

Epígrafe

“ Em ti Senhor, confio; nunca me deixes confundido
livra-me pela tua justiça. Porque és a minha rocha
e minha fortaleza, pelo que por amor do teu nome,
guia-me e encaminha-me”

Salmos 31.17

A Deus,

fonte da vida, a quem tudo devo.

Aos meus pais, Amélia e Pedro (in memoria),

pelo amor, apoio, compreensão e encorajamento.

Aos meus filhos, Kayinfa, Tamika e Nathan,

pelo amor, suporte e compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus irmãos, Ruben e Maria Luísa,

amigos de todas as horas,

DEDICO

Ao meu esposo, Luis, pelo carinho, amor, amizade, compreensão e companheirismo,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Criador, pelo dom da vida, por permitir que pessoas admiráveis façam parte da minha vida, o que muito tem contribuído para o meu profissionalismo e humanidade e por iluminar os meus passos e dar-me forças para superar as dificuldades.

Ao meu pai, Pedro Manthenga, que sempre viverá em mim. Desde sempre e para sempre meu exemplo de força, firmeza, honestidade e respeito pelo próximo. À minha mãe, meu porto seguro, meu alicerce, pelo carinho, conselhos e encorajamento.

Ao meu esposo, pelo amor, paciência e dedicação sempre, por ajudar-me com as responsabilidades por mim assumidas e por tudo fazer para que me torne uma pessoa melhor.

À Universidade Eduardo Mondlane e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade de realização deste estudo.

Ao Centro de Biotecnologia e IIAM-DCA, por fornecer a estrutura e ambiente para a realização deste trabalho.

À Aliança para Revolução Verde em África (AGRA), pelo apoio financeiro e à Dra Madakaze Rufaro pelo encorajamento e apoio moral.

À Fundação Ford ó Bill e Melinda Gates pelo suporte financeiro para parte das actividades de pesquisa.

Ao Prof. Inácio Maposse e ao Prof. Tomás Chiconela, por terem conseguido esta oportunidade e pela confiança.

Ao Doutor Rogério Chiulele, pela incansável orientação, ensinamentos, conselhos, oportunidades durante o percurso da formação, paciência, confiança e amizade.

À Doutora Ivone Muocha, pela co-orientação, sábias sugestões, amizade e apoio moral.

À Doutora Ana Ribeiro e Ivete Maquia, pelo apoio, orientação, paciência, amizade e ânimo durante as actividades no Laboratório de Biotecnologia.

À Doutora Anabela Zacarias pelo encaminhamento e à Doutora Celestina Joshua, pelo material para o ensaio, disponibilizado através do IIAM e CIAT, pelas sugestões e amizade.

À Direcção Executiva do FNI, especialmente à Doutora Alsácia Atanásio, pelo encorajamento e apoio.

Aos funcionários da FAEF, particularmente, às Sras. Helena e Cláudia e o Sr, Banze, pelos serviços prestados, atenção e amizade.

Aos companheiros do curso e amigos, Janete, Lizarda, Guilengue, Cossa, Lídia, Nhamona, Laura e outros, pelo incentivo, apoio, amizade, companheirismo e aconselhamento em vários momentos do curso.

A todos que, de certa forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Não encontro palavras que expressem tamanha gratidão.

MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA

Dirce Cândida da Conceição Pedro Manthenga Madeira, nasceu a 05 de Junho de 1982, na cidade de Maputo. Concluiu, no ano de 1994, o ensino Primário, na cidade de Nampula. Em 2001, concluiu o Ensino Médio, na Escola Secundária Joaquim Marra, na cidade de Chimoio. Em Agosto de 2002, iniciou o Curso de Ciências Agrárias (Licenciatura), na Universidade Católica de Moçambique. Em 2007, realizou o trabalho de conclusão de curso sobre o uso de diatomites no controle de insectos sugadores e minadores na cultura de feijão verde, em Umbelúzi. No ano 2008, foi apurada em concurso público para integrar no quadro de pessoal do Fundo Nacional de Investigação, Ministério da Ciência e Tecnologia, onde, até à data, é funcionária. Em 2011, ingressou para o Curso de Pós-graduação em Produção Vegetal, nível de Mestrado, na Universidade Eduardo Mondlane, tendo como linha de pesquisa o Melhoramento Genético de Plantas.

DECLARAÇÃO DE HONRA

Declaro que esta dissertação resulta de uma investigação por mim feita, tendo sido citadas todas as fontes e nunca antes foi submetida para a obtenção de qualquer grau numa instituição educacional.

Dirce Manthenga Madeira

Índice

Epígrafe	i
DEDICATÒRIA	ii
AGRADECIMENTOS.....	iii
BIOGRAFIA	v
DECLARAÇÃO DE HONRA	vi
Índice.....	vii
Lista de tabelas	ix
Lista de figuras	x
Lista de anexos	xi
RESUMO	xii
Siglário	xiii
ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	xiv
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Generalidades sobre a cultura do feijão vulgar.....	1
1.2 Problema e justificação do estudo.....	2
1.3 Objectivos.....	4
1.3.1 Geral	4
1.3.2 Específicos.....	4
Referências bibliográficas	4
CAPÍTULO II: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1 Introdução.....	9
2.2 Descrição da cultura.....	9
2.3 Origem e domesticação do feijão vulgar	10
2.4 Morfologia do feijão vulgar.....	11
2.5 Produção e consumo do feijão vulgar	12
2.6 Diversidade genética	13
2.7 Marcadores morfológicos	15
2.8 Marcadores moleculares	16
2.8.1 Utilização de marcadores microssatélites em feijão vulgar	18
Referências bibliográficas	20
CAPÍTULO III: AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE 43 GENÓTIPOS DE FEIJÃO VULGAR COM BASE EM MARCADORES MORFOLÓGICOS	31

Resumo.....	31
3.1 Introdução.....	32
3.2 Material e métodos.....	33
3.2.1 Descrição do local de estudo	33
3.2.2 Material usado no estudo	33
3.2.3 Desenho experimental, descrição do ensaio e dos tratamentos e colheita de dados	35
3.2.1 Avaliação dos caracteres qualitativos e quantitativos	36
3.2.3 Análise de dados.....	38
3.3 Resultados.....	38
3.3.1 Análise de variância, correlação, herdabilidade e desempenho de 43 genótipos estudados em relação às variáveis quantitativas.	38
3.3.2 Agrupamento dos 43 genótipos com base em características quantitativas (cluster analysis).....	42
3.3.3 Análise das médias, correlação e hereditariedade das variáveis qualitativas (hábito de crescimento, forma do folíolo, curvatura da vagem e cor da semente) de 43 genótipos	43
3.3.4 Agrupamento dos 43 genótipos com base em características qualitativas (cluster analysis).....	46
3.4 Discussão	48
3.5 Conclusões e Recomendações	50
Referências bibliográficas	50
CAPÍTULO IV. AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE 43 GENÓTIPOS DE FEIJÃO VULGAR COM BASE EM MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	54
Resumo.....	54
4.1 Introdução.....	55
4.2 Material e métodos.....	56
4.2.1 Colheita de amostras	56
4.2.2 Extração de ADN	56
4.2.3 Amplificação por PCR dos marcadores SSRs.....	56
4.3 Resultados.....	58
4.4 Discussão	58
4.5 Conclusões e Recomendações	59
Referências bibliográficas	59
SUMÁRIO DA DISSERTAÇÃO.....	63
Anexos.....	64

Lista de tabelas

Tabela 1: lista dos genótipos estudados	34
Tabela 2: resumo do efeito dos blocos e genótipos nas variáveis estudadas: altura da planta (AltP), número de dias até à floração (NDF), número de sementes por vagem (NSV), número de vagem por planta (NVP), peso de 100 sementes (P100S) e rendimento do grão (Rend) de 43 genótipos de feijão vulgar	39
Tabela 3: coeficientes de correlação fenotípica entre as variáveis número de dias até a floração, número de sementes por vagem, número de vagens por planta, peso de 100 sementes e rendimento do grão	39
Tabela 4: herdabilidade no sentido lato (H^2) das variáveis estudadas: altura da planta (AltP), número de dias até a floração (NDF), número de sementes por vagem (NSV), número de vagens por planta (NVP), peso de 100 sementes (P100S) e rendimento do grão de 43 genótipos de feijão vulgar	40
Tabela 5: número de dias até a floração (NDF) e peso de 100 sementes (P100S) de 43 genótipos de feijão vulgar	41
Tabela 6: hábito de crescimento (HCr), cor da semente (CorS), forma da folha (FF) e curvatura da vagem (CurV) de 43 genótipo de feijão vulgar	45
Tabela 7: coeficientes de correlação fenotípica entre os caracteres altura da planta (AltP), cor da semente (CorS), curvatura da vagem (CurV), forma do folíolo (FF) e hábito de crescimento (HCr)	46
Tabela 8. variância fenotípica, genotípica, ambiental e herdabilidades das variáveis cor da semente (CorS), curvatura da vagem (CurV), forma do folíolo (FF) e hábito de crescimento (HCr) de 43 genótipos de feijão vulgar.....	46
Tabela 9: <i>Primers</i> SSRs utilizados para estudos de diversidade genética	57

Lista de figuras

Figura 1: Características da morfologia do feijão vulgar.....	12
Figura 2. Sementes dos genótipos estudados	35
Figura 3. Precipitação registada durante o ensaio	36
Figura 4. Rendimento dos 43 genótipos estudados.....	42
Figura 5. Dendograma dos genótipos estudados com base nos 6 caracteres quantitativos.....	43
Figura 6. Dendograma dos genótipos estudados com base nos 4 caracteres qualitativos	47
Figura 7. Gel de agarose com o ADN dos 43 genótipos.....	58
Figura 8. Gel de poliacrilamida com marcadores SSR	58

Lista de anexos

Anexo 1. Esquema do experimento	65
Anexo 2. Lista dos genótipos usados no estudo	66
Anexo 3. Protocolo de extracção de ADN usado	67
Anexo 4. Média dos caracteres quantitativos e qualitativos	68
Anexo 5. ANOVA para os caracteres estudados	69
Anexo 6. Correlação para os caracteres estudados	74

RESUMO

O feijão vulgar (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma espécie com centros de diversidade primários localizados no continente americano. Esta leguminosa constitui o alimento mais difundido no mundo, dado que é uma importante fonte de proteínas, aminoácidos e calorias para as populações carenciadas, especialmente da América Latina e África. A existência de diversidade genética é condição essencial para a existência de um programa de melhoramento genético da cultura, visto que aumenta as possibilidades de selecção de cultivares superiores. Desta forma, este trabalho teve como objectivo avaliar a diversidade genética de 43 genótipos de feijão vulgar existentes em Moçambique, usando marcadores morfológicos e marcadores moleculares microsatélites. Um experimento foi conduzido nos campos da Direcção de Ciências Animais, na Província de Maputo. O delineamento usado foi o de blocos completos casualizados, com 43 tratamentos (genótipos) em três repetições. Para a análise morfológica, 6 caracteres quantitativos e 4 qualitativos foram analisados segundo os descritores para o feijão vulgar desenvolvidos pelo IPGRI e CIAT. Os resultados mostraram a existência de efeitos significativos do factor genótipo, nas variáveis número de dias até a floração, peso de 100 sementes e o rendimento do grão. Ainda nas variáveis em análise, houve correlação positiva forte apenas entre o peso da semente e o rendimento do grão. Os coeficientes de herdabilidade no sentido lado (H^2) variaram de 12 a 99,9%; tendo a característica altura da planta apresentado o maior coeficiente (99,9%) seguido do rendimento do grão e peso de 100 sementes com 41,4 e 35,7% respectivamente, enquanto o número de sementes por vagem e a altura da planta tiveram os coeficientes mais baixos, 16 e 12%, respectivamente. Pela análise de variância, os genótipos testados tiveram diferenças significativas no número de dias até a floração, o peso da semente e rendimento do grão, sendo que os genótipos CIM-RM-03-42-14, Seq. 1003 e Bat 447 florido mais cedo, relativo ao peso da semente o feijão branco teve maior peso em detrimento do BF 13607-9, que teve o peso mais baixo e, conseqüentemente, o feijão branco teve maior rendimento em relação ao BF 13607-9. A amplificação do ADN através dos marcadores moleculares microsatélites (SSRs), foi realizada através de reacções em cadeia de polimerase (PCR) e os fragmentos amplificados foram separados em gel de poliacrilamida. Os SSRs empregues para a obtenção da diversidade genética foram pouco informativos e não foram capazes de gerar o polimorfismo adequado do ADN para a distinção dos genótipos.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L., diversidade genética, marcadores morfológicos SSR.

Siglário

%	ó percentagem	NSV	ó número de semente por vagem
FAO	ó Food Agricultural Organization	D.C.	ó depois de cristo
Ca	ó cálcio	P100S	ó peso de 100 sementes
IIAM	ó Instituto de Investigação Agrária de Moçambique	Mb	ó mega par de base
Cu	ó cobre	Rend.	ó rendimento
NPK	ó nitrogénio, fósforo e potássio	g	ó grama
Fe	ó ferro	C.V.	ó coeficiente de variação
IPIGRI	ó International Plant Genetic Resource Institute	cm	ó centímetro
Mn	ó manganês	mM	ó milimolar
CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical		mm	ó milímetro
Mg	ó magnésio	HCl	ó ácido clorídrico
Vg	ó variância genética	m	ó metro
Zn	ó zinco	TRIS	ó Tris- (Idroximetil)metilamina HCl
Ve	ó variância ambiental	m ²	- metro quadrado
ADN	ó desoxi-ribonucleic acid	NaCl	- cloreto de sódio
Vp	ó variância fenotípica	kg/ha	ó quilograma por hectare
RFLP	ó Restriction Fragment Length Polymorphism	EDTA	ó Ácido Etileno-Diamino-Tetracético
GL	ó graus de liberdade	ADN	ó ácido desoxi-ribo nucleico
RAPD	- Random Amplified Polymorphic	SDS	ó Sódio Dodecil Sulfato
AltP	ó altura da planta	H ²	ó herdabilidade (lato)
SNP	ó Single Nucleotide Polymorfism	DCA	ó Direcção de Ciências Animais
NDF	ó número de dias até a floração		
PCR	ó Polimerase Chain Reaction		
NVP	ó número de sementes por vagem		
SSR	ó Simple sequence repeated		

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação está organizada em capítulos e contêm 4, que por sua vez encontram-se subdivididos em sub-capítulos e sub-unidades. Os capítulos estão organizados da seguinte forma:

- Capítulo I: Introdução geral da dissertação que consiste de generalidades sobre o feijão vulgar, o problema e justificação do estudo, os objectivos do estudo, divididos em gerais e específicos.
- Capítulo II: Revisão bibliográfica que consiste na descrição da cultura, a origem e distribuição da cultura, a morfologia, a produção e consumo, a diversidade genética do feijão vulgar, o uso de marcadores moleculares na cultura, com ênfase para os marcadores morfológicos e microssatélites.
- Capítulo III: Avaliação da diversidade genética de 43 genótipos de feijão vulgar com base em marcadores morfológicos. Este capítulo apresenta uma introdução do estudo, materiais e métodos, resultados, discussão, conclusões e recomendações.
- Capítulo IV: Avaliação da diversidade genética de 43 genótipos de feijão vulgar com base em marcadores microssatélites. Este capítulo, a semelhança do anterior, apresenta uma introdução do estudo, materiais e métodos, resultados, discussão, conclusões e recomendações.
- Finalmente é apresentado o Sumário da dissertação

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

1.1 Generalidades sobre a cultura do feijão vulgar

O feijão vulgar (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma importante cultura alimentar, principalmente para as populações mais desfavorecidas. É uma leguminosa cultivada, principalmente, nas zonas tropicais e sub-tropicais para a obtenção de grão seco, vagens verdes e, em menor escala, para uso do grão fresco descascado (Rulkens, 1996). Dada a sua riqueza em proteínas (cerca de 25% de peso seco), o feijão vulgar é uma importante componente da dieta humana, especialmente para as populações africanas e latino-americanas de baixa renda, cujas dietas são essencialmente à base de cereais, raízes e tubérculos, pobres em proteínas (Evans & Bandemer, 1967; CIAT, 1990; Debouck, 1999; Gepts *et al.*, 2008). A cultura é também rica em aminoácidos essenciais como lisina e treonina, possui quantidades consideráveis de vitaminas (folatos) e minerais (Ca, Cu, Fe, Mn, Mg, Zn) (Miklas, 2006). Os maiores produtores de feijão vulgar são a Índia e o Brasil, localizados na Ásia e América, respectivamente. Na África tropical, o feijão vulgar é maioritariamente cultivado na parte oriental: Quênia, Etiópia, Uganda, Ruanda, Burundi, Zaire e ocidental: Tanzânia, Malawi, Zimbabwe e Moçambique.

Em Moçambique, o feijão vulgar é a terceira leguminosa mais importante depois do amendoim e do feijão nhemba (Garreth, 1994). É cultivado maioritariamente pelo sector familiar para a obtenção de grão, embora a produção para a vagem verde tenha uma expressão significativa perto dos grandes centros urbanos. A cultura é consumida em todo o país, preferencialmente na forma de grão. As maiores produções do feijão vulgar provêm das regiões de grande altitude (1300 a 1600m), como são os casos dos planaltos de Lichinga e Angónia durante a época chuvosa (Rulkens, 1996). Contudo, há também produções consideráveis nas regiões de média altitude (1200m) como Manica, onde é cultivado durante todo o ano, e nas zonas de baixa altitude, como no sul do país, onde é cultivado durante a época seca em condições de rega (Rulkens, 1996).

Apesar de ser uma cultura importante, os rendimentos obtidos nas machambas dos camponeses continuam ainda muito baixos. Estudos feitos por Jochua *et al* (2003) indicam que o rendimento médio nacional é de cerca de 750kg/ha, contrastando com o rendimento potencial de cerca de 5000kg/ha obtido em condições de boa gestão cultural (Gepts, 1993). Dentre os factores que contribuem para a baixa produtividade da cultura destacam-se os défices hídricos e excesso de

chuva em períodos críticos do desenvolvimento da cultura, a falta de semente de boa qualidade, a baixa fertilidade dos solos, o inadequado manejo da cultura, o ataque de pragas e doenças, o uso de variedades não melhoradas devido, principalmente, à inexistência de um programa local de melhoramento genético da cultura (Chiorato, 2004).

O desenvolvimento de um programa local de melhoramento genético do feijão vulgar poderia contribuir significativamente para o aumento da produtividade da cultura, através do desenvolvimento de variedades mais adaptadas às condições reais dos locais de produção, para além de responder às necessidades e preferências dos produtores e consumidores. Para o efeito, seria necessário o conhecimento da diversidade genética, principalmente em casos onde se pretenda reunir alelos desejáveis em um único indivíduo (Nass *et al.*, 2001). Todavia, até então, não há informação sobre a diversidade genética das variedades existentes e cultivadas em Moçambique. Por isso, o presente estudo foi conduzido com o objectivo de avaliar a diversidade genética das variedades de feijão vulgar cultivadas em Moçambique.

1.2 Problema e justificação do estudo

A existência de diversidade genética é uma das condições determinantes para o estabelecimento de um programa de melhoramento genético de uma cultura. O conhecimento da diversidade genética melhora a eficiência na identificação de combinações parentais necessárias para gerar populações segregantes, com máxima variabilidade genética para a selecção (Williams *et al.*, 1990). Estudos conduzidos noutros locais referem que o feijão vulgar possui uma ampla diversidade genética (Cardoso, 2009).

Em Moçambique, pesquisas para se determinar a diversidade genética do feijão vulgar são escassas. Como resultado, não há um programa local de melhoramento genético. Até ao presente, as actividades de melhoramento que têm lugar consistem, apenas, na testagem de variedades introduzidas pelos programas regionais e internacionais de melhoramento da cultura. Podendo, ser libertadas variedades com características que não respondem às necessidades e preferências dos produtores e consumidores nacionais.

A diversidade genética pode ser de natureza quantitativa e preditiva. A diversidade genética quantitativa pode ser determinada através de análises dialélicas enquanto a preditiva pode ser determinada com base na análise das diferenças morfológicas, de qualidade nutricional,

fisiológicas ou moleculares quantificadas em alguma medida de dissimilaridade que expresse o grau de diversidade genética entre os genitores (Cruz e Carneiro, 2006).

Tatiene *et al.* (1996) e Chiorato *et al.* (2007) referem que, as características fenotípicas, tradicionalmente usadas para a caracterização e estimativa da divergência genética, apesar de importantes, podem ser de uso limitado porque, geralmente, são influenciadas pelo ambiente e pelo estágio de desenvolvimento da planta. Todavia, elas podem ser usadas para fornecer informação preliminar sobre a diversidade genética, onde as análises moleculares não possam ser feitas por razões de falta de recursos financeiros. Em contrapartida, as isoenzimas e marcadores de ADN, que não são influenciados pelo ambiente, são os mais adequados para a caracterização do germoplasma, mas têm a desvantagem de alguns serem de elevado custo e pouco acessíveis para estudos iniciais de caracterização genética.

Dos marcadores moleculares baseados em PCR, os microssatélites têm sido os mais utilizados por serem bastante informativos, co-dominantes, reproduzíveis e apresentarem uma larga cobertura do genoma (Blair *et al.*, 2006; Caixeta *et al.*, 2006). Os marcadores SSR têm sido referidos como sendo ferramentas excelentes para a caracterização genética do feijão vulgar (Gaitán-Solís *et al.*, 2002; Métais *et al.*, 2002; Masi *et al.*, 2003; Hanai *et al.*, 2007; Blair *et al.*, 2007; Blair *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2000). Singh *et al.* (1991) sugeriram que dados agro-morfológicos, bioquímicos e moleculares devem ser combinados para estudos de diversidade, uma vez que esta combinação oferece resultados complementares.

Nos últimos anos, a diversidade genética tem sido determinada com recurso aos marcadores moleculares (Campos *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2010, Yu *et al.*, 2010), morfológicos e agronómicos (Carbonell *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2010). Dentre os marcadores moleculares disponíveis, actualmente, destacam-se os RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic ADN*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), microssatélites ou SSR (*Simple SequencyRepeats*), entre outros, que podem ser utilizados nas análises de diversidade genética das mais variadas espécies (Métais *et al.*, 2002; Emygdio *et al.*, 2003).

O presente estudo foi conduzido para avaliar a diversidade genética dos genótipos de feijão vulgar cultivado em Moçambique, usando marcadores morfológicos clássicos e marcadores moleculares microssatélites.

1.3 Objectivos

1.3.1 Geral

Avaliar a diversidade genética de 43 genótipos de feijão vulgar

1.3.2 Específicos

- Avaliar a relação genética entre os genótipos de feijão existentes, usando caracteres morfológicos:
- Avaliar a diversidade genética dos genótipos de feijão através de marcadores moleculares microssatélites.

Referências bibliográficas

- Blair, M.W.; Buendia, H.F.; Giraldo, M.C.; Metais, I.; Peltier, D. 2008. Characterization of AT-rich microsatellites in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 118, 91-103.
- Blair, M.W.; Díaz, J.M.; Hidalgo, R.; Díaz, L.M.; Duque, M.C. 2007. Microsatellite characterization of Andean races of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 116, 29643.
- Blair, M.W.; Giraldo, M.C.; Buendía, H.F.; Tovar, E.; Duque, M.C.; Beebe, S.E. 2006. Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 113, 1006109.
- Caixeta, E.T.; Oliveira, A.C.B.; Brito, G.G.; Sakiyama, N.S. 2006. Tipos de Marcadores moleculares. Pp 9-78. In: Caixeta, E. T.; Borém, A. (Eds). *Marcadores Moleculares*. Editora UFV.Viçosa.
- Campos, T.; Oblessuc, P.R.; Sforça, D.A.; Ardosso, J.M.K.; Baroni, R.M.; Sousa, A.C.B.; Carbonell, S.A.M.; Chioratto, A.F.; Rubiano, L.L.B.; Souza, A.P. 2011. Inheritance of growth habit detected by genetic linkage analysis using microsatellites in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular Breeding*, 27, 549-560.

- Carbonell, S.A.M.; Chiorato, A.F.; Gonçalves, J.G.R.; Perina, E.F.; Carvalho, C.R.L. 2010. Tamanho de grão comercial em cultivares de feijoeiro. *Ciência Rural*. 40 (10), 2067-2073.
- Cardoso, J. 2009. Estimativa da diversidade genética entre acessos do tipo carioca de feijão comum com base em marcadores moleculares. Dissertação de Mestrado. Instituto Agronômico de Campinas.
- Centro Internacional De Agricultura Tropical (CIAT) 1990. Snap bean in the developing world: potential benefits of research. Pp 89-115. In: Henry, G.; Janssen, W. (Eds). Trends in CIAT commodities CIAT, Cali , Colombia.
- Chen, J; Zhang, X.; Jing, R.; Blair, M.W.; Mao, X.; Wang, S. 2010. Cloning and genetic diversity analysis of a new P5CS gene from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 120, 1393-1404.
- Chiorato, A.F. 2004. Divergência genética em acessos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) do banco de germoplasma do Instituto Agronômico de Campinas (IAC). *Dissertação (Mestrado em Melhoramento Vegetal)*. Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Campinas, 85p.
- Chiorato, A.F.; Carbonell, S.A.M.; Benchimol, L.L.; Chiavegato, M.B.; Dias, L.A.S; Colombo, C.A. 2007. Genetic diversity in common bean accessions evaluated by means of morpho-agronomical and RAPD data. *Scientia Agrícola*, 64 (3), 256-262.
- Cruz, C.D.; Carneiro, P.C.S. 2006. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 2a edição, Viçosa, UFV, 585p.
- Debouck, D.G. 1999. Diversity in *Phaseolus* species in relation to the common bean. Pp. 25-52. In: Singh, S. P. (Ed.). Common bean improvement in the twenty-first century. Dordrecht: Kluwer.
- Emygdio, B.M.; Antunes, I.F.; Nedel, J.L.; Choer, E. 2003. Diversidade genética em cultivares locais e comerciais de feijoeiro baseado em marcadores RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38, 1165-1171.

- Evans, R.J. and S.L. Bandemer. 1967. Nutritive value of legume seed proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 15, 439-443.
- Gaitan-Solís, E.; Duque, M.C.; Edwards, K.J.; Tohme, J. 2002. Microsatellite in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* sp. *Crop Science*, 42, 2128-2136.
- Gareth, D. 1994. Estudo sobre a cultura do feijão vulgar (*Phaseolus vulgaris* L.) dentro do sistema de produção no Planalto de Niassa. Comunicações Série Agronómica. Instituto Nacional de Investigação Agrária.
- Gepts, P. 1993. The use of molecular and biochemical markers in crop evolution studies. *Evol. Biol.* 27, 51 ó 94.
- Gepts, P.; Aragão F.; de Barros E.; Blair M.W.; Brondani R.; Broughton W.; Galasso I.; Hernández G.; Kami J.; Lariguet P.; McClean P.; Melotto M.; Miklas P.; Pauls P.; Pedrosa-Harand A.; Porch T.; Sánchez F.; Sparvoli F.; Yu K. 2008. Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. Pp113-143. In: Moore P, Ming R (Eds). *Genomics of Tropical Crop Plants*, Springer.
- Gonçalves, J.G.R.; Chiorato, A.F.; Morais, L.K.; Perina, E.F.; Farias, F.L.; Carbonell, S.A.M., 2010. Estudo da estabilidade fenotípica de feijoeiro com grãos especiais. *Ciência e Agrotecnologia*, 34 (4), 922-931.
- Hanai, L.L.; Campos, T.; Camargo, L.E.A.; Benchimol, L.L.; Souza, A.P.; Melotto, M.; Carbonell, S.A.M.; Chioratto, A.F.; Consoli, L.; Formighieri, E.F.; Siqueira, M.V.B.M.; Tsai, T.M.; Vieira, M.L.C. 2007. Development, characterization and comparative analysis of polymorphism at common bean-SSR loci isolated from genic and genomic sources. *Genome*, 50, 266-277.
- Jochua, C.N. *et al.*, (2003). Pathotype variation and sources of resistance to the common bean pathogen in Southern Mozambique. Plant Pathology Department, University of Nebraska and INIA. Maputo, Mozambique.

- Litt, M.; Luty, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by invitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44, 398-401.
- Masi, P.; Spa, P.L.; Gnoletti Zeuli; Donini, P. 2003. Development and analysis of multiplex microsatellite markers sets in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular Breeding*, 11, 303-313.
- Métais, I.; Hamon, B.; Jalouzot, R.; Peltier, D. 2002. Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library. *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 1346-1352.
- Miklas, P.N.; Kelly, J.D.; Beebe, S.E.; Blair, M.W. 2006. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. *Euphytica*, 147, 105-131
- Nass, L.L.; Valois, A.C.C.; Melo, I.S.; Valadares-Inglis, M.C. 2001. *Recursos Genéticos & Melhoramento de Plantas*. Fundação MT, 1183p.
- Rulkens, T. 1996. Apontamentos da disciplina de produção vegetal. Universidade Eduardo Mondlane. Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal. Maputo, 18-23p.
- Singh, S.P.; Nodari, R.; Gepts, G. 1991. Genetic diversity in cultivated common bean. I. Allozymes. *Crop Science*, 31, 1962-3.
- Tatiene, V.; Cantrell, R. G.; Davis, D. D. 1996. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. *Crop Science*, 36, 186-192.
- Williams, J. G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A.; Tingey, S., V. 1990. ADN polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.
- Yu, K.; Park, S.J.; Poysa, V.; Gepts, P. 2000. Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *The Journal of Heredity*, 91, 429-434.

Yu, Z.; Zhan, X.; Han, G.; Wnag, R.W.; Anh, V.; Chu, K.H. 2010. Proper distance metrics for phylogenetic analysis using complete genomes without sequence alignment. *Molecular Sciences*, 11, 1141-1154.

Zhang, X.; Blair, M.W.; Wang, S. 2008. Genetic diversity of Chinese common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces assessed with single sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 117, 629-640.

CAPÍTULO II: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Introdução

O presente capítulo consiste na revisão de estudos feitos sobre a diversidade genética das culturas no contexto da avaliação da diversidade genética do feijão vulgar em Moçambique. Para além de se rever assuntos sobre a diversidade genética, é também feita a revisão de outros assuntos que podem ajudar a explicar, ou a determinar, a diversidade genética de uma cultura. Particular enfoque é dado aos aspectos que irão ajudar a clarificar a diversidade genética do feijão vulgar em Moçambique. Os seguintes aspectos são revistos neste capítulo: (1) descrição da cultura, (2) origem e domesticação do feijão vulgar, (3) morfologia do feijão vulgar, (4) produção e consumo do feijão vulgar, (5) diversidade genética do feijão vulgar, (6) uso de caracteres morfológicos e marcadores moleculares na determinação da diversidade genética das culturas. No ponto 6, é feita a apreciação dos principais conceitos sobre o tema e procura-se abordar, a partir de estudos similares, questões que podem ajudar a compreender melhor o assunto pesquisado.

2.2 Descrição da cultura

O feijão vulgar (*Phaseolus vulgaris* L.) pertence à família *Leguminosae* e ao género *Phaseolus*. Este género compreende cerca de 55 espécies, das quais somente cinco são cultivadas para consumo humano, nomeadamente, *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus coccineus*, *Phaseolus acutifolius* e *Phaseolus polyanthus*. Dentre as espécies cultivadas, o feijão vulgar é o mais cultivado (Debouck, 1999).

Esta leguminosa é uma planta anual que cresce em todos os continentes, nas mais variadas condições ambientais. É um diplóide verdadeiro ($2n=2x=22$) e possui um genoma pequeno estimado entre 450 e 650 Mb (Bennett e Leitch, 1995). É uma planta autógama em que a autofecundação é o processo predominante para a obtenção de novos grãos ou sementes. Estima-se que a taxa de fecundação cruzada varia entre 3% e 5% (Burle *et al.*, 2010) podendo sofrer variações de 1% até mais de 50%, de acordo com o ambiente de cultivo e as épocas de sementeira que influenciam a presença e frequência de insectos polinizadores (Borém e Caixeta, 2005).

2.3 Origem e domesticação do feijão vulgar

É muito importante para o melhorador saber onde se encontra, geograficamente, a variabilidade genética da cultura em estudo. Com base em informações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas Gepts *et al.*, 1986; Koenig *et al.*, 1990; Gepts e Bliss 1985; Koenig e Gepts, 1989, estabeleceram a hipótese de três centros de origem para o feijão vulgar, o primeiro no México e na América Central (Mesoamericano), o segundo na região Andina, e o terceiro, de menor importância, na Colômbia. Para a determinação destes centros de origem, os autores basearam-se em características como o tipo de faseolina (principal proteína de reserva de feijões selvagens e cultivados) e o tamanho das sementes. Gepts e Bliss (1986) observaram três tipos principais de faseolina entre os cultivares de feijão, tipo *S* (Sanilac), tipo *T* (Tendergreen) e tipo *C* (Contender), sendo o tipo *S* associado à região Mesoamericana (92%), o tipo *T* à região Andina (50%) e o tipo *C* à região de encontro das duas regiões, andina e mesoamericana.

De acordo com Gepts (1999), o feijão vulgar consiste em dois *pools* genéticos, o mesoamericano e o andino, estes *pools* genéticos são caracterizados por possuírem características morfológicas e bioquímicas (faseolina) diferentes (*S*, *T* e *C*). A cultura tem como centro de origem primário a América Central, tendo sido domesticada no México e na Guatemala, e nos Andes, com ênfase no Peru) (Gepts *et al.*, 1986). O resultado do *pool* genético é distinto (tamanho da semente). Evidências arqueológicas indicam que o feijão vulgar foi domesticado há 6000 D.C. no Peru e no México, e foi, posteriormente, levado para outras partes do mundo no século XVI (Gep *et al.*, 1986; Gepts, 1999).

Gepts e Bliss (1986) também observaram que genótipos cultivados mostraram os padrões de faseolina *S*, *T* e *C*, bem como um novo padrão *B*, semelhante aos padrões identificados em acessos selvagens de feijão vulgar da Colômbia, sugerindo, desta forma, que a Colômbia é o local de encontro do germoplasma andino e mesoamericano e centro de domesticação do feijão vulgar. A partir do século XVI, o feijão vulgar foi levado para outras partes do mundo pelos portugueses, que introduziram esta planta em África através de Sofala (Moçambique), Zanzibar e Mombassa e, daí, foi transportada para zonas altas do interior (Gepts, 1999).

Koenig e Gepts (1989), com base nas diferenças entre as frequências dos alelos de nove *loci* polimórficos isoenzimáticos, identificaram cinco grupos geográficos em populações silvestres, sendo elas: México, América Central, Colômbia, Sul do Peru e Argentina. Essa observação disponibilizou dados para que Singh *et al.* (1991) propusessem a diferenciação de raças dentro de

cada *pool* genético. O termo *raça* é usado para designar um grupo de cultivares relacionados dentro de um determinado *pool* genético, seja ele meosamericano ou andino (Gepts, 1988).

Alguns autores salientam que a selecção natural sofrida pela espécie implicou o aparecimento de raças eco geográficas em cada um dos dois *pool* genéticos (Singh *et al.*, 1991; Beebe *et al.*, 2000; Díaz e Blair, 2006). Desta forma, o grupo genético andino foi subdividido em três raças, denominadas de raça Nueva Granada (N), representando feijões com sementes de tamanho médio a grande (> 40g/100 sementes), faseolina tipo $\delta T\delta$ e hábitos de crescimento tipo I e II; raça Peru (P), com sementes grandes, faseolina dos tipos $\delta T\delta$, $\delta C\delta$, $\delta H\delta$ e $\delta A\delta$, hábitos de crescimento III e IV e adaptados a altitudes acima de 2.000 metros; raça Chile (C), representada por feijões com sementes de tamanho médio e ovais, geralmente com mais de uma cor, faseolina tipo $\delta C\delta$ e $\delta H\delta$, hábito de crescimento do tipo III e composta tipicamente por raças locais do Chile (Singh *et al.*, 1991).

O *pool* genético mesoamericano também foi dividido em três raças: raça Mesoamérica (M), representado por feijões com sementes pequenas (< 25 g/100 sementes) com tegumento de coloração preta e vermelha, faseolina tipo S, hábitos de crescimento tipo II e III, sendo encontrada no México e América Central; raça Durango (D), com feijões de sementes médias (25 a 40 g/100 sementes), faseolina tipo S com folhas pequenas, hábito de crescimento tipo III e adaptadas a áreas de sequeiro do México e raça Jalisco (J) representando feijões de tamanho de sementes médias, faseolina tipo $\delta S\delta$, hábito de crescimento tipo IV e encontradas em áreas húmidas do México (Singh *et al.*, 1991).

2.4 Morfologia do feijão vulgar

O feijão vulgar (*Phaseolus vulgaris* L.) pertence à família *Leguminosae*, que se distingue em dois tipos principais de variação, o erecto e o trepadeiro; os tipos erectos, são insensíveis ao fotoperíodo, de ciclo curto, plantas pequenas com 20-60cm de altura, com inflorescências laterais e terminais e crescimento determinado (Rulkens, 1996). A planta tem uma raiz principal que chega a uma profundidade de 1m, tem raízes laterais extensivas, sobretudo, na camada superficial entre 15-20cm. A planta erecta tem um desenvolvimento forte do caule principal e dos seus ramos, levando folhas trifoliadas, as folhas e os caules são um pouco pubescentes, as flores são pequenas e variam de cor (branco a azul) e são auto polinizadas. As vagens têm um comprimento

de 10-20cm, erectas ou curvadas, contendo 4-6 sementes, às vezes mais, e estas variam de tamanho (7-16mm de comprimento). Geralmente, os tipos erectos são preferidos para a produção comercial porque a maior parte da cultura amadurece à mesma altura, o que facilita a colheita mecânica (Dourado e Fancelli, 2000; Vieira *et al.*, 1998)

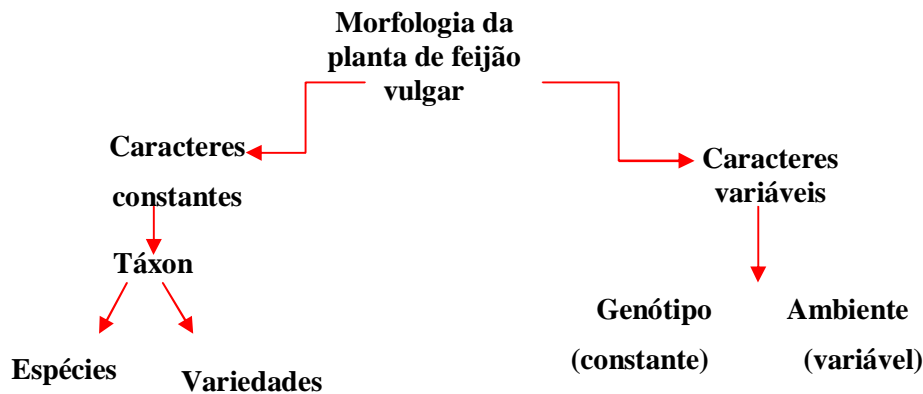


Figura 1: Características da morfologia do feijão vulgar

2.5 Produção e consumo do feijão vulgar

O feijão vulgar é uma espécie de grande interesse agronómico no mundo. Esta leguminosa representa um dos alimentos mais importantes da dieta alimentar humana (Angioi *et al.*, 2010). A cultura é de extrema importância, principalmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, por ser uma fonte acessível de proteínas, ferro, cálcio, zinco, vitaminas do complexo B, carbo-hidratos, fibras e lisina (Mesquita *et al.*, 2007). Considerando todos os géneros e espécies de feijão que fazem parte das estatísticas da FAO publicadas em 2011, a produção mundial de feijão situou-se em torno de 23,3 milhões de toneladas de grão produzidos em cerca de 29,2 milhões de hectares em todo o mundo, resultando numa produtividade de 7.959,3 kg/ha. A Índia é o maior produtor e contribuiu com cerca de 20% da produção mundial de feijão vulgar (FAO, 2011). Ainda segundo dados da FAO (2011), dos países que fazem fronteira com Moçambique, a Tanzânia, destacou-se como o maior produtor de feijão vulgar nos últimos cinco anos, tendo atingido 480.000 toneladas em 2008, seguida do Malawi, com 124.707 toneladas no mesmo ano, e Moçambique atingiu 46.036 toneladas.

2.6 Diversidade genética

A diversidade genética forma a vida na Terra e é indispensável para a sobrevivência e saúde biológica do planeta. Se numa determinada população todos os indivíduos tiverem, exactamente, os mesmos genes, alguma alteração no ambiente (como o ataque de uma praga) pode levá-los à extinção por serem todos igualmente susceptíveis a tal mudança. Pelo contrário, se os indivíduos possuírem genes diferentes, alguns deles, provavelmente, serão capazes de suportar a mudança e, assim, a população não se extinguirá. Os melhoradores e, de uma forma natural, os agricultores, seleccionam, a partir dos recursos genéticos disponíveis, as características que lhes permitem obter as melhores colheitas, com o objectivo de melhorar a produção. Assim, a variabilidade genética é essencial para o desenvolvimento de cultivares melhorados (Acosta-Gallegos *et al.*, 2007), sendo necessária a sua caracterização prévia para que ao mesmos sejam utilizados de forma racional e sustentável, em programas de melhoramento ou de conservação.

O estudo da diversidade genética é um processo que permite analisar a variação entre indivíduos ou grupos de indivíduos usando um método específico ou uma combinação de métodos (Pereira *et al.*, 2007). A análise envolve medições numéricas e combinações de diferentes tipos de variáveis, sendo que os mais importantes são as árvores genealógicas, pedigree, (Bernardo, 1993; Messmer *et al.*, 1993; van Hintun e Haalman, 1994), dados morfológicos, bioquímicos de isoenzimas (Hamrick e Godt, 1989) de proteínas de reserva (Smith *et al.*, 1987) e moleculares (Yu *et al.*, 2010). Cada tipo de dado fornece diferente tipo de informação e a escolha do método analítico depende do objectivo, do nível de resolução desejado, dos recursos e infra-estrutura tecnológica disponível, das dificuldades operacionais e do tempo (Karp *et al.*, 1997).

No processo de domesticação do feijão vulgar, obteve-se a selecção de características importantes para a sobrevivência da população desta leguminosa nas condições em que foi cultivada. Isso resultou no chamado ãefeito de afinilamentoö em termos de diversidade genética, ou seja, a partir de um ãbackgroundö genético bastante rico, alguns grupos de genes de interesse foram mantidos na população e outros eliminados (Gepts *et al.*, 1999). Actualmente, há um grande número de colecções de germoplasmas contendo genótipos com alto valor agronómico, capazes de ser utilizados em programas de melhoramento. No entanto, em muitos casos, o conhecimento da organização genética e da relação entre o material disponível é limitada, impedindo a sua utilização na reprodução. Mesmo dentro dessas colecções admite -se como materiais diferentes acessos duplicados do mesmo material, o que leva a uma sobre-estimação da diversidade (Koenig e Gepts, 1989).

A análise da diversidade genética tem sido realizada por meio de técnicas biométricas e processos preditivos (Elias *et al.*, 2007). Dentre as técnicas biométricas, destacam-se as análises dialélicas que avaliam as capacidades de combinação dos genitores, tanto geral quanto específica e, também, a heterose manifestada nos híbridos (Miranda Filho e Geraldí, 1984; Vencovsky e Barriga, 1992; Ferreira *et al.*, 1995). Como esse processo exige a avaliação dos genitores com suas combinações híbridas, o aumento do número de genitores pode torná-lo inviável (Elias *et al.*, 2007). Deste modo, pode ser conveniente a utilização de processos preditivos com base em diferenças entre os genitores, quantificadas por uma medida de dissimilaridade e os genótipos podem ser agrupados de forma a existir homogeneidade dentro dos grupos e heterogeneidade entre eles (Cruz e Carneiro, 2006).

Vários têm sido os métodos propostos para a análise de agrupamento (*cluster analysis*). Entretanto, os mais utilizados no melhoramento de plantas são os hierárquicos e os de otimização. Outro método que tem sido muito utilizado é o método hierárquico UPGMA (Método de Agrupamento Médio entre Grupos). A análise de agrupamento trata da identificação de grupos de indivíduos similares após estimação de uma matriz de dissimilaridade ou similaridade. Os vários métodos diferenciam-se pelo tipo de resultado e pelas diferentes formas de definir a proximidade entre indivíduos ou grupos formados. Para todos os casos, não se conhece, numa primeira fase, o número de grupos a ser estabelecido e diferentes métodos conduzem a diferentes resultados (Cruz & Carneiro, 2003).

Os métodos de agrupamento baseiam-se, principalmente, em métodos hierárquicos e de otimização. Nos hierárquicos, destaca-se o método do vizinho mais próximo, onde os agrupamentos são identificados na forma de dendrogramas. Nos de otimização, destaca-se o algoritmo de Tocher, onde o objectivo é alcançar uma partição dos indivíduos que optimize (maximize ou minimize) alguma medida predefinida. O método do vizinho mais próximo identifica os genitores mais similares na matriz de dissimilaridade, os quais são reunidos para formar o grupo inicial (Cruz e Regazzi, 1994). A aplicação do método resulta num dendrograma que permite identificar grupos homogêneos. Os métodos hierárquicos baseiam-se no princípio de que com n indivíduos inicia-se a formação de n grupos, cada um contendo um único elemento. Assim, combinam-se dois indivíduos mais semelhantes, ou seja, de menor distância para originar $n-1$ grupos. Os grupos remanescentes são combinados para originar $n-2$ grupos e assim sucessivamente, até formar um único grupo contendo n indivíduos (Cruz e Regazzi, 1994).

A utilização dos métodos de agrupamento requer medidas de similaridade ou dissimilaridade. A escolha de uma ou de outra é feita subjectivamente, tomando em consideração vários factores como a natureza das variáveis ou as escalas das medidas (Ferreira, 1993). As medidas de dissimilaridade para variáveis quantitativas são de grande importância em estudos de diversidade genética em que se procura identificar genitores a serem utilizados em programas de hibridação (Cruz e Carneiro, 2003). Na estruturação da matriz de dissimilaridade empregam-se a distância euclidiana ou a distância generalizada de Mahalanobis. Deve-se enfatizar que a distância euclidiana é uma análise baseada no teorema de Pitágoras, juntamente com a aplicação de múltiplos eixos ortogonais e quando obtida de variáveis padronizadas, torna-se mais eficaz. O esquema destes métodos de análises multivariadas no *Phaseolus vulgaris* tem sido utilizado por vários autores (Singh *et al.*, 1991; Fonseca e Silva, 1999; Ceolin *et al.*, 2002; Ferrão *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2002; Thomazella *et al.*, 2002).

Visando agregar valor ao germoplasma, sempre que possível, devem ser realizadas caracterizações morfológicas dos acessos. Entre as ferramentas utilizadas para estimar a diversidade genética, os marcadores moleculares são especialmente importantes (Vieira *et al.*, 2007, Gonçalves *et al.*, 2009, Oliveira *et al.*, 2010). Os marcadores moleculares permitem fazer estimativas da diversidade genética directamente ao nível do ADN, eliminando a interferência das variações ambientais e as limitações de tempo e de quantidade de material (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Cardoso, 2009; Leal *et al.*, 2010). Além disso, muitos marcadores estão disponíveis para cada genoma, como é o caso do feijão vulgar (Yu *et al.*, 2010). Na cultura do feijão vulgar, de um modo geral, têm sido realizados vários estudos de diversidade baseada em marcadores moleculares (Casañas *et al.*, 1999; Moraghan e Grafton, 2001; Elias *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2000).

2.7 Marcadores morfológicos

Os marcadores ou características morfológicas continuam a ser o primeiro passo em estudos taxonómicos e de relações genéticas na maioria dos programas de melhoramento genético e conservação (Cox e Murphy, 1990). De facto, estes marcadores constituem a base de selecção de genótipos para o estabelecimento das colecções de germoplasma ou de sementes. Contudo, o uso de marcadores morfológicos depende dos marcadores bioquímicos e, grande parte deles, são descritores ambíguos e têm uso limitado para a identificação de cultivares (Stegemann, 1984). A aparência morfológica não pode descrever adequadamente cultivares sem a replicação extensiva de ensaios (Lin e Binns, 1994). Assim, é somente possível fazer comparações válidas para

descritores tomados num mesmo local e numa mesma época (Smith, 1986). A caracterização morfológica fornece uma série de informações a respeito da variabilidade genética de cada acesso estudado. Esses dados auxiliam na caracterização do germoplasma, possibilitando avanços na descrição da divergência genética entre acessos. A variabilidade genética só pode ser eficientemente utilizada se for devidamente avaliada e quantificada, sendo a descrição dos acessos fundamental para a manutenção e exploração do potencial das colecções. Tal caracterização pode ser feita por meio de marcadores ou descritores morfológicos e/ou moleculares (Singh, 2001).

2.8 Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares traduzem as diferenças que ocorrem na sequência de ADN ao longo do genoma de uma determinada espécie e têm sido extensivamente utilizados na caracterização de génotipos de plantas desde 1980 (Botstein *et al.*, 1980). Estes marcadores constituem uma ferramenta vulgar para estudos de caracterização genética pois, não são influenciados pela interacção entre o génotipo e ambiente e a sua análise pode ser automatizada (Borém e Caixeta, 2006). Nos programas de melhoramento e conservação da biodiversidade, os marcadores moleculares são abundantemente utilizados para estimar os níveis de diversidade e heterozigose entre diferentes materiais (Perseguini *et al.*, 2011; Blair *et al.*, 2010; Kwak e Gepts, 2009), estimar o tipo de distribuição espacial e temporal de populações em relação ao fluxo génico (Schuster *et al.*, 2007), mapeamento genético e localização de QTLs (Quantitative Trait Loci), (Baroni, 2010; Campos *et al.*, 2011) usados na selecção assistida por marcadores (Ender *et al.*, 2008), além de auxiliar trabalhos de conservação *in-situ* e *ex-situ* pela eliminação de duplicações (Negri e Tiranti, 2010).

A análise da diversidade genética no feijão vulgar tem sido feita visando a conservação *ex-situ* e caracterização do germoplasma para utilização nos programas de melhoramento de plantas. A selecção dos diferentes tipos de marcadores moleculares depende, em grande parte, dos níveis de polimorfismo detectáveis, reprodutibilidade, especificidade dos *loci*, recursos humanos e financeiros bem como técnicos treinados. Botstein *et al.* (1980) descreveram a técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), que utilizava o método de Southern (1975), para visualizar os fragmentos de ADN e identificar polimorfismos que ocorrem devido a variações na distribuição dos sítios de restrição de uma determinada enzima no ADN de cada génotipo (Nass *et al.*, 2001). Por ser um marcador co-dominante permite distinguir os indivíduos homozigóticos dominantes dos heterozigóticos (Liu e Corde, 2004). Em adição apresenta alto

grau de reprodutibilidade, porém, é uma técnica que produz baixo nível de polimorfismo, é morosa, de trabalho intensivo e requer elevada quantidade e qualidade de ADN (Spooner *et al.*, 2005). Com o surgimento da *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Mulis & Falona, 1987), foram desenvolvidos outros marcadores a destacar:

- i. *Random Amplified PolymorphicADN* -RAPDs- (Williams *et al.*, 1990), primeiros marcadores arbitrários que utilizam sequências arbitrárias para a amplificação de locais aleatórios no genoma e são aplicados, principalmente, em análises de *fingerprint*. São rápidos e necessitam de pequena quantidade de ADN, no entanto têm a desvantagem de ser pouco reprodutíveis. (Biswas *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2008; Chiorato *et al.*, 2007; Liu e Corde, 2004).
- ii. *Amplified Fragment Length Polymorphism*-AFLPs- (Zabeu e Vos, 1993). Os AFLPs são marcadores que combinam a técnica PCR e RFLPs (distribuição aleatória de sítios de restrição entre genomas) e são empregues em análises de *fingerprint* e estudos de diversidade e mapeamento genético (Perseguiniet *al.*, 2011; Kumaret *al.*, 2008; Svetlevaet *al.*, 2006). Os AFLP geram um enorme número de polimorfismos por reacção e não necessitam de um conhecimento prévio de dados da sequência de ADN para a construção dos *primers* utilizados, não apresentam problemas de reprodutibilidade quando comparados aos RAPD mas têm um custo elevado de desenvolvimento e requerem quantidade e qualidade elevada de material genético (Faleiro *et al.*, 2001; Liu e Corde, 2004; Vos e Kuiper, 1997).
- iii. *Microsatellites ou simple sequence repeats* (SSR). Estes marcadores caracterizam-se por serem co-dominantes, abundantes, distribuídos por todo o genoma e multialélicos. O conteúdo genético informativo de um loco SSR é bastante alto, por se tratar de sequências de alta taxa evolutiva. Estes marcadores têm a vantagem de requerer baixa quantidade de ADN dos indivíduos analisados e apresentarem alta reprodutibilidade (Powell *et al.*, 1996).
- iv. *Intel Simule Sequencie Repeats*-ISSRs- (Zietkiewicz *et al.*, 1994), que amplificam regiões de ADN genómico com oligonucleotídeos cujas sequências de bases são constituídas por um motivo repetido, seguido de 2 a 6 bases arbitrárias, também utilizadas para a caracterização de genótipos, estudos de diversidade e mapeamento genético (Svetleva *et al.*, 2006).

O *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pode ser usado em marcadores co-dominantes como os microssatélites que correspondem a sequências de ADN com 1 a 6 pares de base repetidas em

tandem (Litt & Luty, 1989). Os microssatélites são altamente robustos e de fácil reprodutibilidade, tendo sido utilizados nos mais variados tipos de estudos (Blair *et al.*, 2010; Burle *et al.*, 2010; Negrie Tiranti, 2010; Kwake Gepts, 2009; Benchimolet *et al.*, 2007). Entre os marcadores moleculares existentes, os mais robustos são os AFLP (Zabeau *et al.*, 1993) e SSR (Tautz, 1989). Os microssatélites têm alto nível de polimorfismo e alta reprodutibilidade das marcas no mesmo gel, facilitando a operacionalização das análises. (Litt e Luty, 1989; Faleiro *et al.*, 2004).

Laborda *et al.* (2005), avaliando a diversidade genética em linhagens de milho tropical usando marcadores SSR encontraram um alto nível de variabilidade genética. Devido à habilidade dos SSR em revelar vários aspectos da variação genômica, essa técnica foi considerada mais apropriada para análises de diversidade. Maras *et al.* (2008) testaram a eficiência de marcadores SSR para avaliar a diversidade genética de 29 acessos de feijão vulgar com 14 combinações de pares de primers de 14 SSR. Os autores concluíram que o marcador foi eficiente para avaliar a variabilidade genética dos genótipos avaliados.

Nos últimos anos, os marcadores RAPD vêm sendo gradativamente substituídos por marcadores moleculares mais eficientes na avaliação da diversidade genética, devido à dificuldade da sua reprodutibilidade. Dentre os marcadores mais eficientes destacam-se os microssatélites que apresentam elevado nível de polimorfismo, co-dominância e padrão de herança mendeliana (Powell *et al.*, 1996).

2.8.1 Utilização de marcadores microssatélites em feijão vulgar

Os microssatélites estão distribuídos aleatoriamente por todo o genoma dos seres vivos formando *loci* polimórficos. Estes marcadores mostram-se promissores para uma ampla utilização nos programas de melhoramento por serem co-dominantes e multialélicos e fornecerem um elevado nível de informação genética por *loci*. Os microssatélites podem ser analisados a partir de qualquer tipo de tecido em qualquer estágio de desenvolvimento e têm a vantagem de necessitarem de pequena quantidade de ADN para a sua utilização (Sousa *et al.*, 2011). Os SSR têm sido usados para a análise genética do feijão vulgar, como análises dos efeitos da seleção natural (Rodrigues e Santos, 2006), conhecimento da variabilidade genética (Blair *et al.*, 2010), análises de reprodução populacional em plantas selvagens (Mori *et al.*, 2010) e cultivadas (Burle *et al.*, 2010), desenvolvimento e saturação de mapas genéticos (Campos *et al.*, 2011; Lima *et al.*,

2009), localização dos *loci* de resistência a doenças (Baroni, 2010) e selecção assistida por marcadores (Ragagnin *et al.*, 2009; Alzate-Marin *et al.*, 2005).

Gómez *et al.* (2004) avaliaram a diversidade de 12 genótipos do feijão vulgar provenientes de dezassete regiões da Nicarágua usando 20 microssatélites já previamente desenvolvidos para feijão tendo constatado a eficiência dos SSR utilizados. Sicard *et al.* (2005) estudaram a diversidade genética de raças do *Phaseolus vulgaris* L. e *Phaseolus coccineus* L. da Itália central usando três tipos de marcadores moleculares (ISSRs, SSRs e CpSSRs) e verificaram que o *Phaseolus vulgaris* apresentou maior diversidade genética do que o *Phaseolus coccineus*, para SSRs, com as estimativas de diversidade (PIC) de 0,85 para *P. vulgaris* e 0,72 para *P. coccineus*.

Rodrigues & Santos (2006) usaram 105 microssatélites para avaliar o polimorfismo em gerações derivadas do cruzamento entre os cultivares ‘Carioca MG’ x ‘ESAL 686’ ambos pertencentes à espécie *P. vulgaris*. Do total de microssatélites utilizados, 37 foram desenvolvidos por Yu *et al.* (2000) e 68 foram desenvolvidos por Gaitán-Solís *et al.* (2002). Trinta SSRs apresentaram polimorfismo para os genitores e para o ‘bulk’ da família 17 F24:27, estes *loci* foram seleccionados naturalmente, sendo que 29 alelos vieram dos genitores ‘Carioca M’ e um alelo veio do genitor ‘ESAL686’. Os autores concluíram que a selecção natural afectou todas as gerações e a sua intensidade foi específica para cada *loci* e geração. Zhang *et al.* (2008) utilizaram 30 microssatélites para avaliar a diversidade genética de 229 genótipos de feijão vulgar da China. Os resultados obtidos por este estudo indicaram que os marcadores microssatélites foram eficientes para estimar a diversidade presente nos genótipos avaliados. Com isso, os autores concluíram que a China é um dos centros secundários de diversidade genética do feijão vulgar, ou seja, formou-se a partir de tipos que migraram do centro primário (o que possui a maior diversidade de espécies).

Os SSRs têm sido usados no feijão vulgar para construir um mapa genético baseado em PCR (Yu *et al.*, 2000; Blair *et al.*, 2003) para avaliar a diversidade intra-específica entre os genes (Gaitán-Solis *et al.*, 2002) e para encontrar marcas genéticas na diversidade do feijão (Metals *et al.*, 2002). Recentemente estes mostraram-se úteis na distinção dos genótipos andinos e mesoamericanos (Blair *et al.*, 2006; Maras *et al.*, 2006). O uso de SSRs para avaliar a diversidade genética existente nos diferentes *pool* genéticos de feijão pode auxiliar a introduzir variabilidade adicional das espécies selvagens para cultivares utilizados tradicionalmente em

programas de melhoramento, mitigando os problemas de redução da variabilidade causadas pela domesticação (Koinange *et al.*, 1996).

Referências bibliográficas

- Acosta-Gallegos, J.A.; Shibata, J.K. 1989. Effects of water stress on growth and yield of indeterminate dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *Field Crops Research*, 20, 81-93.
- Alzate-Marin, A.L.; Cervigni, G.D.L.; Moreira, M.A.; Barros, E.G. 2005. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. *Fitopatologia Brasileira*, 30 (4), 333-342.
- Angioi, S.A.; Rau, D.; Attene, G.; Nanni, L.; Bellucci, E.; Logozzo, G.; Negri, V.; Spagnoletti Zeuli, P.L.; Papa, R. 2010. Beans in Europe: origin and structure of the European landraces of *Phaseolus vulgaris* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 121, 829-843.
- Baroni, R.M. 2010. Mapeamento de locos de resistência à antracnose em feijoeiro. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia). Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Campinas, 79p.
- Beebe, S.; Skroch, P.W.; Tohme, J.; Duque, M.C.; Pedraza, F.; Nienhuis J. 2000. Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. *Crop Science*, 40, 2646-273.
- Benchimol, L.L.; Campos, T.; Carbonell, S.A.M.; Colombo, C.A.; Chiorato, A.F.; Formighieri, E.F.; Souza, A.P. , 2007. Structure of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties of Mesoamerican and Andean origins using new developed microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54, 1747-1762.
- Bennet, M. D.; Leitch, I. J. 1995. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Annals of Botany*, 76, 113-176.
- Bernardo, R. 1993. Estimation of coefficient of co ancestry using molecular markers in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 85, 1055-1062.

- Biswas, M.S.; Hassan, J.; Hossain, M.M. 2010. Assessment of genetic diversity in French bean (*Phaseolus vulgaris* L) based on RAPD marker. *African Journal of Biotechnology*, 9(32), 5073-5077.
- Blair, M.W.; Chaves, A.; Tofino, A.; Calderón, J.F.; Palacio, J.D. 2010. Extensive diversity and inter-gene pool introgression in a world-wide collection of indeterminate snap bean accessions. *Theoretical and Applied Genetics*, 120, 1381-1391.
- Blair, M.W.; Giraldo, M.C.; Buendía, H.F.; Tovar, E.; Duque, M.C.; Beebe, S.E. 2006. Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 113, 1006-1009.
- Borém, A.; Caixeta, E. T. 2006. Marcadores Moleculares. Viçosa, Editora UFV, 9-78.
- Botstein, D.; White, R.L.; Skolnick, M.; Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32, 314-331.
- Burle, M.L.; Fonseca, J.R.; Kami, J.A.; Gepts, P. 2010. Microsatellite diversity and genetic structure among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary center of diversity. *Theoretical and Applied Genetics*, 121, 801-813.
- Campos, T.; Oblessuc, P.R.; Sforça, D.A.; Cardoso, J.M.K.; Baroni, R.M.; Sousa, A.C.B.; Carbonell, S.A.M.; Chioratto, A.F.; Rubiano, L.L.B.; Souza, A.P. 2011. Inheritance of growth habit detected by genetic linkage analysis using microsatellites in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular Breeding*, 27, 549-560.
- Cardoso, J. 2009. Estimativa da diversidade genética entre acessos do tipo carioca de feijão comum com base em marcadores moleculares. Campinas. *Tese de Mestrado*.
- Carvalho, M.F.; Crestani, M.; Farias, F.L.; Coimbra, J.L.M.; Bogo, A.; Guidolin, A.F. 2008. Caracterização da diversidade genética entre acessos crioulos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) coletados em Santa Catarina por marcadores RAPD. *Ciência Rural*, 38 (6), 1522-1528.

- Casañas, F.; Bosch, L.; Pujola, M.; Sanchez, E.; Sorribas, X.; Baldi, M.; Nuez, F. 1999. Characteristics of a common bean landrace (*Phaseolus vulgaris* L.) of great culinary value and selection of a commercial inbred line. *J. Sci. Food. Agric.*, 79, 693-698.
- Ceolin, A.C.G.; Vidigal, M.C.G.; Scapim, C.A.; Vidigal Filho, P.S.; Silvério, L. 2002. Divergência genética em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) por meio do uso de métodos multivariados. In: Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão, 7, Viçosa. Anais. Viçosa: Universidade federal de Viçosa.
- Chiorato, A.F.; Carbonell, S.A.M.; Benchimol, L.L., Chiavegato, M.B.; Dias, L.A.S., Colombo, C.A. 2007. Genetic Diversity in common bean 61 accessions evaluated by means of morpho-agronomical and RAPD data. *Scientia Agrícola*, 64, 256-262.
- Cooke, R. J. 1986. Gel electrophoresis: a role in agriculture. *Electrophoresis*, 7, 203-217.
- Cox, T.S.; Murphy, J.P. 1990. The effect of parental divergence on F₂ heterosis in winter wheat crosses. *Theoretical and Applied Genetics*, 79, 241-250.
- Cruz, C. D.; Regazzi, A. J. 1994. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. *Imprensa Universitária*. 390.
- Cruz, C.D. 2006. Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 442p.
- Cruz, C.D.; Carneiro, P.C.S. 2003. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, 449p.
- Debouck, D.G. 1988. Phaseolus germplasm exploration. Pp. 3-29. In: Gepts, P. (Ed.). Genetic resources of Phaseolus beans. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Debouck, D.G. 1999. Diversity in Phaseolus species in relation to the common bean. Pp. 25-52. In: Singh, S. P. (Ed.). Common bean improvement in the twenty-first century. Dordrecht: Kluwer.
- Díaz L.M, Blair MW. 2006. Race structure within the Mesoamerican gene pool of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as determined by microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 114, 143-154.

- Dourado, N.D.; Fancelli, A.L. 2000. Produção do feijão. Agropecuária. Guaíba, 385p.
- Elias, T.H.; Goncalves-Vidigal, M.C.; Gonela, A.; Vogt, G.A. 2007. Variabilidade genética em germoplasma tradicional de feijão-preto em Santa Catarina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42 (10), 1443-1449.
- Emygdio, B.M., Antunes, I.F., Choer, E., Nedel, J.L. 2003. Eficiência de coeficientes de similaridade em genótipos de feijão mediante marcadores RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38, 243-250.
- Ender, M.; Terpstra, K.; Kelly, J.D. 2008. Marker assisted selection for white mold resistance in common bean. *Molecular Breeding*, 2, 149-157.
- Faleiro, F.G., Nietsche, S., Ragagnin, V.A., Borém, A., Moreira, M.A. & Barros, E.G. 2001. Resistência de cultivares de feijoeiro-comum à ferrugem e à mancha-angular em condições de casa de vegetação. *Fitopatologia Brasileira*, 26, 86-89.
- Faleiro, F.G.; Ragagnin, V.A.; Moreira, M.A.; Barros, E.G. De. 2004. Use of molecular markers to accelerate the breeding of common bean lines resistant to rust and anthracnose. *Euphytica*, 138, 213-218.
- FAOSTAT. 2011. Disponível em <http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD>. Acesso em 06/05/2012.
- Ferrão, M.A.G.; Vieira, C.; Cruz, C.D.; Cardoso, A.A. 2002. Divergência genética em feijoeiro em condições de inverno tropical. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37 (8), 1089-1098.
- Ferreira, D.F. 1993. Métodos de avaliação da divergência genética em milho e suas relações com os cruzamentos dialélicos. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 72p.
- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3rd ed., EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, 100p.
- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. 1995. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília, Embrapa- CENARGEN, 220p.

- Fonseca, J.R.; Silva, H.T. da. 1999. Identificação de acessos de feijão por meio de técnicas multivariadas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34 (3), 409-414.
- Gaitan-Solís, E.; Duque, M.C.; Edwards, K.J.; Tohme, J. 2002. Microsatellite in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.): Isolation, characterization, and cross-Species amplification in *Phaseolus* sp. *Crop Science*, 42, 2128-2136.
- Gepts, P.; Bliss F.A. 1985. F1 hybrid weakness in the common bean: differential geographic origin suggests two gene pools in cultivated bean germplasm. *Journal Heredity*, 76, 447-450.
- Gepts, P.; Osborn, T. C.; Blake, T.; Bliss, F. A. 1986. Bean arcelin. 2. Genetic variation, inheritance and linkage relationships of a novel seed protein of *Phaseolus vulgaris*. *Theoretical and Applied Genetics*, 71, 847-855
- Gepts, P. 1988. Phaseolin as an evolutionary marker. Pp. 215-241. In: Gepts P (Ed.). Genetic resources of *Phaseolus* beans. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Gepts, P.; R. Papa, A. Gonza'lez; J. Acosta; A. Delgado-Salinas. 1999. Human effects on *Phaseolus vulgaris* adaptation during and after domestication. Pp. 161-181. In L.W.D. Van Raamsdonk and J.C.M. den Nijs (Eds.) Plant evolution in man-made habitats.
- Gómez, O. J.; Blair, M. W.; Frankow-Lindberg, B. E.; Gullberg, U. 2004. Molecular and phenotypic diversity of common bean landraces from Nicaragua. *Crop Science*, 44, 1412-1418.
- Gonçalves, L. S.; Rodrigues, R.; do Amaral Junior, A. T.; Karasawa, M.; *et al.* 2009. Heirloom tomato gene bank: assessing genetic divergence based on morphological, agronomic and molecular data using a Ward-modified location model. *Genetic Molecular Research*, 8, 364-374.
- Hamrick, J. L.; Godt, M. J. 1989. Allozyme diversity in plant species. Pp. 43-63. In Brown, A. H. D., M. T. Clegg, A. L. Kahler and B. S. Weir (Eds). *Plant Population Genetics, Breeding and Germplasm Resources*. Sinauer, Sunderland, Mass.

- Karp, A.; Edwards, K.; Bruford, M.; Vosman, B.; Morgante, M.; Seberg, O.; Kremer, A.; Boursot, P.; Arctander, P.; Tautz, D.; Hewitt, G. 1997. Newer molecular technologies for biodiversity evaluation: opportunities and challenges. *Nature Biotechnology*, 15, 625-628.
- Koenig, R. and Gepts, P. 1989. Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: Further evidence for two major centers of genetic diversity. *Theoretical and Applied Genetics*, 78 , 809-817
- Koenig, R.; Singh, S.P.; Gepts, P. 1990. Novel phaseolin types in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economy Botanic*, 44, 50660.
- Koinange, E. M.K.; Singh, S.P.; Gepts, P. 1996. Genetic control of the domestication syndrome in common bean. *Crop Science*, 36, 1037-1045.
- Kumar, V.; Sharma, S.; Kero, S.; Sharma, S.; Sharma, A.K.; Kumar, M.; Bhat, K.V. 2008. Assessment of genetic diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Scientia Horticulturae*, 116, 138-143.
- Kwak, M.; Gepts, P. 2009. Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 118, 979-992.
- Laborda, P. R.; Oliveira, K. M.; Garcia, A. A.; Paterniani, M. E.; De Souza, A. P. 2005. Tropical Maize Germplasm: What can we say about its genetic diversity in the light of molecular markers? *Theoretical Applied Genetics*, 111(7), 12886 299.
- Leal, A. A.; Mangolin, C. A.; do Amaral, A. T. J.; Gonçalves, L. S.; *et al.* 2010. Efficiency of RAPD versus SSR markers for determining genetic diversity among popcorn lines. *Genetic Molecular Research*, 9, 9-18.
- Liu, Z.J. e J.F. Cordes. 2004. Review: DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238, 1 ó 37.
- Lima, M.L.A.; Souza Jr, C.L.; Souza, A.P. 2009. Microsatellite-dense genetic map: towards genome coverage in a tropical maize (*Zea mays* L.) population. *Revista Brasileira de Botânica*, 32 (3), 499-508.

- Lin, C.S.; Binns, M.R. 1994. Concepts and methods for analyzing regional trial data for cultivar and location selection. *Plant Breeding Reviews*, 12, 271-297.
- Litt, M.; Luty, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44, 398-401.
- Machado, C.F.; Nunes, G.H.S.; Ferreira, D.F.; Santos, J.B. 2002. Genetic divergence among genotypes of common bean through multivariate techniques. *Ciência Rural*, Santa Maria, 32, (2), 251-258.
- Maras M., Sustar-Vozlic J., Javornik B., Meglic V. 2006. Temporal changes in genetic diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) accessions cultivated between 1800 and 2000. *Russian Journal of Genetics*, 42, 775-782.
- Maras, M.; Sustar-Vozlic, J.; Javornik, B.; Meglic, V. 2008. The efficiency of AFLP and SSR markers in genetic diversity estimation and gene pool classification of common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Acta Agriculturae Slovenica*, 91(1), 87-96.
- Mesquita, R.F.; Corrêa, D.A.; Abreu, P.M.C.; Lima, Z.A.R.; Abreu, B.F.A. 2007. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): Composição química e digestibilidade protéica. *Ciência e Agro tecnologia*, 31 (2), 1114-1121.
- Messmer, M.M.; Melchinger, A.L.; Hermann, R.; Boppenmaier, J. 1993. Relationships among early European maize inbreds: II. Comparison of pedigree and RFLP data. *Crop Science*, 33, 1306-1315.
- Métais, I.; Hamon, B.; Jalouzot, R.; Peltier, D. 2002. Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library. *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 1346-1352.
- Miranda Filho, J.B.; Geraldi, I.O. 1984. An adapted model for the analysis of partial diallel crosses. *Revista Brasileira de Genética*, 7 (4), 677-88.
- Moraghan, J.T., Grafton, K. 2001. Genetic diversity and mineral composition of common bean seed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 4046-408.

- Mori, G.M.; Zucchi, M.I.; Sampaio, I.; Souza, A.P. 2010. Microsatellites for the mangrove tree *Avicennia germinans* (Acanthaceae): Tools for hybridization and mating system studies. *American Journal of Botany*, 97, 79-81.
- Mullis, K.; Faloona, F. 1987. Specific synthesis of ADN in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 55, 335-350.
- Nass, L.L.; Valois, A.C.C.; Melo, I.S.; Valadares-Inglis, M.C. 2001. Recursos Genéticos & Melhoramento ó Plantas. Fundação MT, 1183p.
- Negri, V; Tiranti, B. 2010. Effectiveness of in situ and ex situ conservation of crop diversity. What a *Phaseolus vulgaris* L. landrace case study can tell us. *Genetica*, 138, 985-998.
- Oliveira, E. C.; do Amaral Junior, A. T.; Gonçalves, L. S.; Pena, G. F.; *et al.* 2010. Optimizing the efficiency of the touchdown technique for detecting inter-simple sequence repeat markers in corn (*Zea mays*). *Genetic Molecular Research*, 9, 835-842.
- Pereira, H.S.; Santos, J.B.; Abreu, A.F.B.; Couto, K.R. 2007. Informações fenotípicas e marcadores microssatélites de QTL na escolha de populações segregantes de feijoeiros. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42, 707-713.
- Persegui, J.M.K.C.; Chiorato, A.F.; Zucchi, M.I.; Colombo, C.A.; Carbonell, S.A.M.; Mondego, J.M.C.; Gazaffi, R.; Garcia, A.A.F.; Campos, T.; Souza, A.P.; Rubiano, L.B. 2011. Genetic diversity in cultivated carioca common bean based on molecular marker analysis. *Genetics and Molecular Biology*, 34 (1), 88-102.
- Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2, 225-238.
- Ragagnin, V.A.; Souza, T.L.P.O.; Sanglard, D.A.; Arruda, K.M.A.; Costa, M.R.; Alzate-Marin, A.L.; Carneiro, J.E.S.; Moreira, M.A.; Barros, E.G. 2009. Development and agronomic performance of common bean lines simultaneously resistant to anthracnose, angular leafspot and rust. *Plant Breeding*, 128 (2), 156-163.

- Rodrigues, L.S. *et al.* 2002. Divergência genética entre cultivares locais e cultivares melhoradas de feijão. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 37 (9), 1275-1284.
- Rodrigues, T.B.; Santos, J.B. 2006. Effect of natural selection on common bean (*Phaseolus vulgaris*) microsatellite alleles. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 345-352.
- Rulkens, T. 1996. Apontamentos da Disciplina de Produção Vegetal. Universidade Eduardo Mondlane. Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal.
- Schuster, I.; Vieira, S.N.V.; Hamilton, S.; Sinhorati, D.; Silva, R.B.; Oliveira, M.A.R. 2007. Fluxo genético em soja na região oeste do Paraná. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42, 515-520.
- Sicard, D.; Nanni, L.; Porfiri, O.; Bulfon, D.; Papa, R. 2005. Genetic diversity of *P. vulgaris* L. and *P. coccineus* L. landraces in Central Italy. *Plant Breeding*, 124, 464-472.
- Singh SP, Gutierrez JA, Molina A, Urrea C, Gepts P. 1991. Genetic diversity in cultivated Common bean: II. Marker-based analysis of morphological and agronomic traits. *Crop Science*, 31, 23-29.
- Smith, J.S.C.; Chin E.C.L.; Shu, H.; Smith, O.S.; Wall S.J.; Senior M.L.; Mitchell S.E.; Kresovich S.; Ziegler J. 1997. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): Comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theoretical and Applied Genetic*, 95, 163-173.
- Smith, O.S. 1986. Covariance between line per se and testcross performance. *Crop Science*, 26 (3), 540-543.
- Sousa, A.C.B.; Jungmann, L.; Campos, T.; Sforça, D.A.; Boaventura, L.R.; Silva, G.M.B.; Zucchi, M.I.; Jank, L.; Souza, A.P. 2011. Development of microsatellite markers in Guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.) and their transferability to other tropical forage grass species. *Plant Breeding*, 104-1011.
- Spooner, D. R.; Treuren e M.C. Vicente. 2005. Molecular markers for genebank management. IPGRI Technical Bulletin nr. 10.

- Stegemann, H. 1983. Discrimination among intraspecific taxa using electrophoretic data. 124-128. In: Jensen U., and Fairbrothers (Eds.). Protein and Nucleic Acids in Plant Systemic. Berlin. Srpinger-Verlag.
- Svetleva, D.; Pereira, G.; Carlier, J.; Cabrita, L.; Leitão, J.; Genchev, D. 2006. Molecular characterization of *Phaseolus vulgaris* L. genotypes included in Bulgarian collection by ISSR and AFLP analyses. *Scientia Horticulturae*, 109, 198-206.
- Tautz, D. 1989. Hipervariability of simple sequences of a general source for polymorphic ADN Markers. *Nucleic Acids Research*, 17, 6463-6471.
- Thomazella, C.; Vidigal, M.C.G.; Vidigal Filho, P.S.; Barelli, M.A.A; Silvério, L. 2002. Divergência genética entre e dentro de raças de *Colletotrichum lindemuthianum*, determinadas por marcadores RAPD. In: Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão, 7, Viçosa. Anais. Universidade Federal de Viçosa.
- Van Hintun, T.J.L. 1994. Comparison of marker system and construction of a core collection in a pedigree of European spring barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 89, 991-997.
- Vencovsky, R.; Barriga, P. 1992. Genética biométrica no fito melhoramento. *Revista Brasileira de Genética*, 4, 96.
- Vieira, E. A.; Carvalho, F. I. F.; Bertan, I.; Kopp, M. M.; *et al.* 2007. Association between genetic distances in wheat (*Triticum aestivum*) as estimated by AFLP and morphological markers. *Genetics and Molecular Biology*, 30, 392-399.
- Vieira, C.; Paula, J.T.J de; Borém, A. 1998. Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 596p.
- Williams, J.G.K.; Kulelik, A.R.; Livak, K. J.; Rafalsky, J.A.; Tigey, S.V. 1990. ADN polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.
- Yu, K.; Park, S.J.; Poysa, V.; Gepts, P. 2000 Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Heredity*, 91, 429-434.

- Yu, Z.; Zhan, X.; Han, G.; Wnag, R.W.; Anh, V.; Chu, K.H. 2010. Proper distance metrics for phylogenetic analysis using complete genomes without sequence alignment. *Molecular Sciences*, 11, 1141-1154.
- Zabeu, M; Vos, P. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for ADN fingerprinting. European Patent Application n° 0534-88 Al.
- Zhang, X.; Blair, M.W.; Wang, S. 2008. Genetic diversity of Chinese common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces assessed with simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 117, 629-640.
- Zietkiewicz, E.; Rafalski, A. And Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20 (2), 176-183.

CAPÍTULO III: AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE 43 GENÓTIPOS DE FEIJÃO VULGAR COM BASE EM MARCADORES MORFOLÓGICOS

Resumo

O objectivo deste estudo foi avaliar a relação genética de 43 genótipos de feijão vulgar (*Phaseolus vulgaris* L.) usando características morfológicas. Para o efeito, um ensaio foi conduzido usando o delineamento de blocos completos casualizados com três repetições. A avaliação da diversidade morfológica baseou-se em 4 características qualitativas (hábito de crescimento, forma da folha, curvatura da vagem e cor da semente) e 5 quantitativas (altura da planta, peso de 100 sementes, número de dias até a floração, número de vagens por planta e número de sementes por vagem). O número de dias até a floração, o peso de 100 sementes através do qual se calculou o rendimento do grão apresentaram maior herdabilidade, no sentido lato (H^2) de 99.9, 35.7 e 41.4, respectivamente, sugerindo que a selecção para estas características pode ser viável. A análise multivariada utilizada para avaliar diferenças, com base na distância euclidiana, revelou a presença de dois grupos distintos (A e B), podendo estes corresponder aos *pools* genéticos do feijão vulgar. Os genótipos do grupo A indicaram pertencer ao *pool* genético mesoamericano e os genótipos do grupo B ao andino. Cada *pool* genético foi subdividido em grupos, indicando possíveis processos de domesticação divergentes, que levaram à formação de diferentes raças em cada *pool* genético. Esta divisão dos grupos do germoplasma de feijão vulgar com parentesco genético poderá ser útil para orientar os esforços de introgressão em programas de melhoramento e para melhorar a eficiência da gestão do germoplasma para fins de reprodução e hibridação.

Palavras-Chave: *Phaseolus vulgaris* L., diversidade genética, características qualitativas e quantitativas

3.1 Introdução

Originariamente domesticado na América Central e do Sul, o feijão vulgar foi introduzido em África e noutras partes do mundo pelos espanhóis e portugueses. Actualmente é amplamente cultivado nos trópicos, subtropicais e regiões de clima temperado, com uma produção anual estimada em cerca de 23,3 milhões de toneladas em 2011 (Gepts, 1986; FAOSTAT, 2011). Entre os maiores produtores da cultura no mundo destacam-se a Índia, Myanmar e Brasil, com 4.5, 3.7 e 3.4 milhões de toneladas de grão, respectivamente e, em África, a Tanzânia, o Kenya e o Uganda, com 675, 577 e 464 mil toneladas, respectivamente (FAO, 2011).

A domesticação do feijão vulgar também resultou em dois *pools* genéticos distintos, o andino que é resultado dos eventos de domesticação que ocorreram nos Andes (Peru e Argentina) e o mesoamericano, que resultou dos eventos de domesticação que tiveram lugar no meio da América- México, América Central e Colômbia- (Gepts e Debouck, 1991; Gepts *et al.*, 1986). Para além do surgimento dos dois *pools* genéticos, a domesticação do feijão vulgar resultou, também, na diversificação e variabilidade dos caracteres morfológicos, bioquímicos e fisiológicos entre e dentro dos *pools* genéticos. Como resultado, as características morfológicas têm sido empregues no estabelecimento de relações filogenéticas entre génotipos, entre e dentro de espécies, e para vários propósitos, incluindo a identificação de duplicações, estudos de padrões de variação genética e correlação de características de importância agronómica. Marechal *et al.* (1978) usou a diversidade morfológica para estudar as relações taxonómicas entre génotipos pertencentes aos géneros *Phaseolus* e *Vigna*.

O feijão vulgar tem características distintas (tamanho da semente) em cada pool genético, sendo que no mesoamericano as sementes são pequenas a médias e no andino as sementes são grandes. As características morfológicas das plantas dividem-se em qualitativas e quantitativas, podendo ser combinadas para a identificação de potenciais parentais para o melhoramento. Ramalho *et al.* (1993), referiram que o melhoramento do feijão vulgar através da hibridação entre cultivares e linhagens possibilita a recombinação da variabilidade existente, produzindo cultivares adaptados aos mais diversos ambientes. No entanto, a escolha de génotipos promissores para parentais nos programas de melhoramento pode ser complicado devido ao grande número de génotipos disponíveis.

De acordo com Singh (2001) o conhecimento, acesso e uso da diversidade disponível do germoplasma local são essenciais para a ampliação da base genética dos programas de

melhoramento. São também essenciais para melhorar a eficiência na identificação de combinações parentais que geram populações segregantes com máxima variabilidade para a selecção (Franco *et al.*, 2001). Desta forma, usar o germoplasma implica, necessariamente, caracterizá-lo, o que, tradicionalmente, vem sendo feito por meio de descritores botânicos, agronómicos e genéticos.

O presente estudo foi realizado com o objectivo de avaliar a relação genética de 43 genótipos de feijão vulgar usando características morfológicas quantitativas e qualitativas.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Descrição do local de estudo

O estudo foi conduzido no campo de ensaios da Direcção de Ciências Animais, do Instituto de Investigação Agrária de Moçambique, localizado na cidade da Matola, Província de Maputo, entre as latitudes -25,9 e longitude 32,4. Esta área é caracterizada por um clima subtropical, com ocorrência de duas principais estações, a chuvosa, que vai de Outubro a Abril, e a seca, que vai de Maio a Setembro. Os solos são arenosos e as temperaturas médias anuais variam entre 23 a 27°C no período chuvoso e de 18 a 23°C no período seco. Encontra-se a 14 metros acima do nível médio das águas do mar, com precipitação média total anual de 746,6mm (INIA, 1995; Muchangos, 1986).

3.2.2 Material usado no estudo

No estudo foram usados 43 genótipos de feijão vulgar adquiridos no Banco de Germoplasma do IIAM. Estes genótipos eram constituídos maioritariamente por acessos locais e materiais introduzidos da África do Sul, Colômbia e Perú. A selecção das variedades e o ensaio estabelecido tiveram em conta a disponibilidade de semente. Os nomes dos genótipos são apresentados na tabela 1. A Figura 2 ilustra as características morfológicas das sementes dos genótipos estudados.

Tabela 1: Lista dos genótipos estudados

Nº	Nome do genótipo	Nº	Nome do genótipo
1	Bonus	25	VTTT-924/2-4-2-1
2	Cal 143	26	VTTT/7-6
3	Cal 148	27	Lic-04-8-4
4	Icapijão	28	MN 13451-6-9
5	Feijão branco	29	SAB 569
6	Sug 131	30	Bunita
7	CIM-RM-03-42-14	31	BF 13572-3
8	Doctor	32	FEB 196
9	Kaki	33	CIM-RM-03-42-11
10	D. Calima	34	Kiangara
11	Tio Canela	35	VTTT 918/15-4-4
12	Seq 1003	36	Selian
13	Bat 447	37	CIM-RM00-323 LN30
14	Maharagisoya	38	BF 13607-9
15	Lic-04-2-1	39	VTT 918/15-1
16	Sab 518	40	CIM-RM00-Pop-321
17	Sab 516	41	CIM-Sug-03-09-07
18	Sab 572	42	Bat 13182
19	Lic-04-7-2	43	MN 13389-6
20	Lic-04-1-3		
21	CIM-RM00-321 LN01		
22	Lic-04-2-3		
23	Lic-04-9-3		
24	VTTT-924/15-2		



Figura 2: Sementes de alguns genótipos estudados

3.2.3 Desenho experimental, descrição do ensaio e dos tratamentos e colheita de dados

O ensaio foi conduzido entre 30 de Março e 07 de Agosto de 2012. Foi utilizado o delineamento de blocos completos casualizados (DBCC), em três repetições. O arranjo dos tratamentos foi obtido através de 3 casualizações, uma em cada bloco, com vista a garantir que a fixação dos tratamentos fosse independente. Cada parcela possuía 3m², tendo como área útil por parcela 1,5m e linhas com 2m de comprimento (Anexo 1).

A preparação do terreno foi realizada com base na lavoura manual, seguida da adubação manual com o adubo mineral NPK 12-24-12 na razão 200 kg/ha. A sementeira foi directa, com auxílio de enxadas e bitolas, obedecendo um compasso de 75cmx15cm. Cada covacho recebeu 1 semente a uma profundidade de 2,5cm. Dez dias depois procedeu-se à ressementeira nos locais com falha de emergência.

O controlo de infestantes foi efectuado manualmente. O controlo de pragas foi preventivo, usando-se o pesticida *imidacloprid* obedecendo às normas técnicas para a sua aplicação. As plantas foram irrigadas por gravidade, duas vezes por semana desde a sementeira até a maturação. A colheita teve o seu início 90 dias depois da sementeira e ressementeira, sendo esta feita 1 vez por semana, manualmente. A colecta de dados foi feita na área útil, sendo

consideradas como bordaduras as linhas laterais da sub-parcela e 30cm iniciais da linha útil. Durante a condução do ensaio observaram-se temperaturas médias a baixas, não se tendo registado precipitação e humidade relativa consideráveis. As condições de precipitação observadas durante a condução do ensaio são apresentadas na figura 3.

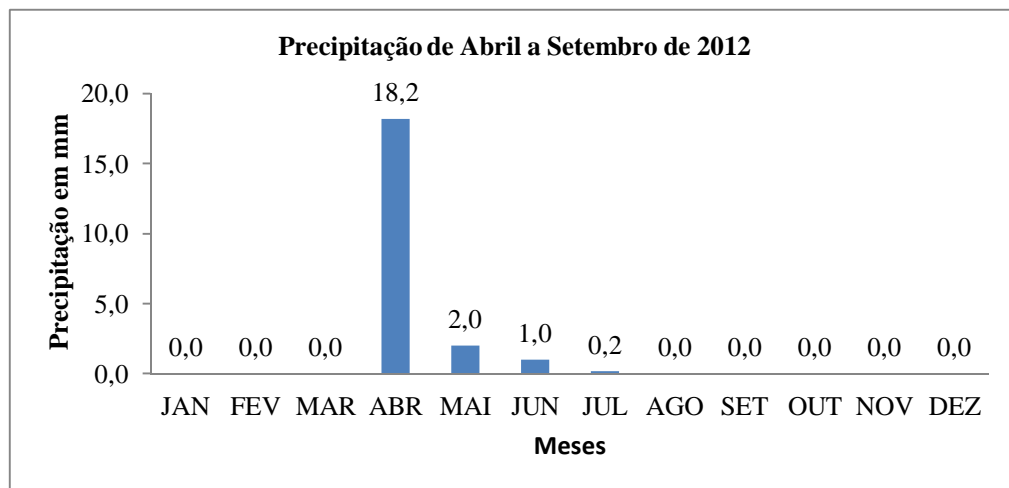


Figura 3: Precipitação registada durante o ensaio, **Fonte:** Instituto Nacional de Meteorologia, 2012. Dados não publicados

3.2.1 Avaliação dos caracteres qualitativos e quantitativos

Para a realização deste estudo foram usadas quatro características qualitativas e seis quantitativas, segundo os descritores disponíveis para a cultura de feijão (CIAT, 1991; IPGRI, 2001). As características qualitativas usadas no presente estudo foram as seguintes: hábito de crescimento, forma da folha, curvatura da vagem e cor da semente. Essas características foram avaliadas usando diferentes escalas de pontuação.

a) Hábito de crescimento.

O hábito de crescimento foi avaliado usando uma escala de 1 a 6, desenvolvido pelo IPGRI (2001), onde:

1 - determinado (com gema apical no caule principal)

2 - indeterminado (com ramificações erectas)

3 - indeterminado (com ramificações prostradas)

4 - indeterminado (com caule principal e ramificações semi-trepadeiras)

5 - indeterminado (moderadamente trepador e vagens uniformemente distribuídas ao longo da planta)

6 - indeterminado (claramente trepador, com vagens, principalmente nos nós superiores da planta)

b) Forma da folha.

A forma da folha foi avaliada através da avaliação do folíolo terminal da terceira folha trifoliada usando uma escala que varia de 1 a 3, segundo IPGRI (2001), onde:

- 1- triangular
- 2- quadrangular
- 3 - redonda

c) Curvatura da vagem.

A curvatura da vagem foi avaliada usando uma escala de 3 a 9, de acordo com IPGRI (2001) onde:

- 3 - direita
- 5 - ligeiramente curva
- 7 - curva
- 9 - duplamente curva

d) Cor da semente.

A cor da semente foi avaliada usando uma escala de 1 a 10, de acordo com a escala de CIAT (1991) onde:

- 1 - creme raiado
- 2 - encarnado raiado
- 3 - castanho
- 4 - branco
- 5 - preto
- 6 - encarnado
- 7 - creme/kaki
- 8 - branco com hilo preto
- 9 - castanho raiado
- 10 ó creme

As características quantitativas usadas no presente estudo foram as seguintes: altura da planta, peso de 100 sementes, número de dias até a floração, número de vagens por planta, número de sementes por vagem e rendimento do grão.

a) Altura da planta

A altura das plantas em centímetros foi medida em 5 plantas ao acaso em cada parcela, desde a cicatriz cotiledonar até à extremidade da planta (botão floral), à época de maturação, (n= 5 plantas).

b) Peso de 100 sementes

O peso de 100 sementes foi obtido pesando 100 sementes seleccionadas aleatoriamente da área útil de cada sub-parcela, à humidade de 12%.

c) Número de dias até à floração

O número de dias desde a emergência até ao estágio em que 50% das plantas estão em floração.

d) Número de vagens por planta

O número de vagens por planta obteve-se a partir da contagem realizada na colheita, em 10 plantas seleccionadas aleatoriamente.

e) Número de sementes por vagem

O número de sementes por vagem foi contado em 10 vagens seleccionadas aleatoriamente.

f) Rendimento

O rendimento expresso em kg ha^{-1} de cada parcela foi obtido pela razão entre o peso total da semente do tratamento e o respectivo número de plantas desse tratamento.

3.2.3 Análise de dados

Os dados foram analisados usando o pacote estatístico *GenStat Discovery 4.0*. Procedeu-se à análise de variância. Para além da ANOVA foi também feita a análise da correlação entre as variáveis. As variâncias genotípica (σ_g^2), ambiental (σ_e^2) e fenotípica (σ_p^2) foram calculadas segundo a fórmula: $\sigma_p^2 = \sigma_g^2 + \sigma_e^2$. A herdabilidade foi calculada com base nas variâncias fenotípica, ambiental e genotípica. Através da análise multivariada procedeu-se ao agrupamento dos genótipos pelo método hierárquico baseado na distância euclidiana, para a obtenção dos dendogramas dos caracteres qualitativos e quantitativos.

3.3 Resultados

3.3.1 Análise de variância, correlação, herdabilidade e desempenho de 43 genótipos estudados em relação às variáveis quantitativas.

Os resultados da análise de variância das variáveis altura da planta, número de dias até à

floração, número de sementes por vagem, peso de 100 sementes e rendimento de grão são apresentados na tabela 2. Da tabela 2 pode-se ver que houve efeitos significativos do factor genótipos nas variáveis número de dias até à floração, peso de 100 sementes e rendimento do grão. Não houve efeitos significativos dos genótipos na altura da planta, número de sementes por vagem e número de vagens por planta. Os coeficientes da variação foram baixos a moderadamente altos, com o número de vagens por planta, peso de 100 sementes e rendimento de grão a apresentarem coeficientes de variação moderadamente elevados.

Tabela 2: resumo do efeito dos blocos e genótipos nas variáveis estudadas: altura da planda (AltP), número de dias até à floração (NDF), número de sementes por vagem (NSV), número de vagem por planta (NVP), peso de 100 sementes (P100S) e rendimento do grão (Rend) de 43 genótipos de feijão vulgar

Fontes de variação	GL	Quadrados médios					
		AltP	NDF	NSV	NVP	P100S	Rend
Blocos	2	11,645	3,093	5,2778	14,670	1112,1	208197.
Genótipos	42	5,507 ^{ns}	264,585*	0,5337 ^{ns}	0,972 ^{ns}	300,7*	50222.*
Resíduo	84	4,830	1,426	0,4478	1,200	193,3	29800.
Média geral		12,16	66,26	4,199	3,422	36,8	476.
CV (%)		18,1	1,8	15,9	32,0	37,8	36,2

Nota: *=Significativo ao nível de significância de 5%, pelo teste F; ns=não significativo

A análise de correlação fenotípica entre as variáveis número de dias até a floração, rendimento e componentes de rendimento (número de vagens por planta, número de sementes por vagem e peso de 100 sementes) mostrou que houve apenas correlação forte positiva e significativa ($r=0,9931$; $p < 0,001$) entre o peso de 100 sementes e o rendimento do grão (Tabela 3).

Tabela 3: coeficientes de correlação fenotípica entre as variáveis número de dias até a floração, número de sementes por vagem, número de vagens por planta, peso de 100 sementes e rendimento do grão

	NDF	NSV	NVP	P100S	Rend
NDF					
NSV	0,0080 ^{ns}				
NVP	0,0473 ^{ns}	-0,2365**			
P100S	-0,1755*	-0,2069*	0,0185 ^{ns}		
Rend	-0,1797*	-0,2267**	0,0200 ^{ns}	0,9931**	

Nota: ** = Significativo a 1% de probabilidade; * = Significativo a 5% de probabilidade; ns = Não significativo

Legenda: NDF-número de dias até floração, NSV-número de sementes por vagem, NVP-número de vagens por planta, P100S.peso de 100 sementes, Rend-rendimento.

A herdabilidade no sentido lato (H^2) de seis variáveis quantitativas é apresentada na tabela 4. Os valores variaram entre 12 e 99%. O número de dias até a floração apresentou a maior herdabilidade com 99.9%, seguido do rendimento e peso de 100 sementes com 41.4 e 35,7%, respectivamente, enquanto o número de sementes por vagem e altura tiveram os coeficientes mais baixos com 16 e 12%, respectivamente.

Tabela 4: herdabilidade no sentido lato (H^2) das variáveis estudadas: altura da planta (AltP), número de dias até a floração (NDF), número de sementes por vagem (NSV), número de vagens por planta (NVP), peso de 100 sementes (P100S) e rendimento do grão de 43 genótipos de feijão vulgar

Caracteres	V _f	V _g	V _e	H ²	Média	Min	Max
AltP	5,056	0,226	4,83	12,30%	7,1	16,2	19
NDF	24,036954	24,035234	0,00172	99.9%	64.81	52	80
NSV	0,4766	0,0286	0,448	16%	4,19	2,2	6,4
NVP	1199,924	-0,076	1200	-23,40%	3,42	1,4	6,9
P100S	229,1	35,8	193,3	35,70%	36,8	15,4	91,7
Rendto	36607	6807	29800	41,40%	476,3	200	1192

Como mostrado pelos resultados da análise de variância, os genótipos testados tiveram diferenças significativas em relação ao número de dias até a floração, peso de 100 sementes e rendimento de grão (Tabela 2). O número de dias até a floração variou entre 52 e 80 . Os genótipos CIM-RM-03-42-14, Seq 1003, Bat 447 floriram mais cedo (52 dias) em relação ao genótipo Icapijão, que floresceu aos 85 dias (Tabela 5). O peso de 100 sementes variou entre 20,13 e 62,03gramas, sendo que o genótipo BF 13607-9 teve o peso de sementes mais baixo (20,13 g), enquanto o Feijão branco teve o peso de sementes mais alto (62,03 g). Em relação ao rendimento, este também variou entre 261,7 e 806,4kg/ha tendo o genótipo Feijão branco obtido maior rendimento, com 806,4kg/ha enquanto o genótipo BF 13607-9 teve menor rendimento, com 261,7kg/ha (figura 4).

Tabela 5: número de dias até a floração (NDF) e peso de 100 sementes (P100S) de 43 genótipos de feijão vulgar

Nº de ordem	Genótipos	NDF	P100S (g)
1	Bonus	80	36,03
2	Cal 143	74	33,30
3	Cal 148	80	27,00
4	Icapijão	85	23,20
5	Feijão branco	60	62,03
6	Sug 131	65	33,20
7	CIM-RM-03-42-14	52	52,07
8	Doctor	80	22,03
9	Kaki	55	51,60
10	D. Calima	84	35,70
11	Tio Canela	67	39,40
12	Seq 1003	52	34,47
13	Bat 447	52	45,47
14	Maharagisoya	60	31,50
15	Lic-04-2-1	65	37,27
16	Sab 518	60	43,70
17	Sab 516	65	45,83
18	Sab 572	60	29,00
19	Lic-04-7-2	60	48,03
20	Lic-04-1-3	60	42,47
21	CIM-RM00-321 LN01	60	38,83
22	Lic-04-2-3	80	38,70
23	Lic-04-9-3	65	22,40
24	VTTT-924/15-2	60	52,77
25	VTTT-924/2-4-2-1	70	49,90
26	VTTT/7-6	80	36,83
27	Lic-04-8-4	74	34,77
28	MN 13451-6-9	74	26,70
29	SAB 569	74	25,87
30	Bunita	60	27,23
31	BF 13572-3	67	33,80
32	FEB 196	74	35,37
33	CIM-RM-03-42-11	60	40,70
34	Kiangara	67	44,07
35	VTTT 918/15-4-4	74	50,83
36	Selian	60	27,10
37	CIM-RM00-323 LN30	60	22,93
38	BF 13607-9	74	20,13
39	VTT 918/15-1	60	39,33
40	CIM-RM00-Pop-321	60	36,93
41	CIM-Sug-03-09-07	60	48,10
42	Bat 13182	60	32,17
43	MN 13389-6	55	23,53

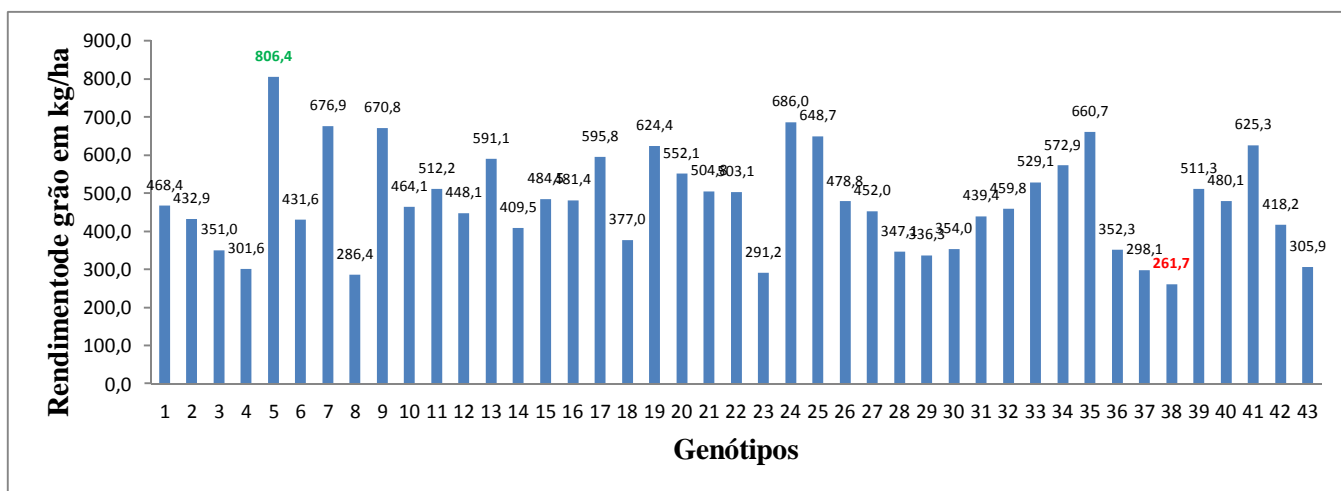


Figura 4: Rendimento do grão dos 43 genótipos estudados

3.3.2 Agrupamento dos 43 genótipos com base em características quantitativas (cluster analysis)

Com base nas características quantitativas (altura da planta, número de dias até a floração, número de vagens por planta, número de sementes por vagem, peso de 100 sementes e rendimento) obteve-se o dendograma que mostra as distâncias genéticas entre os genótipos (figura 5). Com base nessas distâncias fez-se a divisão dos 43 genótipos em 2 grupos principais (A e B) que tiveram uma distância de 0,68. Cada grupo, por sua vez, foi subdividido em dois sub-agrupamentos, I e II, (Tabela 5). O grupo A consistiu em 20 genótipos, dos quais 8 foram do sub-grupo I, nomeadamente Bónus, D. Calima, Doctor, Cal 148, Icapijão, Cal 143, Sug 131 e Tio Canelae 12 do sub-grupo II, nomeadamente Seq 1003, Sab 572, Bunita, SAB 569, CIM-RM00-323 LN30, Lic-04-9-3, CIM-RM00-Pop-321, Bat 13182, MN 13389-6, MN 13451-6-9, BF 13607-9 e Selian. O grupo B, consistiu em 23 genótipos, dos quais 6 foram do sub-grupo I, nomeadamente Feijão branco, CIM-RM-03-42-14, Kaki, VTTT-924/15-2, Sab 516 e Lic-04-7-2 e 17 do sub-grupo II, nomeadamente Bat 447, Lic-04-1-3, Maharagisoya, Lic-04-2-1, Sab 518, CIM-RM00-321 LN01, CIM-RM-03-42-11, CIM-RM-03-42-11, VTT 918/15-1, CIM-Sug-03-09-07, Lic-04-2-3, Lic-04-8-4, VTTT-924/2-4-2-1, Kiangara, VTTT 918/15-4-4, VTTT/7-6, FEB 196 e BF 13572-3.

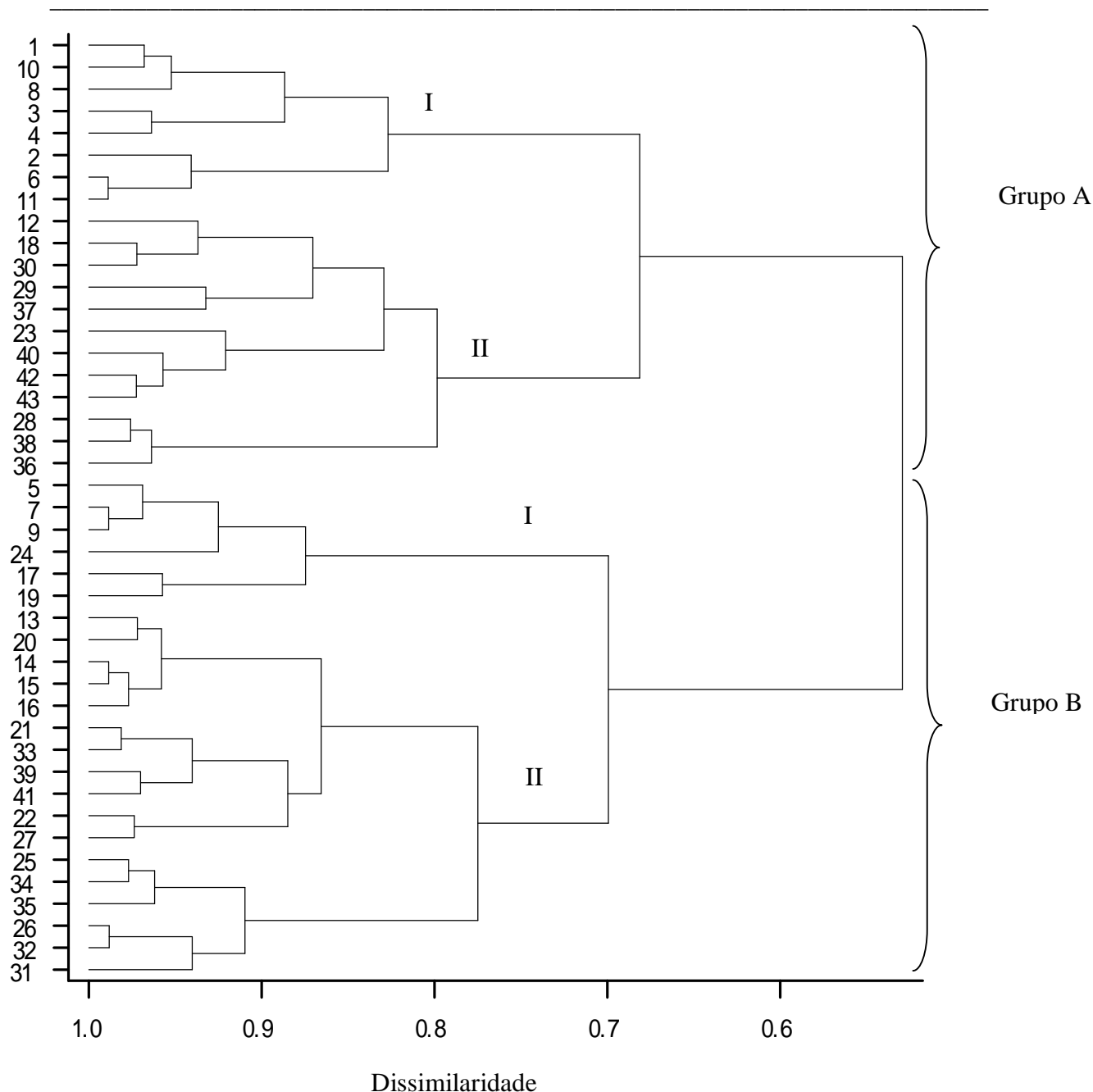


Figura 5: Dendrograma dos genótipos estudados com base em 6 caracteres quantitativos

3.3.3 Análise das médias, correlação e hereditariedade das variáveis qualitativas (hábito de crescimento, forma do folíolo, curvatura da vagem e cor da semente) de 43 genótipos

O resultado da análise das médias das observações obtidas dos quatro caracteres qualitativos (hábito de crescimento, forma do folíolo, curvatura da vagem e cor da semente) é apresentado na tabela 6. Dos genótipos estudados, apenas 5 tiveram crescimento indeterminado. São esses os genótipos Bonus, Lic-04-1-3, Feb 196, Bat 13182 e CIM-RM00-323 LN30. Em relação à cor da semente foram identificados 9 grupos, a saber, creme raiado constituído por 7 genótipos,

nomeadamente Sug131, Lic-04-2-1, Lic-04-2-3, Lic-04-9-3, VTT-924/2-4-2-1, VTTT/7-6 e BF 13572-3, encarnado raiado, constituído por 6 genótipos, nomeadamente Cal 143, Calima, Tio canela, CIM-RM00-321LN01, VTT918/15-1e CIM-RM00-Pop-321, castanho, constituído por 5 genótipos, nomeadamente Cal 148, Lic-04-7-2, Lic-04-8-4, MN 13451-6-9, CIM-RM-03-42-11, branco, constituído por 2 genótipos, Feijão branco e Kiangara, preto, constituído por 3 genótipos, Icapijão, FEB 196 e Bat 13182 ,encarnado, constituído por 8 genótipos, Bat 447, Maharagisoya, Sab 516, Sab 569, VTTT 918/15-4-4, BF 13607-9, CIM-Sug-03-09-07 e MN 13389-6, creme/kaki, constituído por 5 grnótipos, CIM-RM-03-42-14, Kaki, Sab 572, Bunita e CIM-RM00-323LN30, branco com hilo preto, constituído por 1 genótipo, Doctor e castanho raiado, constituído por 3 genótipos, nomeadamente, Sab 518, Lic-04-1-3 e VTT-924/15-2. Em relação aos caracteres forma do folíolo e curvatura da vagem, não se observaram diferenças em nenhum dos genótipos.

Tabela 6: hábito de crescimento (HCr), cor da semente (CorS), forma da folha (FF) e curvatura da vagem (CurV) de 43 genótipo de feijão vulgar

Nº de ordem	Genótipos	HCr	CorS	FF	
				FF	CurV
1	Bonus	4	1	1	3
2	Cal 143	1	2	1	3
3	Cal 148	1	3	1	3
4	Icapijão	1	5	1	3
5	Feijão branco	1	4	1	3
6	Sug 131	1	1	1	3
7	CIM-RM-03-42-14	1	7	1	3
8	Doctor	1	8	1	3
9	Kaki	1	7	1	3
10	D. Calima	1	2	1	3
11	Tio Canela	1	2	1	3
12	Seq 1003	1	10	1	3
13	Bat 447	1	6	1	3
14	Maharagisoya	1	6	1	3
15	Lic-04-2-1	1	1	1	3
16	Sab 518	1	9	1	3
17	Sab 516	1	6	1	3
18	Sab 572	1	7	1	3
19	Lic-04-7-2	1	3	1	3
20	Lic-04-1-3	4	9	1	3
21	CIM-RM00-321 LN01	1	2	1	3
22	Lic-04-2-3	1	1	1	3
23	Lic-04-9-3	1	1	1	3
24	VTTT-924/15-2	1	9	1	3
25	VTTT-924/2-4-2-1	1	1	1	3
26	VTTT/7-6	1	1	1	3
27	Lic-04-8-4	1	3	1	3
28	MN 13451-6-9	1	3	1	3
29	SAB 569	1	6	1	3
30	Bunita	1	7	1	3
31	BF 13572-3	1	1	1	3
32	FEB 196	4	5	1	3
33	CIM-RM-03-42-11	1	3	1	3
34	Kiangara	1	4	1	3
35	VTTT 918/15-4-4	1	6	1	3
36	Selian	1	3	1	3
37	CIM-RM00-323 LN30	4	7	1	3
38	BF 13607-9	1	6	1	3
39	VTT 918/15-1	1	2	1	3
40	CIM-RM00-Pop-321	1	2	1	3
41	CIM-Sug-03-09-07	1	6	1	3
42	Bat 13182	4	5	1	3
43	MN 13389-6	1	6	1	3

A análise de correlação fenotípica entre as variáveis hábito de crescimento, forma do folíolo, curvatura da vagem e cor da semente mostrou não haver correlação entre as variáveis estudadas (tabela 7).

Tabela 7: coeficientes de correlação fenotípica entre os caracteres altura da planta (AltP), cor da semente (CorS), curvatura da vagem (CurV), forma do folíolo (FF) e hábito de crescimento (HCr).

	CorS	CurV	FF	HCr
CorS	0,0151 ^{ns}			
CurV	0,0000 ^{ns}	0,0000 ^{ns}		
FF	0,0000 ^{ns}	0,0000 ^{ns}	0,0000 ^{ns}	
HCr	0,0889 ^{ns}	0,2542**	0,0000 ^{ns}	0,0000 ^{ns}

H₀ = Coeficientes de correlação diferentes de zero

** = Significativo a 1% de probabilidade de erro

* = Significativo a 5% de probabilidade de erro

^{ns} = Não significativo

A herdabilidade no sentido lato (H^2) das quatro variáveis qualitativas esteve em torno de 99% (tabela 8) para ambos caracteres cor da semente e curvatura da vagem.

Tabela 8. Variância fenotípica, genotípica, ambiental e herdabilidades das variáveis cor da semente (CorS), curvatura da vagem (CurV), forma do folíolo (FF) e hábito de crescimento (HCr) de 43 genótipos de feijão vulgar

Caracteres	p	g	e	H²	Média	Min	Max
CorS	2,3991551	2,3989831	0,000172	99,9%	4,39	1	10
CurV	-	-	-	-	3	3	3
FF	-	-	-	-	1	1	1
HCr	0,28792432	0,28792226	0,00000206	99,9%	1,09	1	4

3.3.4 Agrupamento dos 43 genótipos com base em características qualitativas (cluster analysis)

Com base nas características qualitativas (cor da semente, curvatura da vagem, forma do folíolo e hábito de crescimento) obteve-se o dendograma que mostra as distâncias genéticas entre os genótipos (figura 6). Com base nessas distâncias fez-se a divisão dos 43 genótipos em 2 grupos principais (A e B) a distância de 0,75. O agrupamento A não teve sub-agrupamentos e consistiu em 5 genótipos (Bonus, Lic-04-1-3, FEB 196, CIM-RM00-323 LN30, Bat 13182) e o B teve dois sub-agrupamentos, I e II, (Tabela 10). O agrupamento B, sub-agrupamento I consistiu em 18 genótipos (Cal 143, Cal 148, Icapijão, Feijão branco, Sug 131, CIM-RM-03-42-14, Doctor,

Kaki, D. Calima, Tio Canela, Seq 1003, Bat 447, Maharagisoja, Lic-04-2-1, Sab 518, Sab 516, Sab 572, VTTT-924/15-2) e o sub-agrupamento II consistiu em 20 genótipos (Lic-04-7-2, CIM-RM00-321 LN01, Lic-04-2-3, Lic-04-9-3, VTTT-924/2-4-2-1, VTTT/7-6, Lic-04-8-4, MN 13451-6-9, SAB 569, Bunita, BF 13572-3, CIM-RM-03-42-11, Kiangara, VTTT 918/15-4-4, Selian, BF 13607-9, VTT 918/15-1, CIM-RM00-Pop-321, CIM-Sug-03-09-07, MN 13389-6). Os genótipos agrupados entre si apresentam maior semelhança em relação aos caracteres estudados.

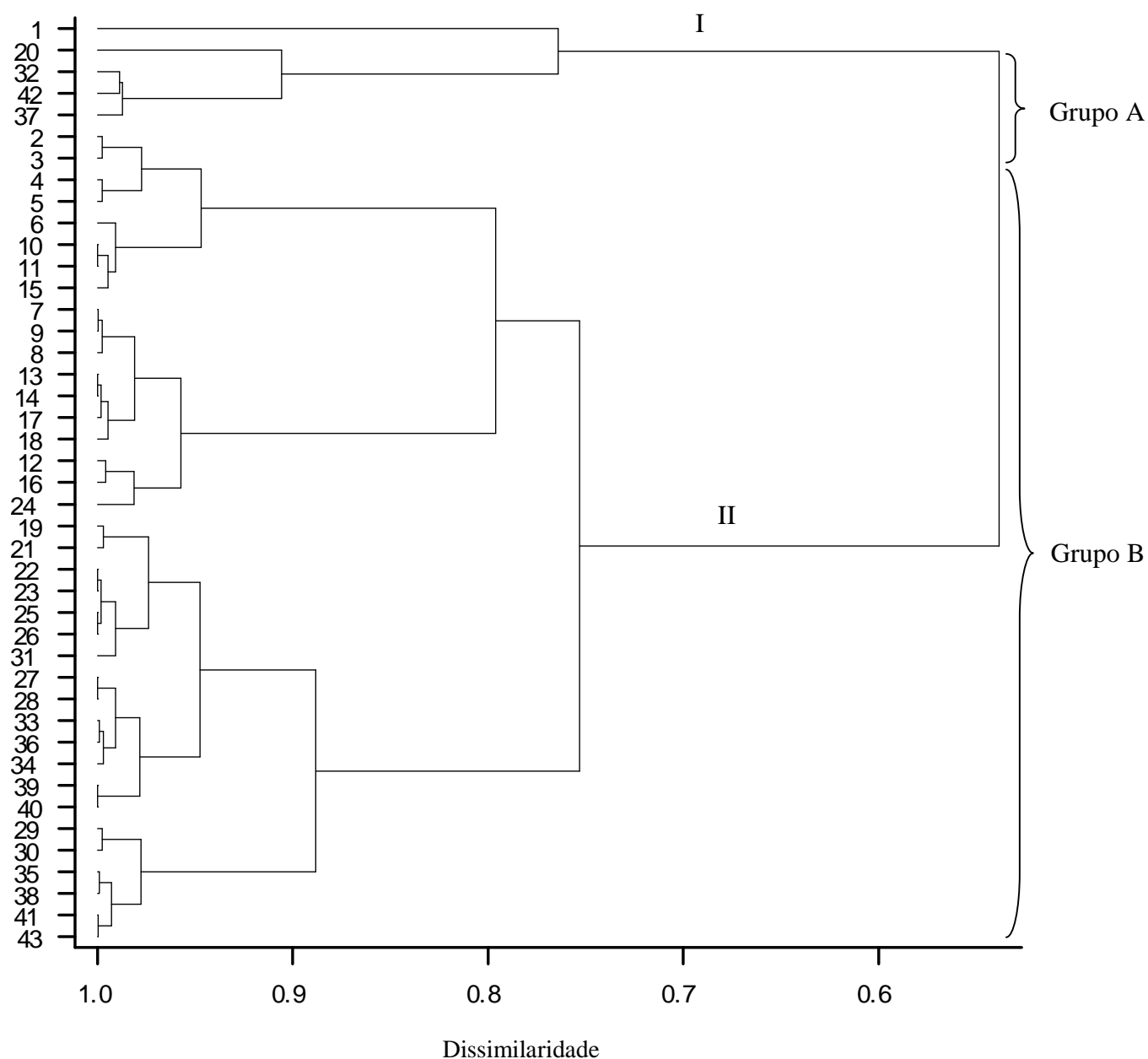


Figura 6. Dendrograma dos genótipos estudados com base em 4 caracteres qualitativos

3.4 Discussão

A diversidade genética do feijão vulgar tem sido estudada usando várias características morfológicas como ciclo vegetativo, ciclo total, estatura da planta, altura de inserção da primeira vagem, número de vagens por planta, número de sementes por vagem, produtividade, altura média das plantas, número de dias até a floração, número de sementes por vagem, número de dias até à colheita, hábito de crescimento, tamanho do botão floral, cor da semente, forma da folha, forma da semente. Nesses estudos, tanto as características qualitativas como as quantitativas mostraram-se relevantes para a avaliação da diversidade porque permitiram uma diferenciação dos genótipos e os dois tipos de caracteres mostraram alguma consistência na diferenciação dos genótipos.

Neste estudo ambas características diferenciaram os genótipos em 2 grupos que correspondem aos 2 *pools* genéticos do feijão vulgar, nomeadamente o andino e o mesoamericano e, em dois grupos distintos dentro dos *pools* genéticos que podem corresponder às raças do feijão dentro desses *pools* genéticos. De uma forma geral, estes caracteres mostraram uma grande importância na distinção da variabilidade genética entre os genótipos e podem conduzir a uma melhor classificação dos genótipos (Szilagyi, 2011; Stahelin *et al.*, 2010; Bonett *et al.*, 2006; Chiorato, 2007; Escribano *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1991; Singh, 1988).

A análise do agrupamento substanciou a existência de diversidade entre os 43 genótipos para parte dos caracteres morfológicos estudados. O padrão de agrupamento mostrou que, com base no número de dias até a floração e o número de sementes por vagem, no hábito de crescimento e cor da semente, os genótipos são distantes entre si, assim como entre os grupos. O tamanho da semente é a característica morfológica primária que facilita a discriminação entre os *pools* genéticos, entretanto, diferenças podem ser observadas para o tamanho da folha, tamanho da bractéola, cor da flor, comprimento do entre nó, posição de inserção da vagem (Singh *et al.*, 1991), e adaptação climática (Debouck *et al.*, 1993).

Pelas características das sementes, os genótipos do grupo A, com sementes pequenas a médias (25 a 40g por 100 sementes), indicam a possibilidade de pertencer ao *pool* genético mesoamericano e os do grupo B, com sementes médias a grandes (> 40g por 100 sementes) ao grupo andino. A selecção natural sofrida pela espécie implicou o aparecimento de raças eco geográficas em cada um dos dois grupos genéticos (Singh *et al.*, 1991; Beebe *et al.*, 2000; Díaz e Blair, 2006), facto que pode ter contribuído para a subdivisão dos grupos formados em cada *pool*

genético deste estudo. No que toca à gestão do germoplasma este facto é de grande relevância, visto que genótipos de diferentes *pools* genéticos diferem em muitos caracteres agro-ecológicos importantes, incluindo a resistência às pragas e doenças, hábito de crescimento, potencial de rendimento, sensibilidade ao fotoperíodo, atlas temperaturas e humidade (Singh *et al.*, 1988). Com isto, pode assumir-se que diferentes genótipos podem ser desenvolvidos para zonas agro-ecológicas específicas fazendo uso do potencial do germoplasma disponível.

Os quadrados médios evidenciaram diferença significativa para as características número de dias até a floração, peso de 100 sementes e rendimento a nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Este facto aponta para uma variabilidade morfológica entre os genótipos estudados, facto que facilita a caracterização dos mesmos. Estes resultados sugerem que, de entre os caracteres escolhidos para a caracterização dos genótipos, os componentes de rendimento foram os notórios para a identificação de uma possível divergência genética entre estes. Os coeficientes da variação experimental mostraram níveis satisfatórios, conferindo boa precisão às estimativas do ensaio.

A existência de correlações significativas entre o peso de 100 sementes e o rendimento, bem como o hábito de crescimento e a cor da semente, evidenciam que estes componentes podem estar directa, ou indirectamente, influenciando o comportamento dos genótipos. Segundo Falconer e Mackay (1996), a análise da correlação fenotípica expressa a proporções pelas quais dois caracteres são influenciados pelos mesmos genes, entre outras, permitindo aos melhoradores conhecer as modificações que ocorrem em um determinado carácter em função da selecção praticada noutro correlacionado a ele. Para Coimbra *et al.*, (1999) a correlação fenotípica mede o grau de associação de dois caracteres provenientes do efeito do ambiente e genético, sendo este último efeito o responsável pela fracção herdável dos genitores para as progénies.

A herdabilidade das variáveis número de dias até a floração, cor da semente e hábito de crescimento foram superiores a 80%. Resultados similares também foram encontrados em estudos de parâmetros genéticos em cultivares de feijão obtidos por Peternelli *et al.*, 1994; Lana, 1996; Ferrão, 1997; Coelho *et al.*, 2002. Os caracteres altura da planta, número de vagem por planta, número de sementes por vagem, peso de 100 sementes e rendimento apresentaram estimativas de herdabilidade inferiores a 50%, mostrando, claramente, que são caracteres extremamente influenciados pelo ambiente. De acordo com Ramalho *et al.*, (1993), herdabilidades com elevada magnitude tornam a selecção viável para a identificação de genótipos superiores.

3.5 Conclusões e Recomendações

Uma série de observações foram feitas para a análise da diversidade genética do feijão vulgar baseando-se em caracteres quantitativos e qualitativos. Constatou-se um nível considerável de dissimilaridade entre os genótipos observados para os caracteres relacionados com o número de dias até a floração, hábito de crescimento e peso de 100 sementes. Este facto indica possibilidade de melhoramento genético da cultura através da selecção e cruzamento genético. Este estudo também revelou que alguns caracteres morfológicos (quantitativos e qualitativos) discriminaram com eficiência os genótipos. Este facto é de grande importância, na medida em que poder-se-à identificar os caracteres morfológicos correctos (os com alta capacidade de discriminação) antes de se conduzir estudos de diversidade genética baseada em marcadores morfológicos. Ao se decidir usar os marcadores morfológicos para estudos de diversidade genética, deve-se acautelar que estes são influenciados pelo ambiente e a selecção dos mesmos deve ser criteriosa.

Referências bibliográficas

- Beebe, S.; Skroch, P.W.; Tohme, J.; Duque, M.C.; Pedraza, F.; Nienhuis J. 2000. Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. *Crop Science*, 40, 2646-273.
- Bonnet, E.; Van de Peer, Y; Rouze, P. 2006. The small RNA world in plants. *New Phytologist*. 171, 451-468.
- Chiorato, A.F.; Carbonell, S.A.M.; Benchimol, L.L.; Chiavegato, M.B.; Dias, L.A.S; Colombo, C.A. 2007. Genetic diversity in common bean accessions evaluated by means of morpho-agronomical and RAPD data. *Scientia Agricola*, 64 (3), 256-262.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de fríjol. 2 ed. Cali, 56p.
- Coelho, A.S.G.; Boo, D. 2002. Avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variado de marcadores (software). Goiânia: UFG, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Vegetal, 2002.

- Coimbra, J.L.M.; Carvalho, F. I.F. 1999. Divergência genética em linhagens de feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.) preditas através de variáveis quantitativas. *Revista Científica Rural*, Bagé, 4 (1), 47-53.
- Debouck, D. G.; Toro, O.; Paredes, O. M.; Johnson, W. C.; Gepts, P. 1993 Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* in northwestern South America. *Econ. Bot.* 47, 408-423.
- Díaz LM, Blair MW. 2006. Race structure within the Mesoamerican gene pool of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as determined by microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 114, 143 ó 154.
- Escribano, M.R.; Santalla, P.A.M.; Casquero, A.M. Ron; de Ron, A.M. 1998: Patterns of genetic diversity in landraces of commonbean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Galicia. *Plant Breeding* 117, 49-56.
- Falconer, D.S.; Mackay, T.F.C. 1996. Introduction to quantitative genetics. 4thed. New York: Longman, 464p.
- FAOSTAT. 2011. Disponível em <http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD>. Acesso em 06/05/2012.
- Ferrão, M. A. G. 1997. Tolerância do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) ao frio: análise dialéctica genética e correlação entre caracteres. Tese (Doutoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 123 p.
- Franco, M.C. *et al.* 2001. Caracterização da diversidade genética em feijão por meio de marcadores RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 36(2), 381-385.
- Gepts, P.; Bliss, F.A. 1986. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. *Economy Botanic*, 40, 469-478.
- Gepts, P.; Debouck, D.G. 1991. Origin, domestication, and evolution of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. In: Voysest O, Van Schoonhoven A (eds.), *Common beans: research for crop improvement*. CAB, Oxon, UK: pp. 7-53.

- Gepts, P.; Osborn, T.C.; Rashka, K.; Bliss, F.A. 1986. Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. *Econ Bot* 40: 451-468
- Gomes, C.N. *et al.* 2007. Caracterização morfoagronômica e coeficientes de trilha de caracteres componentes da produção em mandioca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 42, (8), 1121-1130.
- INIA. 1995. Legenda da carta nacional de solos de Moçambique, escala 1000000. INIA. Maputo
- IPGRI. 2001. Descritores para *Phaseolus vulgaris* L. Rome: International Plant Genetic Resources Institute. 45p.
- Lana, A.M.Q. 1996. Avaliação de linhagens de feijão obtidas pelo método de melhoramento single seed descent (ssd) nos sistemas de plantio em monocultivo e consórcio com o milho. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa Viçosa - MG. 1996. 125p.
- Marechal, R.; Mascherpa, J. M; Stainier, F. 1978. Étude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces de genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. *Boissiera*, 28, 1273.
- Muchangos, A. 1986. Meio ambiente a cidade de Maputo. Tipografia Globo. Maputo.
- Peternelli, L.A.; Cardoso, A.A.; Cruz, C.D.; et al. 1994. Herdabilidades e correlações do rendimento do feijão e seus componentes primários no monocultivo e no consórcio. *Revista Ceres*, Viçosa, 41 (235), 306-316.
- Ramalho, M.A.P., Santos, J.B. dos and Zimmerman, M.J. de O. 1993. Genética Quantitativa em Plantas Autógamas. Aplicações ao Melhoramento do Feijoeiro. Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- Singh, S. P. 2001. Broadening the genetic base of common bean cultivars: A review. *Crop Science*, 41(6), 1659-1675.
- Singh, S.P. 1988. Gene pools in cultivated dry bean. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 31, 180-182.

- Singh, S.P.; Gutiérrez, J.A.; Molina, A.; Urrea, C.; Gepts, P. 1991. Genetic diversity in cultivated common beans: II. Markers based analysis of morphological and agronomic traits. Madison. *Crop Science*, 31, 23-29.
- Stahelin, D.; Guidolin, A. F.; Coimbra, J. F. M.; Verissimo, M. A. A.; Morais, P. P. P.; Rocha, F. da. 2010. Pré-melhoramento em feijão: perspectivas e utilização de germoplasma local no programa de melhoramento da UDESC. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, Lages, 9 (2) 150-159.
- Szilagyi, L.; Taygar, S.; Ciuca, M. 2011. Evaluation of genetic diversity in common bean (*P. vulgaris* L) using RAPD markers and morpho-agronomic traits. *Rom. Biotechnol. Lett.* 16(1), 98-105.

CAPÍTULO IV. AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE 43 GENÓTIPOS DE FEIJÃO VULGAR COM BASE EM MARCADORES MICROSSATÉLITES

Resumo

O presente trabalho foi desenvolvido com o objectivo de avaliar a relação genética entre os genótipos de feijão vulgar (*Phaseolus vulgaris* L.) usando marcadores moleculares SSR. O ADN dos genótipos foi extraído em folhas jovens e sãs, de acordo com o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987), com algumas modificações. O ADN foi amplificado e os seus produtos corridos em gel de policrilamida de 30%, corados em Sybr green. Os SSRs empregues para a obtenção da diversidade genética dos genótipos estudados foram pouco informativos e não foram capazes de gerar o polimorfismo adequado do ADN para a distinção dos genótipos. Estudos aprofundados usando marcadores moleculares mais específicos (como outros tipos de microssatélites e SNPs) são recomendados para fornecer mais informação sobre a diversidade genética e genes específicos responsáveis por características particulares de interesse agronómico. O conhecimento de tais genes irá melhorar a necessidade de melhoramento da cultura através da selecção assistida por marcadores.

Palavras- Chave: *Phaseolus vulgaris* L., diversidade genética, SSR, ADN, genótipos

4.1 Introdução

Tradicionalmente, a diversidade genética é avaliada usando caracteres morfológicos como cor da flor, hábito de crescimento ou caracteres agronômicos quantitativos como potencial de rendimento, tolerância ao *stress*, entre outros, que são de interesse directo para os usuários. Esta abordagem tem a vantagem de ser barata e, por conseguinte, acessível para a maior parte dos programas de pesquisa. Contudo, tem a desvantagem de disponibilizar informação genética limitada quando se trata de caracteres quantitativos cuja expressão é fortemente influenciada pelo ambiente.

As técnicas baseadas em ADN permitem identificar polimorfismos representados por diferentes sequências de ADN. Por essa razão, o seu uso pode complementar as abordagens tradicionais de avaliação da diversidade genética, dada a sua capacidade de analisar variações apenas a nível do ADN, excluindo a influência ambiental. Estas têm, ainda, a vantagem de poder ser feitas em qualquer fase de crescimento da planta, usando qualquer parte da planta e requerem pouca quantidade de material (Adesoye e Ojobo, 2012).

Dentre as técnicas baseadas em ADN, os marcadores moleculares, têm sido amplamente usados. Dentre os marcadores moleculares, os microssatélites ou SSRs têm merecido especial atenção na análise de diversidade genética em muitas espécies de plantas incluindo o trigo, cevada e milho (Santalha *et al.*, 2010). Estes marcadores são co-dominantes, multialélicos e encontram-se amplamente distribuídos em todo o genoma, para além de serem altamente polimórficos (Chin *et al.*, 1996). Os microssatélites têm sido usados, também, no mapeamento genético (Grisi *et al.*, 2007), selecção baseada em marcadores (Ender *et al.*, 2008) e na avaliação espacial e temporal do fluxo de genes dentro e entre populações (Papa e Gepts, 2003). Estes marcadores têm provado ser uma excelente ferramenta para a avaliação da distância genética entre indivíduos, para a identificação de cultivares e para análises de linhas genealógicas, *pedigree*, (Priolli *et al.*, 2002).

Santalla *et al.* (2010) usou sequência de repetições simples (SSRs) para elucidar como a adaptação a condições ambientais tem influenciado o genoma de feijão vulgar no sul da Europa. Além disso, estes marcadores moleculares têm sido utilizados para avaliar a diversidade genética de variedades de feijão vulgar da Europa (Métais *et al.*, 2002; Masi *et al.*, 2003), as populações selvagens do México (Payró de la Cruz *et al.*, 2005) e genótipos de feijão da Itália (Marotti *et al.*, 2007), Bulgária (Svetleva *et al.*, 2006), Nicarágua (Gomez *et al.*, 2004), Eslovénia (Maras *et al.*, 2006) e África Oriental (Asfaw *et al.*, 2009). Os SSRs têm sido utilizados com sucesso para

avaliar a filogenia genética, *pedigree*, identificação, acessos de germoplasma (McCouch *et al.*, 2001). Os SSR foram especialmente importantes na avaliação da diversidade genética e mapas genéticos de feijão vulgar (Yu *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2000; Métais *et al.*, 2002; Gaitán-Solís *et al.*, 2002; Masi *et al.*, 2003; Blair *et al.*, 2003, 2006; Benchimol *et al.*, 2007; Grisi *et al.*, 2007; Hanai *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008).

Em Moçambique, o uso de marcadores SSR para avaliar a diversidade genética no feijão vulgar ainda não teve lugar. O presente estudo é o primeiro do género que está sendo conduzido para avaliar a diversidade. Se se mostrar útil, vai abrir espaço para o seu uso na diferenciação dos genótipos, contribuindo, assim, para o uso eficaz desses genótipos em programas de melhoramento.

O presente estudo teve como objectivo avaliar a relação genética entre os genótipos de feijão, usando marcadores moleculares microssatélites.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Colheita de amostras

As amostras de folhas jovens e sãs dos quarenta e três genótipos foram colhidas após a emissão do primeiro trifólio e colocadas em silica gel durante a transferência do campo para o laboratório, onde foram, imediatamente, mergulhadas em nitrogénio líquido e conservadas a -80°C.

4.2.2 Extração de ADN

As amostras de folhas foram maceradas em almofarizes de porcelana na presença de nitrogénio líquido e o ADN extraído segundo o protocolo adaptado de Doyle e Doyle (1987). (Anexo 3)

4.2.3 Amplificação por PCR dos marcadores SSRs

Para a amplificação do ADN por PCR foram usadas sequências de *primers* largamente usadas no *Phaseolus vulgaris*. Das várias sequências disponíveis, 8 foram seleccionados de acordo com a descrição na tabela abaixo.

Tabela 9: *Primers* SSRs utilizados para estudos de diversidade genética

Marcadores SSR	Tamanho (bp)	Core motif	Sequência dos primers	T _a (°C)
PH9B2	149	(CCT) ₇	5'-CCAACCACATTCTTCCCTACGTC-3' 5'-GCGAGGCAGTTATCTTTAGGAGTG-3'	49
PH2B2	95	(GCCAC C) ₅	5'-CGTTAGATCCCGCCCAATAGT-3' 5'-CCGTCCAGGAAGAGCGAGC-3'	48
PH3B4	139	(AT) ₄ (T) 2(AT) ₆	5'-ACCTAGAGCCTAATCCTTCTGCGT-3' 5'-GAATGTGAATATCAGAAAGCAAATGG-3'	49
PH5B5	132	(AT) ₅	5'-CCGTTGCCTGTATTTCCCCAT-3' 5'-CGTGTGAAGTCATCTGGAGTGGTC-3'	49
PH10B11	157	(CT) ₁₁	5'-GAGGGTGTTCCTACTATTGTCACTGC-3' 5'-TTCATGGATGGTGGAGGAACAG-3'	49
PH4B6	163	(AT) ₁₈	5'-AATCTGCCGAGAGTGGTCCTGC-3' 5'- GATTGAAATATCAAAGAGAATTGTTACC-3'	48
PH6B9	192	(AT) ₁₂	5ϕ- AGTTAAATTATACGAGGTTAGCCTAAATC- 3ϕ 5ϕ-CATTCCCTTCACACATTCACCG-3ϕ	52
PH7B3	161	(AT) ₉	5ϕ-AGTCGCCATAGTTGAAATTTAGGTG-3ϕ 5ϕ- CTTATTAACCGTGAGCATATGTATCATTC -3ϕ	49

bp ó pares de base, T_a ó temperatura de anelamento

As reacções de PCR foram efectuadas nas seguintes condições: 30 ng de ADN genómico; Taq buffer 1x, MgCl₂ a 4 mM, dNTPs a 0.2 mM (*Invitrogen*, Life Technologies); 50 pmol de cada *primer*; 1U de Taq ADN polimerase (*Fermentas*); água MilliQ até perfazer os 20 µl do volume total de reacção.

As reacções de PCR foram efectuadas com o seguinte programa base: 94°C durante 5 minutos (desnaturação inicial), seguidos de 30 ciclos de: 94°C durante 30 segundos (desnaturação), 56°C durante 30 segundos (emparelhamento dos *primers*), 72°C durante 30 segundos (extensão); 72°C durante 15 minutos (extensão final).

Os fragmentos amplificados foram separados por electroforese em gel de poliacrilamida contendo TAE 10x, 40% de acrilamida-bisacrilamida, 10% de APS e Temed, corridos a 110V por, aproximadamente, 90 min. Terminada a corrida, o gel foi visualizado com 5µl de Sybr green e TBE 1x durante 30 min e fotografado no Gel doc.

4.3 Resultados

4.3.1 Avaliação da diversidade genética

O ADN extraído com sucesso nos 43 genótipos foi visível no gel de agarose de acordo com a figura 7.

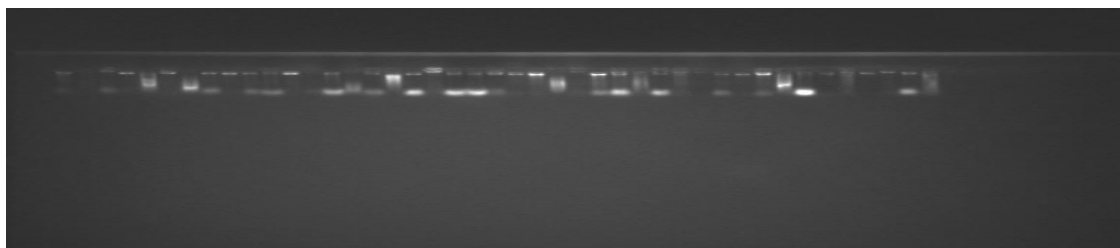


Figura 7. Gel de agarose com o ADN dos 43 genótipos

Dos oito *primers* usados no estudo, nenhum gerou polimorfismo suficiente para avaliar a diversidade genética que é condição necessária para que marcadores moleculares sejam usados (figura 8).

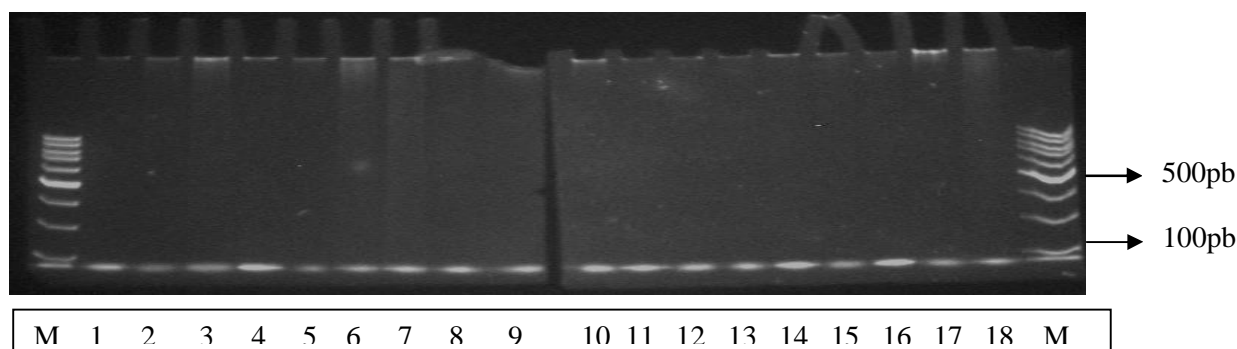


Figura 8. Gel de poliacrilamida com marcadores SSR

4.4 Discussão

Os oito microssatélites usados apresentaram um padrão monomórfico, sem variação de alelos, facto que pode ter sido afectado pelo tipo de fecundação do feijão (auto-fecundação com persistência de indivíduos homozigóticos) ou pelo tipo de microssatélites usados neste estudo, que não foram eficazes em discriminar geneticamente os genótipos. O tipo de gel usado, associado ao método de revelação, também poderá ter contribuído para a ineficiência dos SSR usados.

Segundo Stebbins (1957), deve-se reconhecer o facto de que muitas espécies de plantas podem ser sucessivamente persistentes no que se refere à auto-fecundação, com consequência para a homozigidade se os seus indivíduos forem, na sua maioria, homozigóticos, ainda que existam

indivíduos relativos que requerem fecundação cruzada. Devido ao sistema de polinização do feijão, pode-se inferir que uma cultivar de feijão é constituído por uma linha pura ou por uma mistura de linhas puras. Uma linha pura, do ponto de vista genético, é um genótipo que possui todos os seus *loci* em homozigose e alelos iguais em todos os genes. Por isso, com as sucessivas multiplicações das sementes via autofecundação não alteram a sua constituição genética. Outra possível explicação é que a evolução de plantas de auto-fecundação não é apenas um acidente mas, actualmente, é favorecida pela selecção natural, visto que a autofecundação possui algumas vantagens em relação aos cruzamentos sob certas condições. Nestas condições, as diferenças entre os cruzamentos e a auto-fecundação devem ser correlacionados com outras diferenças entre plantas que possuam sistemas genéticos divergentes.

4.5 Conclusões e Recomendações

Este estudo não encontrou polimorfismo entre os genótipos, conseqüentemente, não teve acesso à diversidade genética dos 43 genótipos estudados. Provavelmente, o tipo de microssatélites usados não foi apropriado para o material de estudo, aliado às características relacionadas com a forma de reprodução do feijão vulgar (auto-fecundação).

Estudos aprofundados usando marcadores moleculares mais específicos (como outros tipos de microssatélites ou SNPs) são recomendados para recolher mais informação sobre a diversidade genética e genes específicos responsáveis por características particulares de interesse agronómico. O conhecimento de tais genes irá melhorar a necessidade de melhoramento da cultura através da selecção assistida por marcadores.

Um melhor entendimento dos centros de origem dos genótipos do *P. vulgaris* nos bancos de germoplasma em Moçambique a partir de análises moleculares do ADN cloroplástico e estudos mais específicos em proteína das sementes são outras áreas a considerar para investigação.

A repetição deste estudo com o mesmo material e com melhores métodos de revelação é igualmente recomendado.

Referências bibliográficas

Adesoye, A. I.; Ojobo, O. A. 2012. Genetic diversity assessment of *Phaseolus vulgaris* L. landraces in Nigeria's mid-altitude agroecological zone. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 4(13), 453-460.

- Asfaw, A.; Blair, M.W; Almekinders, C. 2009. Genetic diversity and population structure of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from the East African highlands. *Theoretical and Applied Genetics*, 120, 1-12.
- Benchimol, L.L.; Campos, T.; Carbonell, S.A.M.; Colombo, C.A.; Chiorato, A.F.; Formighieri, E.F.; Souza, A.P. 2007. Structure of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties of Mesoamerican and Andean origins using new developed microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54, 1747-1762.
- Blair, M. W.; Pedraza, F.; Buedia, H. F.; Gaitán-Solís, E.; Beebe, S. E.; Gepts, P.; Tohme, J. 2003. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 1362-1374.
- Chin, E. C. L.; Senior, M. L.; Shu, H. 1996. Maize simple repetitive ADN sequences: Abundance and allele variation. *Genome*, 39, 866-873.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid ADN isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bulletin*, 19, 116-115.
- Ender, M.; Terpstra, K.; Kelly, J.D. 2008. Marker assisted selection for white mold resistance in common bean. *Molecular Breeding*, 2, 149-157.
- Gaitán-Solís, E.; Duque, M. C.; Edwards, K. J.; Tohme, J. 2002. Microsatellite Repeats in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, Characterization, and Cross-Species Amplification in *Phaseolus* ssp. *Crop Science*, 42, 2128-2136.
- Gómez, O. J.; Blair, M. W.; Frankow-Lindberg, B. E.; Gullberg, U. 2004. Molecular and phenotypic diversity of common bean landraces from Nicaragua. *Crop Science*, 44, 1412-1418.
- Grisi, M. C. M.; Blair, M. W.; Gepts, P.; Brondani, C.; Pereira, P. A. A.; Brondadi, R. P. V. 2007. Genetic mapping of a new set of microsatellite markers in a reference common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) population BAT93 x Jalo EEP558. *Genetic and Molecular Research*, 3, 691-706.

- Guo, J. C.; Hu, X. W.; Yanagihara, S.; Yoshinobu, E. 2000. Isolation and characterization of microsatellites in snap bean. *Acta Bot. Sin.*, 42, 1179-1183.
- Hanai, L.L.; Campos, T.; Camargo, L.E.A., Benchimol, L.L.; Souza, A.P.; Melotto, M.; Carbonell, S.A.M.; Chioratto, A.F.; Consoli, L.; Formighieri, E.F.; Siqueira, M.V.B.M.; Tsai, T.M.; Vieira, M.L.C. 2007. Development, characterization and comparative analysis of polymorphism at common bean-SSR loci isolated from genic and genomic sources. *Genome*, 50, 266-277.
- Maras, M.; Susnik, S.; Sustar-Vozlic, J.; Meglic, V. 2006. Temporal changes in genetic diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) accessions cultivated between 1800 and 2000. *Russian J. Genet*, 42, 775-782.
- Marotti, I.; Bonetti, A.; Minelli, M.; Catizone, P.; Dinelli, G. 2007. Characterization of some Italian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces by RAPD, semi-random and ISSR molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54,175-188.
- Masi, P.; Spagnoletti-Zeuli, P. L., Donini, P. 2003. Development and analysis of multiplex microsatellite markers sets in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular Breeding*, 11,303-313.
- McCouch, S. R.; Temnykh, S.; Lukashova, A.; Coburn, J.; Declerck, G.; Cartinhour, S.; Harrington, S.; Thomson, M.; Septiningsi, E.; Semon, M.et. al. 2001. Microsatellite markers in rice: Abundance, diversity and applications. In: Khush, G. S.; Brar, D. S.; Hardy, B. (eds) Rice Genetics IV. IRRI, Manila, 117-135.
- Métais, I.; Hamon, B.; Jalouzot, R.; Peltier, D. 2002. Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library. *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 1346-1352.
- Papa, R.; Gepts, P. 2003. Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. *Theoretical and Applied Genetics*, 106, 239-250.
- Payró de la Cruz, E.; Gepts, P.; Colunga-GarcíaMarín, P.; Zizumbo-Villareal, D. 2005. Spatial distribution of genetic diversity in wild populations of *Phaseolus vulgaris* L. from

- Guanajuato and Michoacán, Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52, 589-599.
- Priolli, R. H. G.; Mendes-Junior, C. T.; Arantes, N. E.; Contel, E. P. B. 2002 Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. *Genetic and Molecular Biology*, 25,185-193.
- Santalla, M.; De Ron, A. M.; De La Fuente, M. 2010. Integration of genome and phenotypic scanning gives evidence of genetic structure in Mesoamerican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from the southwest of Europe. *Theoretical and Applied Genetics*; 120, 1635-1651.
- Singh SP, Gutierrez JA, Molina A, Urrea C, Gepts P. 1991. Genetic diversity in cultivated Common bean: II. Marker-based analysis of morphological and agronomic traits. *Crop Science*, 31, 23-29.
- Singh, S. P. 2001. Broadening the genetic base of common bean cultivars: A review. *Crop Science*, 41(6), 1659-1675.
- Stebbins, G. L. 1957. Self Fertilization and Population Variability in the Higher Plants. *The American Naturalist*, 91 (861), 337-354.
- Svetleva, D.; Pereira, G.; Carlier, J.; Cabrita, L.; Leitão, J.; Genchev, D. 2006. Molecular characterization of *Phaseolus vulgaris* L. genotypes included in Bulgarian collection by ISSR and AFLP analyses. *Scientia Horticulturae*, 109, 198-206.
- Tesemma, T., B. Getachew and M. Werede. 1991. Morphological diversity intetraploid wheat landrace populations from the central highlands of Ethiopia. *Hereditas*, 114, 171-176.
- Yu, K.; Park, S. J.; Poysa, V. 1999. Abundance and variation of microsatellite ADN sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). *Genome*, 42, 27-34.
- Zhang, X.; Blair, M.W.; Wang, S. 2008. Genetic diversity of Chinese common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces assessed with simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 117, 629-640.

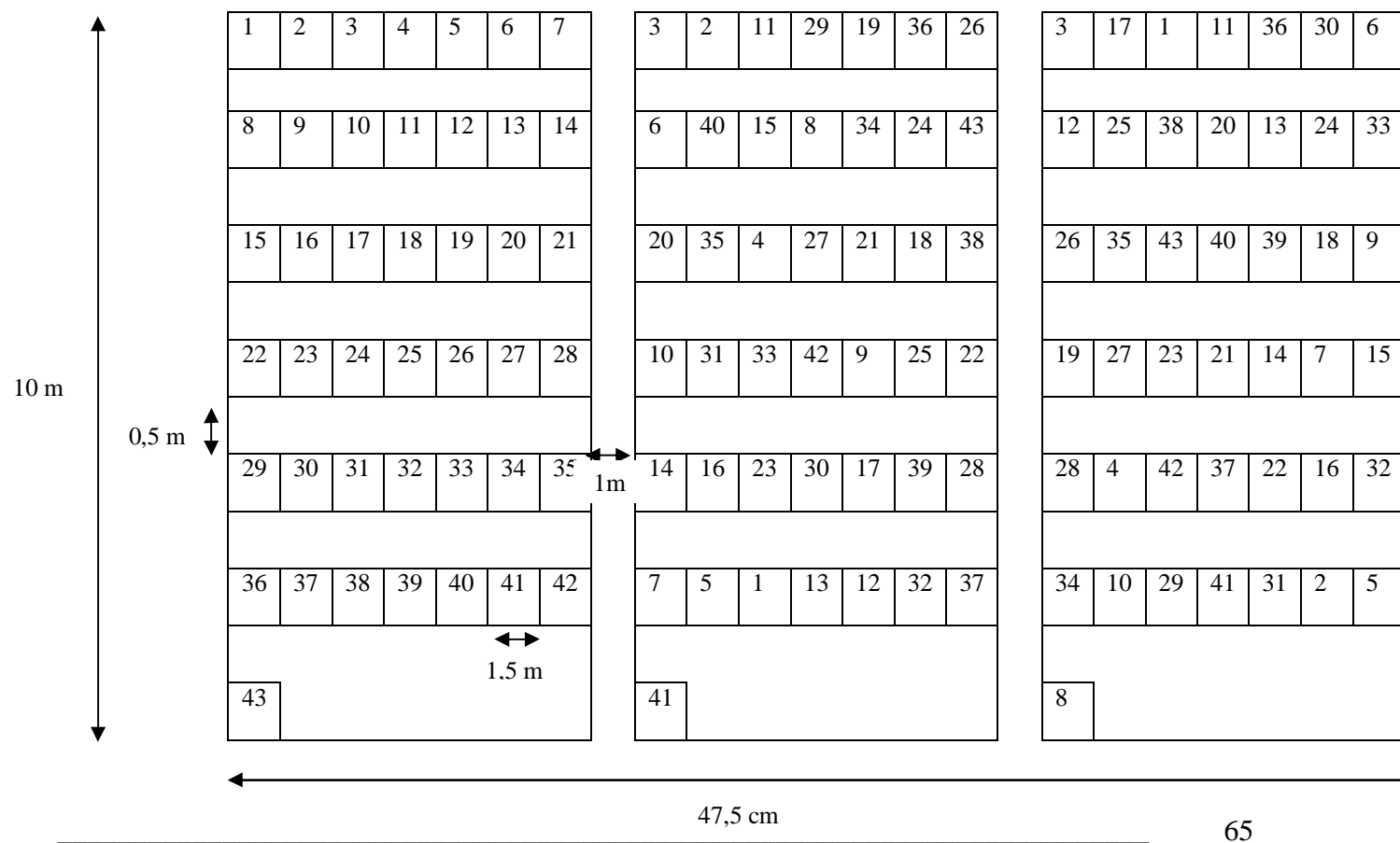
SUMÁRIO DA DISSERTAÇÃO

O feijão vulgar (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura com elevado valor económico e alimentar em todo o mundo. A sua valia tem como atributo o seu alto teor de proteínas e carboidratos. Trata-se de uma cultura de subsistência, pois, para além de providenciar alimento para os pequenos agricultores, é, também, fonte de renda. Entretanto, a produção do feijão é limitada devido a factores bióticos (práticas culturais, pragas e doenças, uso de semente não melhorada, entre outros) e abióticos (altas temperaturas, seca). Devido ao seu elevado consumo, especialmente pelas populações de baixa renda, vários estudos foram levados a cabo com o objectivo de melhorar a cultura, quer no que respeita aos caracteres agronómicos bem como aos nutricionais e genéticos. A análise genética dos genótipos das culturas agrícolas é um pré-requisito para o sucesso de qualquer programa de melhoramento genético. A utilização de marcadores constitui uma base para estudos de caracterização. A presente dissertação avaliou a diversidade genética do feijão vulgar usando marcadores morfológicos e microssatélites. O estudo mostrou que, apesar dos caracteres morfológicos serem influenciados pelo ambiente, a caracterização morfológica é importante, na medida em que permite a discriminação de genótipos, se devidamente seleccionados os caracteres. Caracteres como o número de sementes, o peso de 100g e o rendimento devem ser levados em consideração em estudos do género, pois, permitiram a discriminação eficiente dos genótipos. Os caracteres morfológicos quantitativos e qualitativos, geraram dendogramas que mostraram um padrão de agrupamento similar dos genótipos. Observou-se que o agrupamento com base nos caracteres quantitativos esteve directamente relacionado aos *pools* genéticos dos genótipos estudados. Os marcadores microssatélites são os indicados para estudos de diversidade genética por serem co-dominantes, de fácil reprodução e rápidos. No presente estudo, os microssatélites usados não produziram o polimorfismo adequado para a discriminação dos genótipos. Este facto pode estar relacionado ao tipo de gel usado, aos métodos de revelação ou até mesmo ao tipo de microssatélites usados.

Anexos

1 Anexo 1. Esquema do experimento

2



Anexo 2. Lista dos genótipos usados no estudo

Código dos tratamentos	Nome do genótipo	Código dos tratamentos	Nome do genótipo
1	Bonus	23	Lic-04-9-3
2	Cal 143	24	VTTT-924/15-2
3	Cal 148	25	VTTT-924/2-4-2-1
4	Icapijão	26	VTTT/7-6
5	Feijão branco	27	Lic-04-8-4
6	Sug 131	28	MN 13451-6-9
7	CIM-RM-03-42-14	29	SAB 569
8	Doctor	30	Bunita
9	Kaki	31	BF 13572-3
10	D. Calima	32	FEB 196
11	Tio Canela	33	CIM-RM-03-42-11
12	Seq 1003	34	Kiangara
13	Bat 447	35	VTTT 918/15-4-4
14	Maharagisoya	36	Selian
15	Lic-04-2-1	37	CIM-RM00-323 LN30
16	Sab 518	38	BF 13607-9
17	Sab 516	39	VTT 918/15-1
18	Sab 572	40	CIM-RM00-Pop-321
19	Lic-04-7-2	41	CIM-Sug-03-09-07
20	Lic-04-1-3	42	Bat 13182
21	CIM-RM00-321 LN01	43	MN 13389-6
22	Lic-04-2-3		

Anexo 3. Protocolo de extracção de ADN usado

Tampão de extracção utilizado para extrair ADN de feijão vulgar.

CTAB (Doyle e Doyle, 1987) modificado

- i. Tampão de extracção

Soluções:

Tris- (Idroximetil) metilamina HCl, pH8 (TRIS)	280mM
Cloreto de Sódio	100mM
Ácido Etileno-Diamino-Tetracético (EDTA)	1 mM
PVP	
Sódio Dodecil Sulfato (SDS)	1%
Solução extra: Brometo de Cetiltrimetilamônio	2% (P/V)

Procedimento:

1. Macerar 2-3 folhas com um pouco de PVP;
2. Adicionar 1 ml da solução tampão de extracção misturada com CTAB, transferir para um tubo Eppendorf de 1,5ml e adicionar 500µl de SDS. Fechar o tubo e misturar gentilmente até a mistura ficar homogeneamente distribuída;
3. Incubar as amostras em banho-maria a 60°C durante 30 minutos, agitando no final para manter o extracto ressuspendido;
4. Retirar o tubo do banho-maria e esperar que a mistura atinja a temperatura ambiente. Adicionar 500µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1; v/v). Fechar o tubo e misturar no misturador durante 10 minutos;
5. Centrifugar a 13000rpm por 10minutos a temperatura ambiente, para separar a fase orgânica da aquosa;
6. Remover a fase aquosa (fase superior) para um tubo novo de 1,5 ml;
7. Repetir uma vez a extracção com clorofórmio: álcool isoamílico (etapas 4 a 6);
8. Adicionar 1 volume de iso-propanol conservado a -20°C. Misturar suavemente até formar um precipitado e conservar as amostras a -20°C (overnight) ou a -80°C por 30 minutos*;
9. Centrifugar as amostras a 10000rpm durante 20 minutos;
10. Descartar o sobrenadante e lavar o precipitado com 500µl de etanol 70% (v/v), conservado a -20°C;
11. Descartar o sobrenadante e secar o precipitado invertendo o tubo em um papel-toalha;
12. O ADN foi ressuspendido em 20 µl de dd H₂O e foi efectuado um tratamento adicional

do ADN com RNase (1 mg/ml, 37°C, 1h, Sigma). A quantidade e qualidade do ADN extraído foi determinada por leitura espectrofotométrica (OD230, OD260 e OD280) (Lambda EZ201, Perkin Elmer, USA). Cada amostra de ADN stock foi diluída para uma concentração de trabalho de 25 ng/μl. Adicionalmente, o ADN foi visualizado em gel de agarose a 1% para avaliação da sua integridade, de acordo com o descrito por Sambrook et al. (1989)

13. Conservar as amostras a 4°C.

Anexo 4. Média dos caracteres quantitativos e qualitativos

Identifier	Values	Missing	Levels			
	REP	129	0	3		
18	FACTOR [MODIFY=yes; NVALUES=129; LEVELS=43; REFERENCE=1] Genotipo					
19	READ Genotipo; FREPRESENTATION=ordinal					
	Identifier	Values	Missing	Levels		
	Genotipo	129	0	43		
25	VARIATE [NVALUES=129] AltP					
26	READ AltP					
	Identifier	Minimum	Mean	Maximum	Values	Missing
	AltP	7.100	12.16	19.00	129	0
35	VARIATE [NVALUES=129] NDF					
36	READ NDF					
	Identifier	Minimum	Mean	Maximum	Values	Missing
	NDF	52.00	64.81	80.00	129	0
43	VARIATE [NVALUES=129] NVP					
44	READ NVP					
	Identifier	Minimum	Mean	Maximum	Values	Missing
	NVP	1.400	3.422	6.900	129	0
52	VARIATE [NVALUES=129] NSV					
53	READ NSV					
	Identifier	Minimum	Mean	Maximum	Values	Missing
	NSV	2.200	4.199	6.400	129	0
61	VARIATE [NVALUES=129] P100S					
62	READ P100S					
	Identifier	Minimum	Mean	Maximum	Values	Missing
	P100S	15.40	36.80	91.70	129	0
71	VARIATE [NVALUES=129] Rend					
72	READ Rend					

	Identifier Rend	Minimum 200.2	Mean 476.3	Maximum 1192	Values 129	Missing 0
83	VARIATE [NVALUES=129] HCr					
84	READ HCr					
	Identifier HCr	Minimum 1.000	Mean 1.093	Maximum 2.000	Values 129	Missing 0
89	VARIATE [NVALUES=129] FF					
90	READ FF					
	Identifier FF	Minimum 1.000	Mean 1.000	Maximum 1.000	Values 129	Missing 0
95	VARIATE [NVALUES=129] CurV					
96	READ CurV					
	Identifier CurV	Minimum 3.000	Mean 3.000	Maximum 3.000	Values 129	Missing 0
101	VARIATE [NVALUES=129] CorS					
102	READ CorS					
	Identifier CorS	Minimum 1.000	Mean 4.395	Maximum 10.00	Values 129	Missing 0

Anexo 5. ANOVA para os caracteres estudados

REML variance components analysis

Response variate: AltP
 Fixed model: Constant + REP
 Random model: Genotipo
 Number of units: 129

Residual term has been added to model

Sparse algorithm with AI optimisation

Estimated variance components

Random term	component	s.e.
Genotipo	0.226	0.471

Residual variance model

Term	Factor	Model(order)	Parameter	Estimate	s.e.
Residual		Identity	Sigma2	4.830	0.745

Tests for fixed effects

Sequentially adding terms to fixed model

Fixed term	Wald statistic	n.d.f.	F statistic	d.d.f.	F pr
REP	4.82	2	2.41	84.0	0.096

REML variance components analysis

Response variate: CorS
 Fixed model: Constant + REP
 Random model: Genotipo
 Number of units: 129

Residual term has been added to model

Sparse algorithm with AI optimisation

Estimated variance components

Random term	component	s.e.
Genotipo	2.3989831	0.3022507

Residual variance model

Term	Factor	Model(order)	Parameter	Estimate	s.e.
Residual	Identity	Sigma2		0.000172	aliased

Wald tests for fixed effects

Sequentially adding terms to fixed model

Fixed term	Wald statistic	d.f.	Wald/d.f.	chi pr
REP	0.00	2	0.00	1.000

REML variance components analysis

Response variate: CurV
 Fixed model: Constant + REP
 Random model: Genotipo
 Number of units: 129

Residual term has been added to model

Sparse algorithm with AI optimisation

REML variance components analysis

Response variate: HCr
 Fixed model: Constant + REP
 Random model: Genotipo
 Number of units: 129

Residual term has been added to model

Sparse algorithm with AI optimisation

Estimated variance components

Random term	component	s.e.
Genotipo	0.028792226	0.003627566

Residual variance model

Term	Factor	Model(order)	Parameter	Estimate	s.e.
Residual	Identity	Sigma2	0.00000206	aliased	

Wald tests for fixed effects

Sequentially adding terms to fixed model

Fixed term	Wald statistic	d.f.	Wald/d.f.	chi pr
REP	0.00	2	0.00	1.000

REML variance components analysis

Response variate: NDF
 Fixed model: Constant + REP
 Random model: Genotipo
 Number of units: 129

Residual term has been added to model

Sparse algorithm with AI optimisation

Estimated variance components

Random term	component	s.e.
Genotipo	24.035234	3.028227

Residual variance model

Term	Factor	Model(order)	Parameter	Estimate	s.e.
Residual	Identity		Sigma2	0.00172	aliased

REML variance components analysis

Response variate: NSV
 Fixed model: Constant + REP
 Random model: Genotipo
 Number of units: 129

Residual term has been added to model

Sparse algorithm with AI optimisation

Estimated variance components

Random term	component	s.e.
Genotipo	0.0286	0.0451

Residual variance model

Term	Factor	Model(order)	Parameter	Estimate	s.e.
Residual		Identity	Sigma2	0.448	0.0691

Tests for fixed effects

Sequentially adding terms to fixed model

Fixed term	Wald statistic	n.d.f.	F statistic	d.d.f.	F pr
REP	23.57	2	11.79	84.0	<0.001

REML variance components analysis

Response variate: NVP
 Fixed model: Constant + REP
 Random model: Genotipo
 Number of units: 129

Residual term has been added to model

Sparse algorithm with AI optimisation

Estimated variance components

Random term	component	s.e.
Genotipo	-0.076	0.094

Residual variance model

Term	Factor	Model(order)	Parameter	Estimate	s.e.
Residual		Identity	Sigma2	1.200	0.185

Tests for fixed effects

Sequentially adding terms to fixed model

Fixed term	Wald statistic	n.d.f.	F statistic	d.d.f.	F pr
REP	24.46	2	12.23	84.0	<0.001

REML variance components analysis

Response variate: P100S
 Fixed model: Constant + REP
 Random model: Genotipo
 Number of units: 129

Residual term has been added to model

Sparse algorithm with AI optimisation

Estimated variance components

Random term	component	s.e.
Genotipo	35.8	24.0

Residual variance model

Term	Factor	Model(order)	Parameter	Estimate	s.e.
Residual		Identity	Sigma2	193.3	29.8

Tests for fixed effects

Sequentially adding terms to fixed model

Fixed term	Wald statistic	n.d.f.	F statistic	d.d.f.	F pr
REP	11.50	2	5.75	84.0	0.005

REML variance components analysis

Response variate: Rend
 Fixed model: Constant + REP
 Random model: Genotipo
 Number of units: 129

Residual term has been added to model

Sparse algorithm with AI optimisation

Estimated variance components

Random term	component	s.e.
Genotipo	6807.	3962.

Residual variance model

Term	Factor	Model(order)	Parameter	Estimate	s.e.
Residual		Identity	Sigma2	29800.	4598.

Tests for fixed effects

Sequentially adding terms to fixed model

Fixed term	Wald statistic	n.d.f.	F statistic	d.d.f.	F pr
REP	13.97	2	6.99	84.0	0.002

Anexo 5. Correlação para os caracteres estudados

Correlations

NDF					
NSV	0.0080				
NVP	0.0473	-0.2365			
P100S	-0.1755	-0.2069	0.0185		
Rend	-0.1797	-0.2267	0.0200	0.9937	
	NDF	NSV	NVP	P100S	Rend

Number of observations: 129

Two-sided test of correlations different from zero probabilities

NDF					
NSV	0.9286				
NVP	0.5947	0.0070			
P100S	0.0466	0.0187	0.8356		
Rend	0.0416	0.0098	0.8223	0.0000	
	NDF	NSV	NVP	P100S	Rend

Correlations

AltP					
CorS	0.0151				
CurV	0.0000	0.0000			
FF	0.0000	0.0000	0.0000		
HCr	0.0889	0.2542	0.0000	0.0000	
	AltP	CorS	CurV	FF	HCr

Number of observations: 129

Two-sided test of correlations different from zero probabilities

AltP					
CorS	0.8654				
CurV	1.0000	1.0000			
FF	1.0000	1.0000	1.0000		
HCr	0.3164	0.0036	1.0000	1.0000	
	AltP	CorS	CurV	FF	HCr