, E. A. **Feijão carioca: uma história de sucesso**. 2008. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/Feijao Carioca/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/Feijao_Carioca/index.htm)>. Acesso em: 17 fev. 2010.

BURR, K. H.; KON, S.; MORRIS, H. J. Cooking rates of dry beans as influenced by moisture content, temperature and time of storage. **Food Technology**, Chicago, v. 22, n. 3, p. 336-338, Apr. 1968.

BUSO, G. S. C.; AMARAL, Z. P. S.; BRONDANI, R. P. V.; FERREIRA M. E. Microsatellite markers for the common bean *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 252-254, Mar. 2006.

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

CEOLIN, A. C. G.; GONÇALVES-VIDIGAL, C.; VIDGAL FILHO, P. S.; KVITSCHAL, M. V.; GONELA, A.; SCAPIM, C. A. Genetic divergence of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) group Carioca using morpho-agronomic traits by multivariate analysis. **Hereditas**, Lund, v. 144, n. 1, p.1-9, Sept. 2007.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb>>. Acessado em: 10 jan. 2010.

CRESTE, S.; TULMANN, A.; FIGUEIRA, A. Detection of Single Sequence Repeat Polymorphism in denaturing Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 19, n. 4, p. 299-306, Dec. 2001.

CRUZ, C. D.; SCHUSTER, I. **GQMOL: Genética quantitativa e molecular**. Laboratorio de Bioinformatica. Viçosa, MG: UFV, 2004. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/home3.html>>. Acesso em: 14 dez. 2009.

DÍAZ, L. M.; BLAIR, M. W. Race structure within the Mesoamerican gene pool of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as determined by microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**: international journal of plant breeding research, Berlin, v. 114, n. 1, p. 143-154, Dec. 2006.

DRAPER, N. R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. 3. ed. New York: J. Wiley & Sons, 1998.

FATOKUN, C. A.; DANESH, D.; MENANCIO-HAUTEA, D. I.; YOUNG, N. D. A linkage map for cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] based on DNA markers (2N = 22). In: O'BRIEN, J. S. (Ed.). **Genetic maps**: a compilation of linkage and restriction maps of genetically studied organisms. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1992. p. 6256-6258.

FERREIRA, D. F. **Eficiência de métodos de mapeamento de locos quantitativos (QTLs) e da seleção assistida por marcadores moleculares**. 1995. 209p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**: sistema de análises estatísticas para dados balanceados. Lavras: UFLA/ DEX, 2000.

FERREIRA, L. G.; TELES, F. L.; DAVI, G. S.; KOZLOWSKI, A. L. R.; NUNES, R. C.; BUSO, G. S. G.; BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; MELO, L. C.; PELOSO, M. J.; BASSINELLO, P. Z.; SIBOV, S. T.; CARNEIRO, M. S. Utilização de marcadores microssatélites na construção de mapa genético em feijoeiro comum, visando a identificação de QTLs Associados ao Teor de Proteínas em Grãos. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 3., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Embrapa, 2005. p. 579-581.

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

FONSECA, J. R.; SILVA, E. T. da. Emprego da análise multivariada na caracterização de germoplasma de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, São Paulo v. 19, n. 2, p.334-340, 1997.

FUSCALDI, K. C; PRADO, G. R. Análise econômica da cultura do feijão. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 44-55, jan./mar. 2005.

GUTIERREZ, N.; AVILA, C. M.; RODRIGUEZ-SUAREZ, C.; MORENO, M. T.; TORRES, A. M. Development of SCAR markers linked to a gene controlling absence of tannins in faba bean. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 19, n. 4, p. 305-314, May 2007.

HARUSHIMA, Y.; KURATA, N.; YANO, M.; NAGAMURA, Y.; SASAKI, T.; MINOBE, Y.; NAKAGAHARA, Y. Detection of segregation distortions in an indica-japonica rice cross using a high-resolution molecular map. **Theoretical Applied Genetics**: international journal of plant breeding research, Berlin, v. 92, n. 1/2, p. 145-150, July 1996.

IADEROZA, M.; SALES, A. M.; BALDINI, V. L. S.; SARTORI, M. R.; FERREIRA, V. L. P. Polyphenol oxidase activity and alterations in colour and levels of condensed tannins during storage of new bean (*Phaseolus*) cultivars. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 154-164, jul./dez. 1989.

LEMO, L. B.; OLIVEIRA, R. S. de; PALOMINO, E. C.; SILVA, T. R. B. Características agrônomicas e tecnológicas de genótipos de feijão do grupo comercial Carioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 4, p. 319-326, abr. 2004.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 44, n. 3, p. 397-401, Mar. 1989.

LYTTLE, T. W. Segregation distorters. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 25, p. 511-557, Dec. 1991.

MARQUES JÚNIOR, O. G.; RAMALHO, M. A. P. Determinação da taxa de fecundação cruzada do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) nas diferentes épocas de semeadura em Lavras - Minas Gerais. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 19, n. 3, p. 339-341, jul./set. 1995.

MELO, L. C.; MELO, P. G. S.; FARIA, L. C. DE; DIAZ, J. L. C.; PELOSO, M. J. D.; RAVA, C. A.; COSTA, J. G. C. da. Interação com ambientes e estabilidade de genótipos de feijoeiro-comum na Região Centro-Sul do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 5, p. 715-723, maio 2007.

MENÉNDEZ, C. M.; HALL, A. E.; GEPTS, P. A genetic linkage maps of cowpea (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between two inbred, domesticated lines. **Theoretical and Applied Genetics**: international journal of plant breeding research, Berlin, v. 95, n. 8, p. 1210-1217, Dec. 1997.

MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulk segregant analysis a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, n. 1, p. 9828-9832, Nov. 1991.

MIKLAS, P. N.; KELLY, J. D.; BEEBE, S. E.; BLAIR, M. W. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 147, n. 1/2, p. 105-131, Jan. 2006.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em : 17 dez. 2009.

NASS, L. L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (eds.). **Recursos genéticos e melhoramento-plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 29-56.

NASSAR-ABBAS, S. M.; PLUMMER, J. A.; SIDDIQUE, K. H. M.; WHITE, P. F.; HARRIS, D.; DODS, K. Nitrogen retards and oxygen accelerates colour darkening in faba bean (*Vicia faba* L.) during storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 47, n. 1, p. 113-118, Jan. 2008.

OLIVEIRA, R. P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Genetic linkage maps of “Pera” sweet orange and “Cravo” mandarin with RAPD markers. **Pequisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 2, p. 159-165, fev. 2004.

RAMALHO, M. A. P.; PINTO, C. A. B. P.; SANTA CECÍLIA, F. C. Avaliação de amostra de cultivares de feijão roxo e seleção de progênies. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 35-43, jan. 1982.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. 4. ed. Lavras: UFLA, 2008. 472p.

RIBEIRO, N. D. **Escolha de genitores de feijoeiro por meio da diversidade genética**. 2001. 80p. Tese (Pós-doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

RIOS, A. O.; ABREU, C. M. P.; CORREA, A. D. Efeitos da época de colheita e do tempo de armazenamento no escurecimento do tegumento do feijão. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 3, p. 550-558, jul./set. 2002.

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

RUIZ, C.; ASINS, M. J. Comparison between *Poncirus* and *Citrus* genetic linkage maps. **Theoretical and Applied Genetics: international journal of plant breeding research**, Berlin, v. 106, n. 5, p. 826-836, Mar. 2003.

SANTOS, J. B. dos; ANDRADE, M. A. de; RAMALHO, M. A. P.; SANTA CECILIA, F. C.; LIMA, L. A. de P. Seleção de progênes e estimativa de parâmetros genéticos em variedade local de feijoeiro. In: EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS. **Projeto feijão: relatório anual 73/75**. Belo Horizonte, 1978. p. 58-60.

SANTOS, P. S. J. dos; ABREU, A. de F. B.; RAMALHO, M. A. P. Seleção de linhas puras no feijão "Carioca". **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 2, p. 1492-1498, mar./abr. 2002.

SANTOS, S. C.; RUGGIERO, C.; SILVA, C. L. S. P. Marcadores microssatélites para *Carica papaya* L. cv. Sunrise solo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 263-267, ago. 2003.

SARTORI, M. R. Armazenamento. In: ARAUJO, R. S.; AGUSTÍN RAVA, C.; STONE, L. F.; ZIMMERMANN, M. J. de O. (Coord.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Potafos, 1996. p. 543-562.

SARTORI, M. R. **Technological quality of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) stored under nitrogen**. 1982. 92p. Dissertation (PhD in Grain Science) - Kansas State University, Manhattan.

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

SILVA, L. C. **Simulação do tamanho da população e da saturação do genoma para mapeamento genético de RILs**. 2005. 120 p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

TALBOT, D. R.; ADANG, M. J.; SLIGHTOM, J. L.; HALL, T. C. Size and organization of a multigene family encoding phaseolin, the major seed storage protein of *Phaseolus vulgaris*. **Molecular & General Genetics**, New York, v. 198, n. 1, p. 42-56, Apr. 1984.

THOQUET, P.; GHERARDI, M.; JOURNET, E. P.; KERESZT, A.; ANE, J. M.; PROSPERI, T.; HUGUET, J. M. The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume genomics 81 and the isolation of agronomically important genes. **BMC Plant Biology**, Stuttgart, v. 2, n. 1, p.1- 13, Jan. 2002.

VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 600 p.

VIEIRA, E. S. N. **Similaridade genética entre cultivares de feijão do grupo carioca por meio de marcadores morfológicos e moleculares visando a verificação da pureza genética**. 2000. 84 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.