

MAGUIDA FABIANA DA SILVA

MELHORAMENTO GENÉTICO DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) PARA
ALTO TEOR DE PROTEÍNAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL

2004

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586m
2004
Silva, Maguida Fabiana da, 1980
Melhoramento genético do feijoeiro (*Phaseolus
vulgaris* L.) para alto teor de proteínas / Maguida Fabiana
da Silva. – Viçosa : UFV, 2003.
76p. : il.

Orientador: Maurilio Alves Moreira
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa

1. Feijão - Melhoramento genético. 2. Cruzamento
(Genética). 3. Marcadores RAPD. 4. Sementes - Seleção.
5. Feijão - Teor de proteína. I. Universidade Federal de
Viçosa. II.Título.

CDD 20.ed. 635.6523

MAGUIDA FABIANA DA SILVA

MELHORAMENTO GENÉTICO DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) PARA
ALTO TEOR DE PROTEÍNAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 18 de fevereiro de 2004

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Conselheiro)

Prof. José Eustáquio de Souza Carneiro
(Conselheiro)

Dra. Rita Maria Alves de Moraes

Prof. Maria Goreti de Almeida Oliveira

Prof. Maurilio Alves Moreira
(Orientador)

Aos meus pais, Renato e Lúcia.
Aos meus irmãos Marco e Bianca.
Aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que existe.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realizar o curso.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa – Arroz e feijão pela participação decisiva neste trabalho.

Ao Professor Maurílio Alves Moreira, pela orientação, pelo apoio e pelos ensinamentos.

Aos Professores Everaldo Gonçalves de Barros e José Eustáquio de Souza Carneiro pelo aconselhamento, pela convivência e pelo incentivo.

À doutora Maria José Del Peloso, pela contribuição para realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento pelos ensinamentos, e pela dedicação. Suas contribuições foram fundamentais na minha formação profissional.

Aos colegas mais experientes Rita, Newton, Vilmar e Inês pelo apoio, pelo aconselhamento, pela troca de experiências e por sempre terem tempo para meus questionamentos.

Aos colegas de laboratório e de curso, pela convivência, pela amizade e pela torcida sem os quais esse trabalho dificilmente seria realizado.

A todos os funcionários do BIOAGRO, especialmente João Paulo, Naldo e Jander pelo apoio e pela convivência.

Às colegas de república Giselda e Isane que foram a minha família em Viçosa, pela amizade, pelo apoio, pelos conselhos.

À “Gauchada” de Viçosa pela amizade e pela torcida.

Ao Gallileu por alegrar os meus dias.

Aos meus amigos de longe e de perto, recentes ou antigos, aos malucos e aos normais, pois sem eles a busca dos meus sonhos não teria sentido.

BIOGRAFIA

MAGUIDA FABIANA DA SILVA, filha de Renato Herter da Silva e Lúcia Minetto da Silva, nasceu no dia 17 de abril de 1980, em São Luiz Gonzaga, Rio Grande do Sul.

Em março de 1998 ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, graduando-se em janeiro de 2002.

Em abril de 2002 ingressou no curso de mestrado em Genética e melhoramento da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, defendendo tese em 18 de fevereiro de 2004.

CONTEÚDO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Importância sócio - econômica do feijão comum.....	4
2.2.Melhoramento do feijão comum.....	7
2.2.1 Melhoramento do feijoeiro para características de qualidade.de grãos....	9
2.3 Proteínas da semente do feijoeiro	11
2.4 Marcadores moleculares RAPD.....	14
2.4.1 DNA <i>Fingerprinting</i> usando <i>primers</i> arbitrários.....	15
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
4. CAPÍTULO 1	
EFICIÊNCIA DE SELEÇÃO PARA ALTO TEOR DE PROTEÍNA EM FEIJÃO.....	27
RESUMO.....	28
INTRODUÇÃO.....	30
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
5. CAPÍTULO 2	
USO DE FINGERPRINTING NO MELHORAMENTO PARA TEOR DE PROTEÍNA EM FEJJOEIRO.....	52

RESUMO.....	53
INTRODUÇÃO.....	55
MATERIAL E MÉTODOS.....	57
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	76

RESUMO

SILVA, Maguida Fabiana da, M. S. Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2004. **Melhoramento genético do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) para alto teor de proteínas.** Orientador: Maurilio Alves Moreira. Conselheiros: Everaldo Gonçalves de Barros e José Eustáquio de Souza Carneiro.

O feijão é um dos constituintes básicos da dieta do brasileiro, além de ser um produto agrícola de grande valor econômico-social. Neste sentido, para atender as exigências dos consumidores, os programas de melhoramento começam a voltar atenção para características de qualidade do grão. Este trabalho faz parte do programa de melhoramento de qualidade do feijoeiro desenvolvido pelo BIOAGRO/UFV em parceria com a Embrapa - Arroz e Feijão e visa o aumento do teor de proteínas nos grãos do feijoeiro por meio de retrocruzamentos assistidos por marcadores moleculares. Foram utilizadas as variedades Baliza, Laranja, Gaurama e PVA 109 como fontes doadoras de genes para alto teor de proteína e a linhagem CNFC 7827 como genitor recorrente. Para atingir este objetivo as seguintes etapas foram realizadas: (a) realização de cruzamentos entre genótipos de alto teor de proteína com uma linhagem elite; (b) análise do teor de proteína de cerca de 400 sementes segregantes (F_2) de cada cruzamento por método não destrutivo; (c) seleção das sementes com maior teor de proteína de cada cruzamento (intensidade de seleção de 10%); (d) realização de *fingerprinting* das plantas F_2 selecionadas com marcadores RAPD; (e) retrocruzamentos de todas as plantas F_2 selecionadas com o genitor recorrente; (f) confirmação do teor de proteína pelo método Kjeldahl nas sementes $F_{2:3}$; (g) seleção das plantas RC_1F_1 com base nos resultados de distância genética determinada com marcadores moleculares e o teor de proteína das plantas F_2 selecionadas e confirmadas na geração $F_{2:3}$. Todas as populações tiveram herdabilidades altas variando de 58 a 77 %, o que sugere que são adequadas para obter alta eficiência de seleção ou estudos de mapeamento para a característica teor de proteína. Os ganhos gerais variaram

de - 0,95 a 4,26%, este resultado indica que a seleção em F_2 tem baixa eficiência quando utilizada isoladamente. Entretanto, a ampla variação do teor de proteína em progênies $F_{2:3}$ e as porcentagens de ganho observadas (13,66 a 25,84% considerando as cinco progênies de maiores teores) demonstram que o processo de transferência de genes para alto teor protéico por meio de retrocruzamentos é eficiente quando baseado na pré-seleção de sementes F_2 e posterior seleção das melhores famílias $F_{2:3}$. A seleção em geração F_2 com auxílio de micro análise não destrutiva foi pouco eficiente para a população derivada do cruzamento Laranja x CNFC 7827. Fatores como o efeito de dominância e interações genótipo x ambiente diferenciadas causaram dificuldades na seleção dos genótipos superiores. Em vista deste resultado, modificações no método de seleção utilizado podem ser propostas visando aumentar sua eficiência. Os ganhos de seleção para teor de proteína com o auxílio de marcadores moleculares variaram entre 9,92 a 15,65%. As plantas F_2 das diferentes populações apresentaram distância genética em relação ao progenitor recorrente bastante variável. Foi possível obter ganhos de similaridade em relação à média de similaridade encontrada nas populações F_2 variando de 12 a 16%. Com a utilização indivíduos selecionados de alto teor de proteína mais próximos ao genitor recorrente o número de retrocruzamentos necessários para recuperar o genoma do mesmo deve ser menor.

ABSTRACT

SILVA, Maguida Fabiana da, M. S. Universidade Federal de Viçosa, February, 2004. **Genetic improvement of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) for high protein content.** Advisor: Maurilio Alves Moreira. Committee members: Everaldo Gonçalves de Barros and José Eustáquio de Souza Carneiro.

The common bean is one of the most important component of the Brazilian diet, in addition, is an agricultural product of great economic and social importance. In this sense, to attend the consumers' exigencies, the breeding programs start to give attention for quality traits of the grain. This work is part of the quality bean breeding program being developed by BIOAGRO/UFV in partnership with Embrapa – Rice and Bean center and aims to increase the common bean protein content by means of backcrosses assisted by molecular markers. There were used the varieties Baliza, Laranja, Gaurama and PVA as gene donors for high protein content and the CNFC 7827 as recurrent genitor. To achieve this goal, specific steps were reached: (a) crossings high protein content genotypes with an elite cultivar (b) analysis of protein content of 400 F_2 seeds from each cross by using non-destructive method; (c) selection of seeds with high protein content from each cross (selection intensity of 10%); (d) fingerprinting the F_2 selected plants with RAPD markers; (e) backcrosses the selected F_2 plants with the recurrent genitor; (f) confirmation the protein content in the $F_{2:3}$ seeds by the Kjeldahl method; (g) selection and planting the RC_1F_1 based on genetic distances, obtained with molecular markers, and protein content of the F_2 plants selected and confirmed in the $F_{2:3}$. All the populations had a high heritability varying from 58 to 77%, which suggested that they are adequate for selection or protein mapping loci. The general gains varied from – 0.95 to 4.26%, which indicates that the selection in F_2 has low efficiency when used isolated. However, the wide variation of protein content in $F_{2:3}$ and the gains observed (13,66 to 25,84% considering the five $F_{2:3}$ of high protein

contents) demonstrate that the genes transfer process for high protein content by backcrosses is efficient when based on pre-selection of F_2 seeds and posterior selection of the best $F_{2:3}$ families. The selection gains for protein using molecular markers varied from 15.65 to 9.92%. The F_2 plants of the different populations had genetic distances regarding the recurrent genitor highly variable. It was possible to obtain similarity gains, regarding the similarity average found in the F_2 populations, varying from 12 to 16%. With the utilization of selected individuals of high protein content and genetically closer to the recurrent progenitor the number of backcrosses necessary to recover the genome of the recurrent should be smaller.

1. INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos mais importantes constituintes da dieta populacional da América Latina e da África por possuir um conteúdo protéico elevado, quando comparado aos cereais, e por apresentar grãos ricos em micronutrientes essenciais como o ferro. Esta leguminosa representa também uma importante fonte de recursos para pequenos agricultores. A América Latina é a principal região produtora de feijão do mundo e contribui com quase metade da produção mundial. O Brasil se destaca como o maior produtor e consumidor mundial de feijão comum (CIAT, 2002).

Atualmente a qualidade nutricional das sementes do feijoeiro tornou-se um objetivo importante para o melhoramento desta cultura. O aumento do teor de proteínas, da porcentagem de aminoácidos sulfurados acompanhados do decréscimo da quantidade de fatores antinutricionais são as principais características que devem ser incluídas em programas de melhoramento da qualidade nutricional do feijão (HOFFMAN *et al.*,1988; TABE *et al.*,1993; BOLLINI *et al.*,1999; ARAGÃO *et al.*,1999).

No Brasil, o consumo atual de feijão é de cerca de 16 kg/hab/ano, existindo preferências de cor, tipo de grão e qualidade culinária em algumas regiões do País. Atualmente a demanda por produtos de melhor qualidade associada às mudanças de hábito alimentar tem mostrado uma tendência para o aumento do consumo de feijão. Na safra 1998/99 a produção brasileira de feijão foi de 2,5 milhões de toneladas das quais 80% foram de cores e 20% do tipo preto. Embora fatores climáticos interfiram na produção, esta, geralmente tem sido suficiente para suprir o mercado interno, dependendo apenas de importações de feijão preto, em torno de 160 mil toneladas/ano (Embrapa - Arroz e Feijão, 2002). Segundo a FAO, em 2001 o Brasil plantou cerca de 3,5 milhões de ha de feijão e obteve uma produção de 2,4 milhões de toneladas. Na safra de 2002/03 foram plantados 4,3 milhões de ha e colhidas 3,26 milhões de toneladas (CONAB, 2002).

Até o início da década de 90 pouco se sabia a respeito da genômica do feijoeiro. GEPTS (1988) desenvolveu um mapa de ligação provisório do feijão comum utilizando marcas bioquímicas (proteínas e isoenzimas) e morfológicas. Depois disso, vários pesquisadores se dedicaram à construção de mapas genéticos para esta cultura (VALLEJOS e CHASE, 1991a, SINGH *et al.*, 1991; NODARI *et al.*, 1992; NODARI *et al.*, 1993; VALLEJOS *et al.*, 1992; FREYRE *et al.*, 1998; BRADY *et al.*, 1998; MÉTAIS *et al.*, 1998; MÉTAIS *et al.*, 2000). O mapeamento molecular passou a ser um instrumento importante no rastreamento de genes para resistência a doenças (KELLY *et al.*, 1994; YOUNG e KELLY, 1994; MCCLLEN *et al.*, 1994; MIKLAS *et al.*, 1996; HALEY *et al.*, 1993, ALZATE-MARIN *et al.*, 1997 ARRUDA *et al.*, 2000; CORRÊA *et al.*, 2000) e na identificação de locos associados a características agrônômicas como produção, componentes da produção e arquitetura das plantas (TARAN *et al.*, 2002).

Com maior conhecimento a respeito do mapeamento genético do feijoeiro, os marcadores moleculares passaram a ter importância decisiva no melhoramento desta cultura. Neste contexto, a união do método de retrocruzamentos e a seleção assistida por marcadores se destacam como opção vantajosa para introgridir características desejadas em curto período de tempo, aumentando a eficiência de seleção e reduzindo custos. As vantagens podem ser obtidas também se os marcadores forem utilizados para construir padrões de *fingerprinting* nas progênies dos cruzamentos para seleção dos indivíduos geneticamente mais similares ao genitor recorrente. Essa técnica dispensa o mapeamento prévio da característica e reduz o tempo necessário para recuperação do progenitor recorrente.

As pesquisas na área de melhoramento de feijão durante muito tempo foram voltadas para resistência a doenças, aumento de produção e arquitetura da planta. Além desses aspectos o futuro aponta para a qualidade tecnológica e nutricional como sendo pontos que devem receber mais atenção por parte dos melhoristas.

Este trabalho faz parte do programa de melhoramento de qualidade do feijoeiro desenvolvido pelo BIOAGRO/UFV em parceria com a Embrapa - Arroz e Feijão e visa o aumento do teor de proteínas na semente do feijoeiro, por meio de retrocruzamentos e seleção assistida por marcadores moleculares. Para atingir estes objetivos específicos as seguintes etapas foram realizadas:

- Realização de cruzamentos entre genótipos de alto teor de proteína com uma linhagem elite.
- Análise da concentração de proteína de cerca de 400 sementes segregantes (F_2) de cada cruzamento por método não destrutivo;
- Seleção das sementes com maior concentração de proteína de cada cruzamento (intensidade de seleção de 10%);
- Realização de *fingerprinting* das plantas F_2 selecionadas com marcadores RAPD;
- Retrocruzamentos de todas as plantas F_2 selecionadas com o genitor recorrente;
- Confirmação da concentração de proteína pelo método Kjeldahl das sementes $F_{2:3}$;
- Seleção das plantas RC_1F_1 com base nos resultados de distância genética determinada com marcadores moleculares e na concentração de proteína das plantas F_2 selecionadas e confirmadas na geração $F_{2:3}$.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. IMPORTÂNCIA SÓCIA - ECONÔMICA DO FEIJÃO COMUM

O feijão constitui um dos poucos alimentos ricos tanto em carboidratos (60%) quanto em proteínas (20 a 30%); além de lipídios e sais minerais. A alta concentração desses componentes deve-se, principalmente, ao baixo conteúdo de água das sementes (10 a 15%), pois a testa atua como uma camada impermeável (VIERA *et al.*, 1998).

Atualmente, percebe-se uma tendência de aumento do consumo do feijão até mesmo em países onde, até então, seu uso ocorria em níveis baixíssimos. Isso se deve às suas propriedades recentemente descobertas. Observa-se que o feijão vem ganhando expressão não só como alimento protéico, mas também, em razão dos conhecimentos mais recentes das suas qualidades terapêuticas, dentre as quais se cita a sua capacidade de reduzir os níveis de colesterol sanguíneo (CHIARADIA e GOMES, 1997).

Na Figura 1 são apresentados os dados de produção e consumo de feijão no Brasil nos últimos anos. Observa-se uma tendência geral de aumento de ambos, com um momento atípico de queda na safra 2000/2001.

O consumo de feijão está diretamente relacionado com o volume colhido no ano, pois o produto deve ser comercializado no mercado interno logo após a sua colheita e, preferencialmente, dentro da safra, pois é muito sensível ao escurecimento rápido do tegumento provocado pelo envelhecimento, o que deprecia o seu valor comercial. Quando armazenado por mais de dois meses, sobretudo os cultivares de tipo “carioca”, os grãos sofrem mudanças na coloração e passam a ser menos aceitos e de difícil cocção (YOKOYAMA, 2002).

Quanto ao tipo, o feijão carioca domina o mercado, mas existem nichos de mercados para outros tipos de feijão. Pode-se dizer ainda, que os consumidores de renda mais alta têm claramente suas preferências por outros

tipos de feijão, criando um mercado para feijões com qualidades especiais, como por exemplo, com maior teor de fibra, ou mesmo para produtos industrializados (YOKOYAMA, 2002).

O Brasil é o primeiro produtor mundial de feijoeiros do gênero *Phaseolus*. A importância dessa produção deve-se ao fato de que o feijão, além de constituir um dos alimentos básicos da população brasileira é um dos principais produtos fornecedores de proteína na dieta alimentar dos estratos sociais economicamente menos favorecidos (EMBRAPA, 2002).

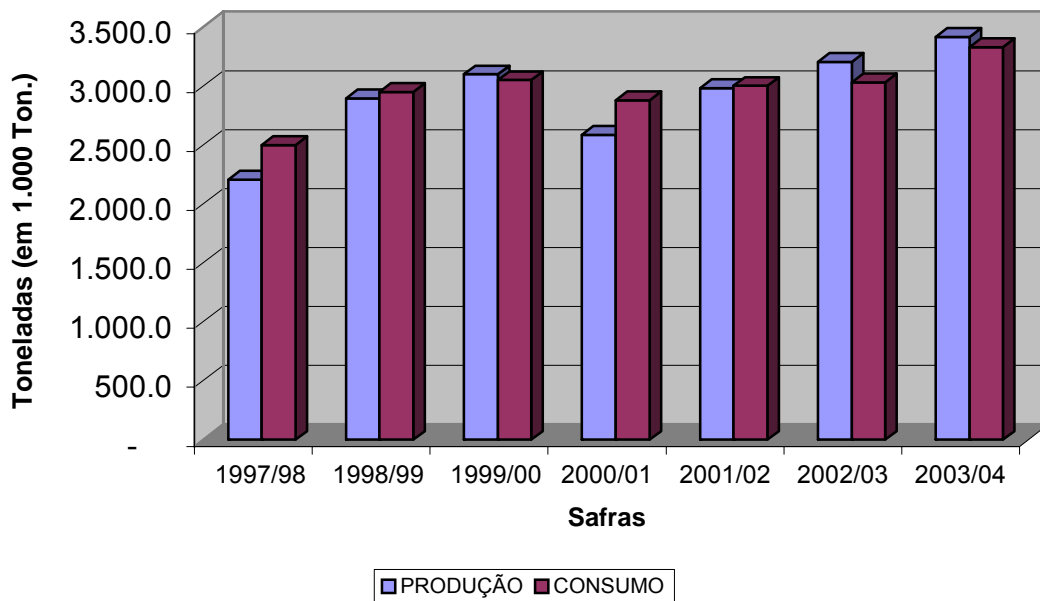


Figura 1: Produção e consumo de feijão no Brasil entre os anos 1997 e 2004.

Fonte: CONAB (Atualizado em 09/12/03)

O feijão tem ampla adaptação edafoclimática o que permite seu cultivo durante todo o ano, em quase todos os estados da federação, possibilitando constante oferta do produto no mercado. Outra característica desta leguminosa é possibilitar a sua produção em diversos ecossistemas tropicais e temperados, em monocultivo e/ou consorciado nos mais variados arranjos de plantas inter e

intra-específicos, o que favorece a diversificação na produção, mas limita uma maior integração na sua cadeia produtiva (EMBRAPA, 2002).

Considerando a diversidade fisiográfica do país e a adaptação do feijoeiro a diversas condições de clima e solo, é possível explorar a cultura em três épocas diferentes, no mesmo ano. A safra "das águas", cujo plantio é feito de agosto a novembro, com predominância na Região Sul; o plantio "da seca" realizado de janeiro a março, abrangendo a maioria dos estados produtores e "de inverno", de abril a julho, realizada nas Regiões Centro-Oeste e Sudeste (EMBRAPA, 2002). Embora esses períodos possam apresentar variações ano a ano, pode-se verificar que existe colheita praticamente durante todo ano, e que existe sobreposição de épocas em algumas regiões (FERREIRA *et al.*, 2002).

Segundo dados do IBGE, em 2001 foram plantados 2,1 milhões de ha de feijão na primeira safra, as quais produziram 1,2 milhões de toneladas do grão. Na segunda safra foram plantados 1,2 milhões de ha e colhidos 0,9 milhões de toneladas, e na terceira safra, dos 168,2 mil ha plantados foram colhidas 318,3 mil toneladas de feijão.

A cultura do feijoeiro obteve crescimento no Brasil na safra 2002/2003 em relação à safra 2001/2002 (considerando 1^a, 2^a e 3^a safra) tanto em área plantada, como em produção e produtividade. Este crescimento foi de 1,6; 9,3 e 7,4%, respectivamente (CONAB, levantamento AGO/2003).

Apesar da forte concorrência de produtos mais voltados para o mercado externo, o feijão continua numa posição de destaque no agronegócio brasileiro. No período de 1990 a 2002 o feijão, respondeu por 5,2% da renda agrícola total, sendo o oitavo produto em renda, ficando atrás da soja (17,1%), milho (13,9%), cana-de-açúcar (13,5%), café (8,1%), laranja (7,4%), banana (7,08%) e arroz (7,05%). No período de 1994 a 2001 o Brasil teve em relação ao feijão apresentou um PIB médio de 4,2 milhões de reais, o que representa cerca de 0,39% do PIB nacional (FERREIRA *et al.*, 2002).

A tendência nos últimos anos é a comercialização do feijão nos supermercados em detrimento das lojas tradicionais – padarias, armazéns e mercearias. Como conseqüências disso, os varejistas modernizaram seus

pontos de vendas, induziram os fornecedores a criarem alternativas de apresentação do produto e, sobretudo, passaram a oferecer produtos com melhor qualidade. O impacto direto dessa mudança sobre a cadeia produtiva do feijão é a exigência por matéria-prima de melhor qualidade (FERREIRA *et al.*, 2002).

A ação conjunta do melhoramento genético e da engenharia de alimentos visando agregar valor ao grão, melhorando as qualidades funcionais e nutricionais do feijão é uma forte tendência no mercado para os próximos anos.

2.2 MELHORAMENTO DO FEIJÃO COMUM

Diversas instituições internacionais dedicam-se ao melhoramento do feijão comum. Dentre elas podemos destacar o CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) na Colômbia. Vários projetos são desenvolvidos como o Bean/Cowpea Collaborative Research Support Program (B/C CRSP), uma união de instituições dos Estados Unidos, América Latina e África; e o Phaseomics um consórcio internacional formado por vários países inclusive o Brasil (BEAN/COWPEA CRSP- <http://eastafriacrsp.wsu.edu/>, 2003; BROUGHTON *et al.*, 2003).

No Brasil os programas de melhoramento do feijoeiro são conduzidos, principalmente, por instituições públicas como Universidades e a Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Estes programas têm visado, sobretudo o aumento da capacidade de produzir sementes e a resistência às doenças. Outros objetivos, entretanto, têm recebido atenção, como resistência à seca, criação de cultivares apropriado à colheita mecanizada, adaptação a solos pobres e ácidos, resistência a pragas, adaptação ao cultivo consorciado, qualidade das sementes e fixação simbiótica de nitrogênio (BORÉM, 1999).

Atualmente o melhoramento visando resistência a doenças tem sido uma das linhas de pesquisa mais bem sucedidas em feijão e vários trabalhos têm

sido desenvolvidos nesta área (ALZATE-MARIN *et al.*, 1997; CARVALHO *et al.*, 1998; FALEIRO *et al.*, 2000).

A grande maioria dos caracteres de importância no melhoramento do feijoeiro, como porte de planta, ciclo da cultura, tolerância a alguns patógenos e, principalmente, a produção de grãos e os seus componentes primários, são caracteres quantitativos. A ampla variação da expressão fenotípica encontrada em populações segregantes é devida a diferenças genotípicas e de ambiente. É fundamental conhecer quanto da variação existente é devida a causas genéticas e de ambiente, porque isto possibilita prever o resultado de seleção, e, também, optar com maior segurança pelo método de melhoramento mais adequado (RAMALHO *et al.*, 1993).

A herdabilidade de um caráter é um dos mais importantes parâmetros genéticos, suas estimativas expressam a confiança do valor fenotípico e fazem parte da maioria das expressões empregadas no melhoramento genético, principalmente na predição de ganhos genéticos decorrentes de seleção (CRUZ & REGAZZI, 1997). Dessa forma, diversos trabalhos de melhoramento do feijoeiro buscam estimar a herdabilidade de características agronomicamente importantes. TEIXEIRA *et al.* (1999) estudaram o controle genético da arquitetura de plantas do feijoeiro. A avaliação do porte por meio de notas individuais revelou ser de baixa eficiência. Contudo, quando se utilizaram famílias, apesar da acentuada influência do ambiente no caráter, as estimativas de herdabilidade foram consideradas altas (acima de 0,29), evidenciando a possibilidade de sucesso com a seleção, especialmente, se esta for realizada após a avaliação de algumas gerações ou ambientes.

Avaliando dois ciclos de seleção recorrente para a produção de sementes em feijão comum, SINGH *et al.* (1999) constataram que a herdabilidade para este caráter variou de 0,31 a 0,46. Para peso de sementes (100 sementes) e número de dias até a maturidade das sementes, os valores encontrados variaram de 0,75 a 0,86 e 0,50 a 0,81, respectivamente.

SCHNEIDER *et al.* (2001) estudaram a resistência ao *Fusarium*. Esta característica de herança complexa e altamente influenciada por fatores

ambientais teve herdabilidade estimada variando de 0,48 a 0,71. Resultados semelhantes foram encontrados por KOLKAMAN e KELLY (2002) que estimaram a herdabilidade para resistência ao mofo branco. Os autores encontraram valores de 0,47 a 0,82 nas diferentes populações estudadas. Para esta mesma característica, MIKLAS *et al.* (2001) encontraram valores variando de 0,65 a 0,78.

2.2.1 MELHORAMENTO DO FEIJOEIRO PARA QUALIDADE DE GRÃOS

A qualidade das sementes pode ser julgada de três maneiras: a comercial, a culinária e a nutritiva. Por qualidade comercial entende-se o tipo de grão, ou seja, cor, brilho, forma e tamanho. A qualidade culinária das sementes é tão decisiva para o futuro de uma cultivar quanto seu tipo comercial. Para uma boa aceitação, o feijão deve ser de fácil cozimento, não ser cascudo, ter bom sabor e apresentar caldo grosso e de cor atrativa. Com relação à qualidade proteica, o feijão, como outras leguminosas, é pobre em aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína). Tal deficiência não tem importância nas dietas suplementadas por alimentos que fornecem esses aminoácidos, como os cereais (BORÉM, 1999).

As mudanças na cadeia produtiva e na forma de comercialização do feijão estão gerando consumidores cada vez mais exigentes em relação a características de qualidade, fato este que torna o assunto uma preocupação crescente por parte dos melhoristas.

Atualmente diversos trabalhos têm surgido visando estudar e compreender os mecanismos de heranças de caracteres de qualidade. JACINTO-HERNANDEZ *et al.* (2003) identificaram marcadores RAPD associados à característica tempo de cozimento em feijoeiro. A herdabilidade estimada para esta característica foi 0,74. Os autores também concluíram que dois genes controlam o caráter tempo de cozimento.

SANTALLA *et al.* (1999) realizaram um estudo do comportamento de cultivares de feijoeiro comum em relação a qualidade nutricional e culinária em sistemas de cultivos consorciados com milho no norte da Espanha. Os autores não encontraram diferenças significativas para qualidades culinárias entre variedades nos diferentes sistemas de cultivo.

Com o objetivo de eliminar fatores antinutricionais da semente do feijão comum, o caráter “ausência de fitohemaglutinina” foi transferido para uma cultivar por retrocruzamento. As linhagens obtidas mantiveram a performance do genitor recorrente e a ausência desta proteína resultou em um aumento da digestibilidade total das proteínas da semente (BOLLINI, 1999).

De uma forma geral três estratégias podem ser consideradas para o melhoramento de características de qualidade de proteínas em leguminosas: interferir na regulação da expressão gênica, introdução de genes e modificação dos genes que codificam proteínas de reserva (TABE *et al.*, 1993).

Plantas transgênicas foram produzidas contendo o gene da albumina 2S (rica em metionina) da castanha do Pará numa tentativa de corrigir o nível baixo de metionina do feijão. O gene foi expresso corretamente em sementes homozigotas desde a segunda até a quinta geração. Em duas linhagens transgênicas o nível de metionina foi incrementado em 14 e 23% nas suas sementes (ARAGÃO *et al.*, 1999).

SHELLIE-DESSERT e BLISS (1991) propuseram duas estratégias de melhoramento para enfrentar o problema da correlação negativa entre produtividade e percentagem de proteína nas sementes do feijoeiro: a) seleção simultânea de ambas as características, usando um índice de seleção; e b) ênfase primeiro na seleção de famílias altamente produtivas para depois passá-las pela seleção para alto teor de proteína.

Pesquisadores da Universidade do Estado de Oregon nos Estados Unidos têm utilizado o método de retrocruzamento para a introdução de alelos que codificam variantes da proteína arcelina em cultivares de feijão africanas. Este projeto tem como meta tornar estes cultivares resistentes ao caruncho (*Zabrotes sulfascitus* e *Acanthoscelides obtectus*), pois, esta proteína é

responsável por tal resistência (BEAN/COWPEA CRSP-
<http://eastafriacrsp.wsu.edu/>, 2003).

2.3. PROTEÍNAS DA SEMENTE DO FEIJOEIRO

A maioria dos cultivares de feijões utilizados no Brasil apresenta de 20 a 25% de proteína, contudo, existem alguns cultivares não comerciais com teores de proteína acima de 30%, que podem ser utilizados como genitores em programas de melhoramento, visando desenvolver cultivares com maior qualidade nutricional (VIEIRA *et al.*, 1998). Alguns trabalhos indicam que a porcentagem de proteína das sementes do feijoeiro varia entre 16 e 33% para vários tipos de feijão analisados (OSBORN, 1988).

As proteínas do feijão são ricas em lisina, complementando as proteínas dos cereais, como arroz ou milho, que são deficientes neste aminoácido (FERREIRA *et al.*, 2002).

Uma característica marcante das sementes de leguminosas é o seu alto conteúdo protéico. Grande parte dessas proteínas é do tipo globulina, caracterizadas por serem solúveis em soluções salinas diluídas em pH 7,0 (Wolf, 1977 citado por CHIARADIA e GOMES, 1997). As proteínas do tipo globulina, geralmente são de reserva, enquanto que as albuminas (menos abundantes nas sementes) são principalmente enzimas e proteínas ligadas ao metabolismo celular. As albuminas possuem maior valor biológico que as globulinas, pois contêm maior concentração de aminoácidos sulfurados e de lisina. As proteínas restantes, glutelinas e prolaminas, estão fortemente ligadas às organelas e membranas celulares e são pouco estudadas em leguminosas (BHATTY, 1982).

Existem evidências de que fatores ambientais tais como localização geográfica e estação do ano, podem influenciar significativamente o conteúdo protéico de feijões (Sathe *et al.*, 1984 citado por CHIARADIA e GOMES, 1997).

O controle genético do conteúdo total protéico é complexo. A variação da porcentagem de proteínas não é apenas dependente da expressão genética que controla a síntese e o acúmulo de frações específicas de proteínas, mas também, de genes que controlam outros fatores, tais como, aquisição de nutrientes, vigor da planta, maturação, tamanho da semente, síntese e acúmulo de amido na semente (OSBORN, 1988). Evidências indicam que os genes para produção de proteínas na semente do feijoeiro comum estão organizados em famílias multigênicas (VALLEJOS e CHASE, 1991b).

A faseolina é a proteína de reserva mais importante de *Phaseolus vulgaris* e representa cerca de 49% do nitrogênio total das sementes (Ma e Bliss, 1978 citados por KAMI e GEPTS, 1994). A fitohemaglutinina (PHA) é a segunda mais abundante (6 – 12%) nas sementes do feijoeiro (OSBORN, 1988).

Segundo CHIARADIA e GOMES (1997), uma importante característica da composição de diversas proteínas de feijão, incluindo a faseolina, é que elas são glicoproteínas. A faseolina contém 37,6% de aminoácidos ácidos e amidas, cerca de 1% de resíduos de aminoácidos contendo enxofre e é glicosilada, contendo entre 3 e 5 % de açúcares (Sun e Hall, 1975 citados por CHIARADIA e GOMES, 1997). Ela é a maior fonte de metionina utilizável na semente, embora seu conteúdo desse aminoácido seja pequeno (CHIARADIA e GOMES, 1997).

Análises eletroforéticas uni e bidimensionais mostraram três tipos principais de faseolina entre cultivares de feijão: “S” (Sanilac), “T” (Tendergreen) e “C” (Contender) (GEPTS *et al.*, 1986). O tipo de faseolina mais estudado é o “T” que contém três grandes subunidades (a, b e d), com diferentes pesos moleculares (OSBORN, 1988). Nota-se também que as três classes de faseolina são estruturalmente similares e parecem ser codificadas por uma família multigênica pequena e conservada (TALBOT *et al.*, 1984).

No Brasil predominam cultivares com faseolina tipo “S”, sendo que estes feijões distribuem-se quase uniformemente nas diversas regiões do País. Os

feijões com faseolina tipo “T” apresentam tamanho de grão superior ao dos feijões com tipo “S” de faseolina (PEREIRA e SOUZA, 1992).

KAMI e GEPTS (1994) compararam as seqüências dos tipos de faseolina “S” e “T” e concluíram que as seqüências de α -faseolina nos dois tipos são muito similares, o mesmo acontece com a β -faseolina. Isto sugere que a divergência entre α e β faseolinas precede a divergência entre a faseolina tipo “S” (meso-americana) e “T” (Andina).

A evolução dos genes da faseolina pode ser explicada pelos seguintes eventos: duplicação da seqüência genitora dando origem a dois genes que começaram a multiplicação da família multigênica; surgimento de seqüências repetitivas diretas de 27 pb em uma das duplicatas do gene original; aquisição de quatro pequenas mutações dentro da região codificadora dos genes; separação geográfica dos tipos “S” e “T” de faseolina; introdução de uma repetição de 15 pb no mesmo gene como as repetições de 27 pb da faseolina tipo “T”; concorrentemente com os eventos anteriores ocorreu uma expansão adicional da família multigênica por duplicação gênica (KAMI e GEPTS, 1994).

Em plantas geneticamente modificadas, a carência de faseolina induzida pode ser compensada com um concomitante aumento nas frações de outras proteínas como arcelina e fitohemaglutinina (HARTWECK e OSBORN, 1997).

Arcelina, fitohemaglutinina (PHA) e a proteína inibidora da α -amilase (α -AI) pertencem à família de proteínas relacionadas à lectina. Ambas PHA e α -AI são responsáveis pela diminuição dos valores nutricionais do grão do feijoeiro. As proteínas dessa família gênica parecem estar envolvidas em mecanismos de resistência a vertebrados e invertebrados que atacam as sementes maduras (CHRISPEELS e RAIKHEL, 1991).

OSBORN *et al.* (1986) estudaram a variação genética, o padrão de segregação e as relações de ligação da arcelina. Estes autores encontraram quatro tipos diferentes dessa proteína. Os alelos para os diferentes tipos de arcelina são herdados codominantemente e a presença de arcelina é dominante em relação à ausência. Testes de segregação revelaram um padrão monogênico de segregação em relação à presença/ausência de arcelina. O

gene que controla a proteína arcelina não está ligado aos genes que controlam a expressão da faseolina e está ligado (<0,30% de recombinação) aos genes que controlam a expressão de lectinas.

Atualmente são conhecidas sete formas alélicas de arcelina que são denominadas *arc1* a *arc7*. Cultivares comerciais não possui essas proteínas que foram, presumivelmente, excluídas pela seleção genética que ocorreu durante a domesticação (BEAN/COWPEA CRSP WEBSITE, 2003).

2.4. MARCADORES MOLECULARES RAPD

Os marcadores moleculares podem ser utilizados de várias maneiras. Dentre elas podem ser citadas a identificação de origem parental, identificação e proteção de variedades, atribuição de linhagens e grupos heteróticos, certificação de pureza genética, monitoramento de cruzamentos, estudos de diversidade genética e distância genética. Ainda, requerendo um pouco mais de tempo e investimento, podem ser utilizados na construção de mapas genéticos e seleção assistida por marcadores (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

PCR com *primers* arbitrários (AP-PCR) e polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) são essencialmente a mesma técnica. A maioria dos cientistas da área usa a sigla RAPD mais freqüentemente (OVESNÁ *et al.*, 2002). RAPD é um método baseado na amplificação seletiva de seqüências que são flanqueadas por seqüências adequadas para um *primer* arbitrariamente escolhido. Na reação de PCR usando *primers* arbitrários a síntese é iniciada com baixas condições de stringência. Essa técnica é utilizada para mapeamento genético, taxonomia, filogenética e para detecção de mutações. Esse método pode ser utilizado ainda para detectar marcas polimórficas dominantes em experimentos de mapeamento (WELSH *et al.*, 1994). O RAPD tem a desvantagem de ser um marcador dominante, mas a quantidade reduzida de informação de cada loco pode ser compensada pela análise de um grande número de locos (CRUZAN, 1998).

Em diferentes espécies, dados experimentais evidenciam que locos RAPD estão dispersos no genoma. As seqüências internas dos segmentos amplificados abrangem desde cópia única até altamente repetitivas (WILLIAMS *et al.*, 1993).

Marcadores RAPD são muito utilizados na SAM (seleção assistida por marcadores) porque são ferramentas simples, rápidas e de baixo custo, não requerem isótopos radioativos, e podem ser usados para analisar um grande número de amostras (ZHANG e STOMMEL, 2001).

SKROCH *et al.* (1998) fizeram uso de marcadores moleculares RAPD para analisar a diversidade da coleção de germoplasma do CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). ABDELNOOR *et al.* (1995) analisaram a diversidade genética em germoplasma de soja brasileiro. MARTINS FILHO *et al.* (2002) identificaram marcas RAPD ligadas ao gene de resistência à doença causada pelo fungo *Cercospora sojina* em soja (*Glycine max* (L.) Merrill). A técnica RAPD também tem sido aplicada com sucesso na identificação de cultivares de leguminosas, entre elas, cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) (WEDER 2002a; WEDER, 2002b). ILBI (2003) utilizou RAPD para a identificação de variedades e em testes de pureza genética em pimenta (*Capsicum annum*).

Na cultura do feijoeiro a técnica do RAPD tem sido mais utilizada em programas de melhoramento para estudos de diversidade genética (VASCONCELOS *et al.*, 1996; DUARTE *et al.*, 1999, ALZATE-MARIN, *et al.*, 2003, EMYGDIO *et al.*, 2003) e no mapeamento de genes de resistência a doenças (HALEY *et al.*, 1993; YOUNG *et al.*, 1994; MIKLAS *et al.*, 1996; FERREIRA *et al.*, 1999; NIETSCHKE *et al.*, 2000; KELLY *et al.*, 2003; CRAMER *et al.*, 2003).

2.4.1. DNA FINGERPRINTING USANDO PRIMERS ARBITRÁRIOS

Cada indivíduo possui uma seqüência característica de nucleotídeos que compõe o seu DNA. A detecção de diferenças entre essas seqüências, através

de polimorfismo de fragmento de DNA, revela um padrão único, uma impressão digital genética (“*genetic fingerprinting*”) que pode ser utilizada na identificação de indivíduos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). O “DNA fingerprinting” pode ser utilizado em várias aplicações como na determinação da pureza genética de sementes, na proteção de variedades melhoradas, em estudos de parentesco e no diagnóstico genético (KUMAR, 1999).

A pureza do DNA utilizado nesse tipo de reação é muito importante. Em geral, quando a qualidade do DNA é baixa, dificuldades aparecem na geração de *fingerprinting* reprodutíveis. A concentração do *primer* também afeta a qualidade do *fingerprinting*. A concentração ótima de um *primer* depende da seqüência do mesmo e, freqüentemente, de como ocorreu a sua preparação. Por isso é necessário determinar, empiricamente, a melhor concentração de cada *primer* ou investigar aqueles que funcionam melhor para uma única concentração (WELSH *et al.*, 1994).

HILLEL *et al.* (1990) propuseram a utilização da técnica de DNA *fingerprinting* em programas de melhoramento para introgressão de genes selecionando indivíduos que apresentam maior similaridade em relação ao genitor recorrente e menor similaridade em relação ao doador. Os autores argumentaram, com base em trabalhos anteriores, que com o uso desta técnica, o número de gerações de retrocruzamentos pode ser reduzido.

Neste sentido, FALEIRO *et al.* (2001) utilizaram a técnica de *fingerprinting* para desenvolver linhagens de feijão comum resistentes à ferrugem e antracnose por retrocruzamentos assistidos por marcadores. Os autores concluíram que esta estratégia de melhoramento diminuiu consideravelmente o tempo requerido para a recuperação do genoma do genitor recorrente permitindo a rápida piramidação de genes de resistência em um cultivar comercial de feijoeiro.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNOOR, R. V., BARROS, E. G. de, MOREIRA, M. A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, v.18, p. 265-273, 1995.

ALZATE-MARIN, A. L., COSTA, M. R., SARTORATO, A., PELOSO, M. J. DEL, BARROS, E. G. MOREIRA, M. A. Genetic variability and pedigree analysis of Brazilian common bean elite genotypes. **Scientia Agricola**, vol. 60, n.2, p.283-290, 2003.

ALZATE-MARIN, A.L., CARVALHO, G.A., MENARIM, H., BAIA, G.S. PAULA JUNIOR T.J. BARROS, E.G., MOREIRA. M. A. Identification of RAPD markers associated with resistance to anthracnose in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 40 p. 130 -131, 1997.

ARAGÃO, F. J. L., BARROS, L.M. G., SOUSA, M. V., SÁ, M. F. G., ALMEIDA, E. R. P., GANDER, E .S., RECH, E. L. Expression of a methionine-rich storage albumin from the brazil nut (*Bertholletia excelta* H. B. K., lecythiaceae) in transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L., fabaceae). **Genetics and Molecular Biology**, vol. 22. n.3, p. 445-449, 1999.

ARRUDA, M. C. C., ALZATE-MARIN, A. L., CHAGAS, J. M., ., MOREIRA, M. A., BARROS, E .G. Identification of random amplified polymorphic DNA markers linked to the *Co-4* resistance gene to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopathology**, v.90, p. 758-761, 2000.

BATTHY, R. S. Albumin proteins of eight edible grain legume species: electrophoretic patterns and amino acid composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, p. 620-622, 1982..

BEAN/COWPEA CRSP Website <http://eastafricacrsp.wsu.edu/>, dez, 2003.

BOLLINI, R., CARNOVALE, E., CAMPION, B. Removal of antinutritional factors from bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. **Biotechnology. Agronomy. Environment.**, v. 3, n. 4, p. 217-219,1999.

BORÉM, A . (ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV,1999.

BROUGHTON, W. J., HERNÁNDEZ, G., BLAIR, M., BEEBE, S., GEPTS, P., VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil**, v. 252, p. 55-128, 2003.

CARVALHO, G.A., PAULA JUNIOR, T.J., ALZATE-MARIN, A.L., NIETSCHE, S., BARROS, E.G., MOREIRA. M. A. Herança da resistência da linhagem AND-277 de feijoeiro-comum à raça 63-23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, n.4, p.482-485, 1998.

CHIARADIA, A. C. N., GOMES, J. C. **Feijão: química, nutrição e tecnologia**. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes. 1997. 180 p.

CHRISPEELS, M. J., RAIKHEL, N.V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. **Plant Cell**, v. 3, p. 1-9, 1991

CIAT – www.ciat.org, set/2002.

CONAB- www.conab.gov.br, dez/2002; dez/2003.

CORRÊA, R. X., COSTA, M. R., GOOD-GOOD, P. I., RAGAGNIN, V. A., FALEIRO, F. G., MOREIRA, M. A., BARROS, E. G. Sequence characterized amplified regions linked to rust resistance genes in the common bean. **Crop Science**, v. 40, p. 804-807, 2000.

CRAMER, R. A., BYRNE, P. F., BRICK, M. A., PANELLA, L., WICKLIFFE, E., SCHWARTZ, H. F. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from common bean and sugar beet using pathogenicity assays and random amplified polymorphic DNA markers. **Journal of Phytopathology**, v. 151, n.6; p.352-360, 2003.

CRUZ, C. D., REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2^a. ed. Viçosa, MG:UFV, 1997. 390p.

CRUZAN, M. B. Genetic markers in plant evolutionary ecology. **Ecology**, (www.findarticles.com). 1998.

DUARTE, J. M., SANTOS, J. B., MELO, L. C. Genetic divergence among common bean cultivars from different races based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, vol.22. n.3, p. 419-426, 1999.

DUDLEY, J. W. Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. **Crop Science**, v. 33, p. 660-668, 1993.

EMBRAPA - www.cnpaf.embrapa.br, set/2002.

EMYGDIO, B. M., ANTUNES, I. F. NEDEL, J.L. CHOER, E. Diversidade genética em cultivares locais e comerciais de feijão baseada em marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.10, p.1165-1171, 2003.

FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., CARVALHO, G. A., PAULA J.,T. J., MOREIRA, M.A., & BARROS, E.G. Development of common bean lines resistant to rust and anthracnose by molecular marker- assisted backcrossing. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 44, p. 109 -110, 2001.

FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., CORRÊA, R.X., VINHADELLI, W.S., MOREIRA, M.A., & BARROS, E.G. Ligação gênica da resistência à ferrugem e à antracnose na variedade de feijão Ouro Negro. **Revista Ceres**, v. 47, p. 375-382. 2000.

FERREIRA, C. F. BORÉM, A., CARVALHO, G. A., NIETSCHÉ, S., PAULA J, T. J., BARROS, E. G., MOREIRA, M. A. Identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência à raça 63.39 da mancha-angular do feijoeiro. **Bragantia**, v.58, n.2; p. 247-252, 1999.

FERREIRA, C. M., DEL PELOSO, M. J., FARIA, L. C. **Feijão na economia nacional**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2002. 47p. (documentos/EMBRAPA Arroz e feijão,135).

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

FREIRE, R., SKROCH, P. W., GEFFROY, V., ADAM-BLONDON, A. F., SHIRMOHAMADALI, A., JOHNSON, W. C., LLACA, V., NODARI, R. O., PEREIRA, P. A., TSAI, S. M., TOHME, J., DRON, M., NIENHUIS, J., VALLEJOS, C. E., GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, p. 847-856, 1998.

GEPTS, P. Provisional linkage map of common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 31, p. 20-25, 1988.

GEPTS, P., OSBORN, T. C., RASHKA, K., BLISS, F. A. Phaseolin protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. **Economic Botany**, v. 40. p. 451-468, 1986.

HALEY, S. D., MIKLAS, P. N., STAVELY, J. R., BYUM, J., KELLY, J. D. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p. 505-512, 1993.

HARTWECK, L. M., OSBORN, T. C. Altering protein composition by genetically removing phaseolin from common bean seeds containing arcelin or phytohemagglutinin. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p. 1012-1017, 1997.

HILLEL, J., SCHAAP, T., HABERFELD, A., JEFFREYS, A. J., PLOTZKY, Y., CAHANER, A., LAVI, U. DNA fingerprints applied to gene introgression in breeding programs. **Genetics**, v. 124, p. 783 – 789, 1990.

HOFFMAN, L. M., DONALDSON, D. D., HERMAN, E. M. A modified storage protein is synthesized, processed, and degraded in the seeds of transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, v.11, p.717-729, 1988.

ILBI, H. RAPD markers assisted varietal identification and genetic purity test in pepper, *Capsicum annuum*. **Scientia Horticulturae**, v. 97, p. 211-218, 2003.

JACINTO-HERNANDEZ, C., AZPIROZ-RIVERO, S., ACOSTA-GALLEGOS, J. A., HERNANDES-SANCHEZ, H., BERNAL-LUGO, I. Genetic analysis and

random amplified polymorphic DNA markers associated with cooking time in common bean. **Crop Science**, v. 43, p. 329-332,2003.

KAMI, J. A., GEPTS, P. Phaseolin nucleotide sequence diversity in *Phaseolus*. I. Intraspecific diversity in *Phaseolus vulgaris*. **Genome**, v. 37, p. 751-757,1994.

KELLY, J. D., HALEY, S. D., AFANADOR, L., MIKLAS, P. N., STAVELY, J. R. Application of RAPD markers for disease resistance breeding in beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 37, p. 15-16, 1994.

KOLKAMAN, J. M., KELLY, J. D. Agronomic traits affecting resistance to white mold in common bean. **Crop Science**, v. 42, p. 693-699, 2002.

MARTINS FILHO, S., SEDIYAMA, C. S., MOREIRA, M. A., DE BARROS, E. G. RAPD and SCAR markers linked to resistance to frog-eye leaf spot in soybean. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, p.317-321, 2002.

MÉTAIS, I., AUBRY, C., HAMON, B., JALOUZOT, R., PELTIER, D. Description and analysis of genetic diversity between commercial bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, p. 1207-1214, 2000.

MÉTAIS, I., AUBRY, C., HAMON, B., PELTIER, D., JALOUZOT, R. Cloning, quantification and characterization of a minisatellite DNA sequence from common bean *Phaseolus vulgaris* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v.97, p. 232-237, 1998.

MIKLAS, P. N., AFANADOR, L., KELLY, J. D. Recombination-facilitated RAPD marker-assisted selection for disease resistance in common bean. **Crop Science**, v. 36, p. 86-90, 1996.

NIETSCHÉ, S., BORÉM, A., CARVALHO, G. A., ROCHA, R. C., PAULAJ, T. J., BARROS, E. G., MOREIRA, M. A. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. **Journal of Phytopathology**, v. 148, p.117-121, 2000.

NODARI, R. O., KOINANGE, E. M. K., KELLY, J.D., GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 84, p. 186-192, 1992.

NODARI, R. O., TSAI, S. M., GILBERTSON, R. L., GEPTS, P. Towards an integrated map of common bean. 2. Development of an RFLP-based linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, p. 513-520, 1993.

OSBORN, T. C., BURROW, M., BLISS, F. A. Purification and characterization of arcelin seed protein from common beans. **Plant Physiology**, v. 86 p. 399, 1988.

OVESNÁ, J., POLÁKOVÁ, K., LEISOVÁ, L. DNA analyses their applications in plant breeding. **Czech Journal of Genetic and. Plant breed**, v. 38, p. 29-40, 2002.

PEREIRA, P. A. A., SOUZA, C. R. B. Tipos de faseolina em raças “crioulas” de feijão no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p. 1219-1221, 1992.

RAMALHO, M. A. P., SANTOS, J. B., ZIMMERMANN, M, J. O. **Genética quantitativa em plantas autógamas; aplicações no melhoramento do feijoeiro**. Goiânia: Editora da UFG, 1993. 271p.

SANTALLA, M., FUEYO, M. A., RODINO, A. P., MONTERO, I., RON, A. M. Breeding for culinary and nutritional quality of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in intercropping systems with maize (*Zea mays* L.). **Biotechnology. Agronomy. Environment** v.3, n.4, p. 225-229, 1999.

SCHNEIDER, K. A., GRAFTON, K. F., KELLY, J. D. QTL analysis of resistance to fusarium root rot in bean. **Crop Science**, v. 41, p. 535-542, 2001.

SHELLIE-DESSERT, K. C., BLISS, F. A. Genetic improvement of quality factors. In. van Schoonhoven, A. e Voysest, O. (eds.). **Common bean: research for crop improvement**. Wallingford, CAB International, p. 649-677, 1991.

SINGH, S. P., GUTIÉRREZ, J. A., MOLINA, A., URREA, C., GEPTS, P. Genetic diversity in common bean: 2. Marker-based analysis of morphological and agronomic traits. **Crop Science**, v. 31, p. 23-29, 1991.

SINGH, S. P., OZ, H. N, TAKEGAMI, J. C. Two cycles of recurrent selection for seed yield in common bean. **Crop Science**, v. 39, p. 391-397, 1999.

TABE, L. M. HIGGINS, MCNABB, W. C., HIGGINS, T. J. V. Genetic engineering of grain and pasture legumes for improved nutritive value. **Genetika**, v.90, p. 181-200, 1993.

TALBOT, D. R., ADANG, M. J., SLIGHTOM, J. L., HALL, T. C. Size and organization of a multigene family encoding phaseolin, the major seed storage protein of *Phaseolus vulgaris* L. **Molecular General Genetic**, v. 198, p. 42-49, 1984.

TAR'AN, B., MICHAELS, T. E, PAULS, K. P. Genetic mapping of agronomic traits in common bean. **Crop Science**, v. 42, p. 544-556, 2002.

TEIXEIRA, F. F., RAMALHO, M. A. P., ABREU, A. F. B. Genetic control of architecture in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Genetic and Molecular Biology**, v. 22, n.4, p. 577-582, 1999.

VALLEJOS, C. E., CHASE, C. D. Linkage between isozyme markers and a locus affecting seed size in *Phaseolus vulgaris* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 81, p.413-419, 1991a.

VALLEJOS, C. E., SAKIYAA, N. S., CHASE, C. D. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. **Genetics**, v. 131, p. 733-740, 1992.

VASCONCELOS, M., J., V., BARROS, E. G. MOREIRA, M. A., VIEIRA, C. Genetic diversity of the bean *Phaseolus vulgaris* L. determined by DNA- based molecular markers. **Brazilian journal of Genetics**, v. 19, n.3, p. 447-451, 1996

VIEIRA, C., PAULA Jr, T. J., BORÉM, A. (Eds.). **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais**. Viçosa: Editora UFV. 1998. 596p.

WEDER, J. K. P. Identification of food and feed legumes by RAPD-PCR. **Lebensm. - Wiss. U. – Technology.**, v. 35, p.504-511, 2002.

WEDER, J. K. P. Species identification of peas and other legumes by RAPD-PCR after DNA isolation using membrane columns. **Lebensm. - Wiss. U. – Technology.**, v. 35, p. 277-283, 2002.

WELSH, J., RALPH, D., MCCLELLAND, M. DNA and RNA fingerprinting using arbitrarily primed PCR. **PCR Protocols**, 2^a Ed., J. J. Sninski *et. al.*, Eds., 1994.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, A. e TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Eynshan, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WILLIAMS, J.G.K., RAFALSKI, A., TINGEY, S.V. Genetic analysis using RAPD markers. **Methods of Enzymology**, v.218, p. 704-740, 1993.

YOKOYAMA, L. P. O feijão no Brasil no período de 1984/85 a 1999/2000: aspectos conjunturais. In: VII Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão. Viçosa/MG, 2002. **Anais...** Viçosa/MG, 2002. p. 654.

YOUNG, R. A., KELLY, J. D. A RAPD marker for the anthracnose resistance gene in beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 37, p. 77-78, 1994.

ZHANG, Y., STOMMEL, J. R. Development of SCAR and CAPS markers linked to the *beta* gene in tomato. **Crop Science**, v. 41, p. 1602-1608, 2001.

CAPÍTULO 1

EFICIÊNCIA DE SELEÇÃO PARA ALTO TEOR DE PROTEÍNA EM FEIJÃO

RESUMO

O feijão, como as demais leguminosas de grãos, contribui substancialmente para o conteúdo protéico das dietas de grande parte da população mundial, especialmente, em regiões onde o consumo de proteína animal é relativamente pequeno, em razão da escassez, do custo ou de tabus culturais. O método do retrocruzamento é considerado promissor para a introdução de elevados teores de proteína em cultivares elites de feijão. A utilização de métodos de análise não destrutivos permite que as sementes analisadas ainda possam ser cultivadas. Desta forma, é possível realizar seleção em gerações precoces. Associando-se a isto a seleção de indivíduos geneticamente mais próximos do genitor recorrente, é possível reduzir o número de retrocruzamentos necessários para obter a recuperação do genoma dos mesmos. Este trabalho teve como objetivo realizar seleção na geração F_2 em um programa de retrocruzamento para incremento do teor de proteína em feijão. Para isso, foi utilizada a micro-análise não destrutiva de sementes para selecionar aquelas com elevado teor de proteína. Foram utilizados os cultivares Baliza, Laranja, Gaurama e PVA 109 como fontes doadoras de genes para alto teor de proteína e a linhagem CNFC 7827 como genitor recorrente. Sementes F_2 com alta concentração de proteína, quantificada pelo método do ácido bicinconínico, foram selecionadas e plantadas em casa de vegetação. As concentrações de proteína das sementes $F_{2:3}$ foram determinadas pelo método Kjeldahl, para a quantificação de nitrogênio total. A concentração de proteína das sementes F_2 individuais, determinada pela micro-análise, apresentou distribuição aproximadamente normal. Em geral, as concentrações de proteína nas gerações F_2 foram intermediárias entre os genitores doadores e o recorrente, uma vez que como doadores foram usados genitores com elevados teores de proteína e o recorrente apresenta teor de proteína normal em suas sementes. Todas as populações tiveram herdabilidades altas variando de 58 a 77 %, o que sugere que são adequadas para se obter altos ganhos ou efetuar

estudos de mapeamento para a característica teor de proteína. Os ganhos considerando todas as progênies $F_{2:3}$ derivadas das sementes F_2 selecionadas pelo método de microanálise não destrutiva das sementes variaram de $-0,95$ a $4,26\%$ indicando que a seleção em F_2 tem baixa eficiência quando utilizada isoladamente. Entretanto, a ampla variação do teor de proteína em progênies $F_{2:3}$ e as estimativas de ganhos observados ($13,66$ a $25,84\%$ considerando as cinco progênies de maiores teores) demonstram que o processo de transferência de genes que conferem alto teor protéico por meio de retrocruzamentos é eficiente quando baseado na pré-seleção de sementes F_2 e posterior seleção das melhores famílias $F_{2:3}$. A seleção em geração F_2 com auxílio de micro análise não destrutiva foi pouco eficiente para a população derivada do cruzamento Laranja x CNFC 7827. Fatores como o efeito de dominância e interações genótipo x ambiente diferenciadas causaram dificuldades na seleção dos genótipos superiores. Em vista deste resultado, modificações no método de seleção utilizado podem ser propostas visando aumentar sua eficiência.

INTRODUÇÃO

O feijão, como as demais leguminosas em grão, contribui substancialmente para o conteúdo protéico das dietas de grande parte da população mundial, especialmente em regiões onde o consumo de proteína animal é relativamente pequeno, em razão da escassez, do custo ou de tabus culturais (CHIARADIA e GOMES, 1997).

Amido e proteína são os principais componentes do feijão, sendo este considerado uma boa fonte protéica, contribuindo com aproximadamente 28% de proteína e 12% de energia na dieta da população brasileira (DURIGAN *et al.*, 1987). Além de aumentar o teor protéico da refeição, o feijão contribui para melhorar em 50 a 70% a qualidade das proteínas da dieta. Isso ocorre porque as proteínas do feijão são ricas em lisina, complementando as proteínas dos cereais, como o arroz ou milho sabidamente deficientes nesse aminoácido (BRESSANI *et al.*, 1981).

FERREIRA *et al.* (2002) constataram que a tendência nos últimos anos para comercialização do feijão é a procura por produtos de melhor qualidade. A ação conjunta do melhoramento genético e da engenharia de alimentos visando agregar valor ao grão, melhorando as qualidades funcionais e nutricionais do feijão é uma forte tendência no mercado para os próximos anos.

Com o objetivo de aumentar o valor nutricional de sementes de leguminosas, pode-se utilizar a manipulação genética dessas proteínas, contudo, o controle do conteúdo protéico total é complexo. A variação da porcentagem de proteínas não é apenas dependente da expressão genética que controla a síntese e o acúmulo de frações específicas de proteínas, mas também, de genes que controlam outros fatores, como, aquisição de nutrientes, vigor da planta, maturação, tamanho da semente, síntese e acúmulo de amido na semente, etc. (OSBORN, 1988).

O método do retrocruzamento é considerado promissor para a introdução de elevados teores de proteína em cultivares elite de feijão. Trabalhos tradicionais de retrocruzamento, visando aumentar o teor de proteína em

sementes demandam longo tempo, pois, a seleção geralmente é feita após 2-3 ciclos de autofecundação para cada geração de retrocruzamento. O método padrão de determinação da concentração de proteína (Kjeldahl) demanda uma quantidade de tecido relativamente grande. Para utilizar este método após a primeira geração de autofecundação, é necessário destruir completamente as sementes.

A análise não destrutiva de sementes individuais permite que sejam selecionadas sementes com alto teor de proteína após a primeira geração de autofecundação. A utilização do método de determinação de proteínas pelo ácido bicinconínico (SMITH *et al.*, 1985) pode ser uma boa estratégia nesta seleção. Este método determina principalmente proteínas de reserva em sementes, e o seu resultado é expresso em termos de concentração (%) de proteína. A grande vantagem deste método, é que demanda pequena porção da semente, (cerca de 10 mg), e as sementes analisadas ainda podem ser plantadas. Associando-se a isto, a seleção de indivíduos geneticamente mais próximos do genitor recorrente, é possível reduzir o número de retrocruzamentos necessários para obter a recuperação do genoma do mesmo.

Este trabalho teve como principal objetivo estudar a eficiência da seleção em sementes na geração F_2 , por método não destrutivo, ou seja, pelo método do ácido bicinconínico (SMITH *et al.*, 1985).

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético

Foram utilizadas quatro cultivares de feijoeiro com alto teor de proteína: PVA 109, Gaurama, Baliza e Laranja como fontes doadoras da característica alto teor de proteína com o objetivo de incorporar alelos para essa característica na linhagem CNFC-7827 da Embrapa Arroz e Feijão.

O cultivar PVA 109 possui grão vermelho com venações beges e teor de proteína de aproximadamente 24% em suas sementes. Os genitores Gaurama e Baliza possuem grão do tipo preto e foram desenvolvidos pelo CEFET - Pato Branco – PR, recomendados para o Paraná e Santa Catarina. Possuem teor de proteína de, aproximadamente, 25 e 23%, respectivamente. O cultivar Laranja, também desenvolvido pelo CEFET possui grão do tipo carioca, com halo laranja em torno do hilo. Possui teor de proteína nas sementes de aproximadamente 29%. O genitor recorrente (CNFC 7827) é uma linhagem do tipo carioca, desenvolvida pela Embrapa Arroz e Feijão, possui crescimento indeterminado tipo III. Possui alto potencial produtivo, ciclo normal de 90 dias com florescimento em torno de 42 dias após a germinação e teor de proteína de 22,98%.

Foram efetuados cruzamentos entre o genitor recorrente e os doadores, obtendo-se as sementes F_1 . Todas as combinações híbridas foram autofecundadas para obter as sementes F_2 (populações segregantes). Estas etapas foram realizadas na Embrapa – Arroz e Feijão. Foram analisadas 400 sementes segregantes obtidas de cada população. As sementes F_2 foram analisadas individualmente pelo método de análise não destrutiva para concentração de proteína, que utiliza o ácido bicinconínico (BCA) (SMITH *et al.*, 1985), adaptado para análises de proteína em sementes de feijão. Com a finalidade de selecionar os genótipos F_2 com maiores teores de proteína foi utilizada uma pressão de seleção de aproximadamente 10%. Com isso, em torno de 40 sementes F_2 foram selecionadas e semeadas em casa de

vegetação obtendo-se plantas F_2 . Posteriormente foi extraído o DNA destas plantas para análises com marcadores RAPD (*fingerprinting*). Em seguida, foram escolhidas as plantas geneticamente mais próximas do genitor recorrente e realizado o primeiro retrocruzamento, obtendo-se assim as progênies RC_1F_1 .

As sementes $F_{2:3}$ foram avaliadas para confirmar a concentração de proteína das plantas selecionadas pelo método Kjeldahl.

Análise da concentração de proteína

A concentração de proteína das sementes individuais F_2 foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (BCA) (SMITH *et al.*, 1985), com pequenas modificações. De cada semente, foram tomados 10 mg de tecido do cotilédone, no lado oposto ao eixo embrionário. A porção cortada das sementes foi macerada em gral, na presença de 2 mL de SDS (*Sodium Duodecil Sulfato*) 1%. Depois de homogeneizada, esta solução foi diluída 300 vezes e três alíquotas de 100 μ L de cada tubo foram transferidas para placas de ELISA (triplicatas). A seguir, foram adicionados 200 μ L de solução de ácido bicinconínico contendo 2% de sulfato de cobre. Em cada placa, foram aplicadas também as quantidades crescentes e conhecidas 4, 8, 10 e 15 μ g de BSA (*albumina sérica bovina*), a fim de estabelecer uma curva padrão que permitisse calcular a concentração de proteína das amostras. As placas foram colocadas em banho-maria à 37°C, por 30 minutos, e após esfriar em temperatura ambiente por 20 minutos, foram feitas as leituras em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 560 nm. A concentração de proteínas foi expressa em porcentagem, constituindo a média das triplicatas.

Determinação da concentração de proteína na geração F₃ (Kjeldahl)

Para confirmar a concentração de proteínas das sementes selecionadas, foram analisadas 10 sementes F_{2:3} geradas de cada semente F₂ selecionada. Neste caso, a determinação de proteínas foi efetuada pelo método Kjeldahl para a quantificação de nitrogênio total descrito pela AOAC (1975), com modificações. Na fase de digestão, após obtenção do material digerido, adicionou-se peróxido de hidrogênio 30%, levando a mistura ao aquecimento por mais 30 minutos. Na fase de destilação, recolheu-se a amônia liberada em solução de ácido bórico 4%. Obteve-se o teor de nitrogênio pela titulação da amônia com ácido clorídrico 0,05 N. A partir do teor de nitrogênio, foi calculada a porcentagem de proteína total da amostra, empregando-se o fator 6,25. Os resultados das concentrações de proteína foram expressos em porcentagem com base na matéria seca, constituindo a média de duas repetições.

Análises genéticas

Foi estimada a herdabilidade do caráter teor de proteínas para cada uma das quatro populações F₂. Para isto, foi necessário estimar as variâncias fenotípicas, genotípicas e ambientais.

Variâncias fenotípica, genotípica e ambiental nas populações F₂

Variância fenotípica

Estimada usando-se os valores fenotípicos obtidos nas populações F₂, obtida pelo uso da seguinte expressão:

$$\hat{\sigma}_F^2 = \sum (x_i - \bar{X})^2 / n - 1$$

em que

$\hat{\sigma}_F^2$ = variância fenotípica estimada;

X = dados fenotípicos das características avaliadas em cada planta;

\bar{X} = média dos caracteres avaliados; e

n = número de plantas avaliadas.

Variância ambiental

Estimada pela média ponderada das variâncias dos pais:

$$\hat{\sigma}_E^2 = \frac{n_1\sigma^2 p_1 + n_2\sigma^2 p_2}{n_1 + n_2}$$

em que

$\hat{\sigma}_E^2$ = variância ambiental estimada;

$\hat{\sigma}_{P_1}^2$ e $\hat{\sigma}_{P_2}^2$ = variâncias fenotípicas estimadas dos genitores 1 e 2, respectivamente; e

n_1 e n_2 = número de plantas dos genitores 1 e 2, respectivamente.

Variância genotípica

Estimada pela diferença entre as estimativas da variância fenotípica e da variância ambiental, ou seja:

$$\hat{\sigma}_G^2 = \sigma_F^2 - \sigma_E^2$$

Herdabilidade nas populações F₂

As herdabilidades no sentido amplo foram estimadas segundo a expressão abaixo:

$$h_a^2 = \frac{\hat{\sigma}_G^2}{\hat{\sigma}_F^2}$$

em que

h_a^2 = estimativa da herdabilidade no sentido amplo;

$\hat{\sigma}_G^2$ = estimador da variância genotípica na população F₂; e

$\hat{\sigma}_F^2$ = estimador da variância fenotípica na população F₂.

Ganhos de seleção (%)

Os ganhos de seleção (%) no teor protéico em relação ao genitor recorrente foram obtidos considerando-se todas as famílias F_{2:3} (GS%) e também considerando apenas as cinco progênies F_{2:3} de maior teor protéico (GS5%). Para tal, foram utilizadas as seguintes expressões:

$$GS (\%) = \frac{MF3 - MP \times 100}{MP} \quad GS5 (\%) = \frac{M5F3 - MP \times 100}{MP}$$

onde:

MF3 representa o teor protéico médio das famílias F_{2:3}, derivadas das sementes F₂ selecionadas pelo método do BCA;

M5F3 representa o teor protéico médio das 5 famílias F_{2:3} de maior teor protéico;

MP representa o teor protéico médio do genitor recorrente.

Avaliação da eficiência da seleção para alto teor de proteína em F₂, pelo método do ácido bicinconínico (BCA)

Para avaliar a eficiência da seleção para teor de proteína em populações F₂ por método de análise não destrutiva em feijoeiro, foram plantadas 100 sementes F₂, não selecionadas pelo BCA, do cruzamento Laranja x CNFC 7827, para fins de comparação de suas médias de concentração de proteína em F₃ com as médias das plantas selecionadas deste cruzamento (15 plantas originadas de sementes F₂ selecionadas). Estas plantas cresceram sob as mesmas condições ambientais e tiveram suas sementes avaliadas pelo método Kjeldahl. Foi calculada a herdabilidade em F₃ para esta população. Foram efetuadas simulações de ganho de seleção na população não selecionada segundo as fórmulas de ganho de seleção apresentadas acima. Foram simuladas seleções de 20, 10 e 5 indivíduos para calcular os prováveis ganhos de seleção.

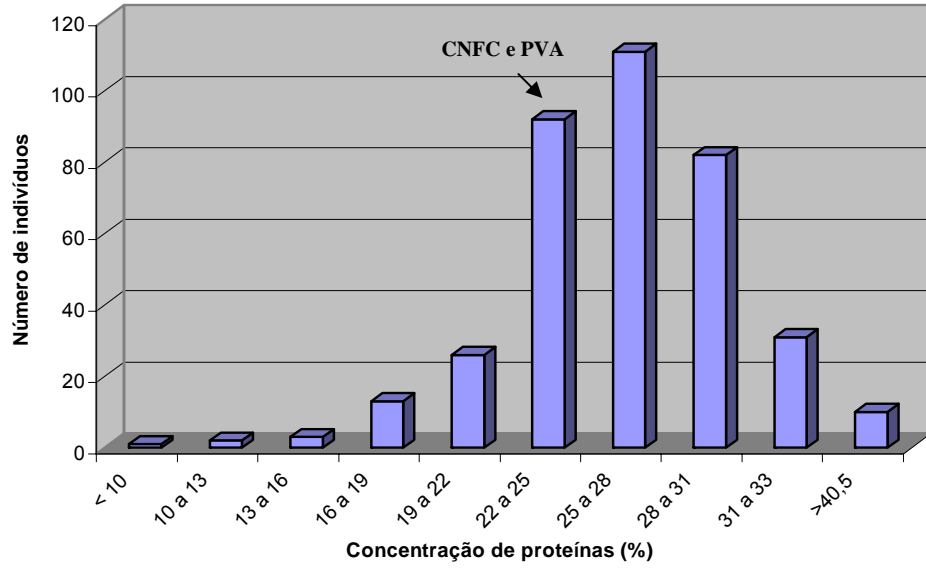
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise da concentração de proteína

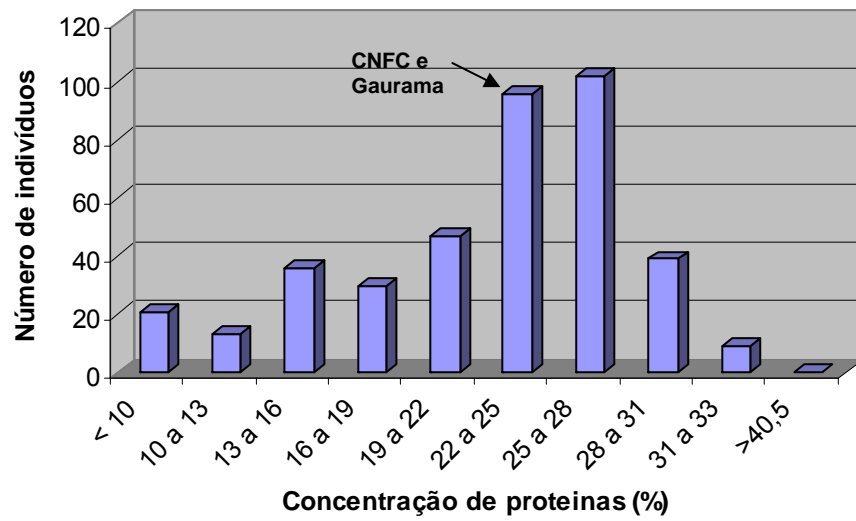
A concentração de proteína das sementes F_2 individuais, determinado pela micro-análise, apresentou distribuição aproximadamente normal (Figura 1). Em geral, os teores de proteína das gerações F_2 foram intermediários entre os genitores doadores e o recorrente, uma vez que como doadores foram utilizados genitores com elevados teores de proteína e o recorrente apresenta teor normal de proteína em suas sementes. Entretanto, existem casos de segregação transgressiva, que é mais comum quando os teores de proteína entre os genitores não são muito divergentes. Isto significa que o teor de proteína em ambos os genitores é conferido, pelo menos em parte, por genes diferentes, que foram reunidos em algumas sementes F_2 , produzindo como resultado, um genótipo superior aos genitores, no que se refere ao teor de proteína do grão.

Foram encontradas nas populações analisadas concentrações de proteína superiores as descritas na literatura para cultivares de feijão. Pires (2002) avaliou a concentração de proteínas em amostras de 11 cultivares de feijão fornecidas pela Embrapa Arroz e Feijão e encontrou uma variação de 18, 17 a 25, 93%.

PVA 109 x CNFC 7827



Gaurama x CNFC 7827



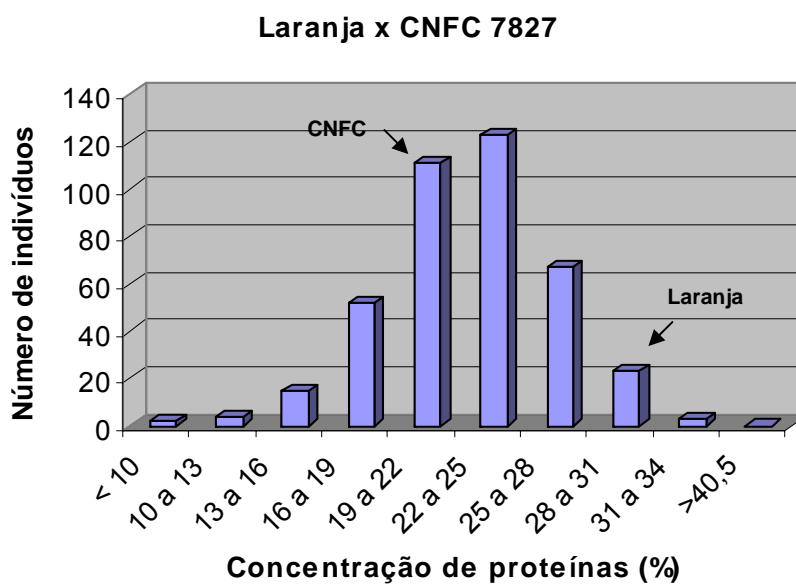
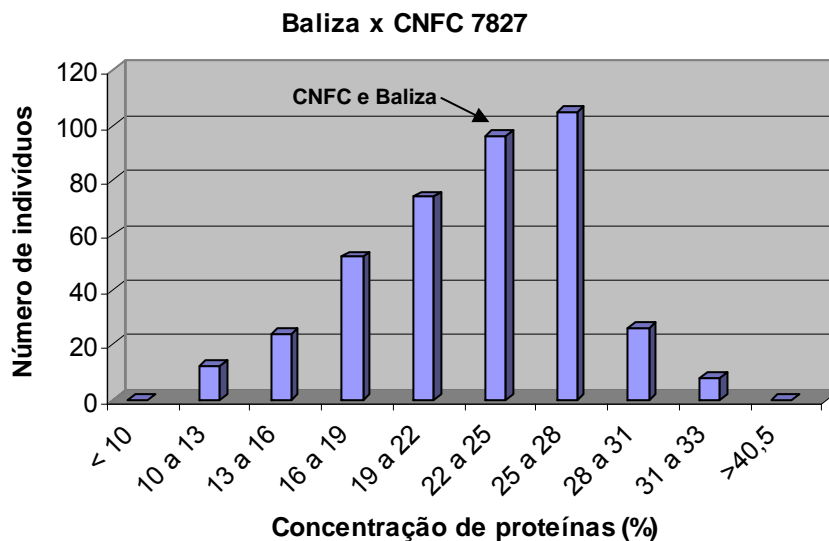


Figura 1 – Distribuição de freqüência das concentrações de proteínas em 400 sementes F₂ dos cruzamentos PVA 109 x CNFC 7827, Gaurama x CNFC 7827, Baliza x CNFC 7827 e Laranja x CNFC 7827 determinadas pelo método do ácido bicinconínico.

Análises genéticas

As estimativas de média, variância fenotípica em F_2 , variância ambiental, variância genotípica e herdabilidades no sentido amplo, são apresentadas na Tabela 1.

Nas populações em estudo o caráter teor protéico apresentou estimativas de herdabilidades que variaram de 58 a 77%. Segundo FALCONER (1987), os caracteres com estimativas de herdabilidade acima de 50% indicam que as contribuições das causas genéticas são mais pronunciadas do que as atribuídas a fatores do ambiente, na expressão fenotípica do caráter. Isto sugere que nas populações em estudo a seleção em gerações precoces deve ser eficiente.

O maior valor de herdabilidade (0,77) foi encontrado na população derivada do cruzamento Gaurama X CNFC7827. O menor valor de herdabilidade (0,58) foi encontrado na população derivado do cruzamento Baliza x CNFC7827

A obtenção de altas estimativas de herdabilidade em relação a uma determinada característica é muito importante quando se considera o mapeamento genético e a identificação de QTLs (*Quantitative Trait Loci*), uma vez que as inferências genotípicas são feitas com base no fenótipo (CHURCHILL & DOERGE, 1998). Neste trabalho todas as populações tiveram herdabilidades altas o que sugere que são adequadas para se obter altos ganhos ou efetuar estudos de mapeamento para a característica teor de proteína.

Tabela 1: Estimativas das médias, variâncias fenotípicas em F₂, variâncias ambientais, variâncias genotípicas e herdabilidades no sentido amplo, para a característica teor de proteína avaliada em quatro populações F₂, baseando-se na avaliação de sementes individuais.

Progênes F ₂	Caracteres				
	Média (%)	$\hat{\sigma}_F^2$	$\hat{\sigma}_E^2$	$\hat{\sigma}_G^2$	h_a^2
PVA109 x CNFC 7827	27,03	7,10	2,31	4,79	0,67
Gaurama x CNFC 7827	22,44	24,38	5,56	18,81	0,77
Baliza x CNFC 7827	22,64	15,92	6,65	9,27	0,58
Laranja x CNFC 7827	22,76	12,36	3,14	9,22	0,74

Ganhos de seleção (%)

A população que apresentou os maiores ganhos foi derivada do cruzamento PVA109 X CNFC 7827, com ganho geral de 4,26%; e levando-se em consideração os 5 indivíduos de maior teor de proteína o ganho foi de 25,84. A população que apresentou os menores ganhos, derivada do cruzamento Laranja X CNFC 7827, não teve ganho geral (-0,95%) mas considerando-se os cinco indivíduos de maior teor de proteína apresentou um ganho de 13,66%. Neste caso a seleção com base apenas nos teores de proteína encontrados em F₂ foi ineficiente (Tabela 2). Este fato pode ser explicado, em parte, pela influência ambiental sobre a característica teor de proteína, e pela baixa eficiência da seleção em F₂ na população derivada do cruzamento Laranja x CNFC 7827. Também, muito provavelmente, estes genitores têm capacidade específica de combinação baixa.

Tabela 2. Médias das concentrações de proteína das populações $F_{2:3}$ (MF3), médias das 5 famílias de mais alto teor (M5F3) determinados pelo método Kjeldahl, média de proteína do genitor recorrente (MP) e ganhos de seleção obtidos nas quatro populações em estudo.

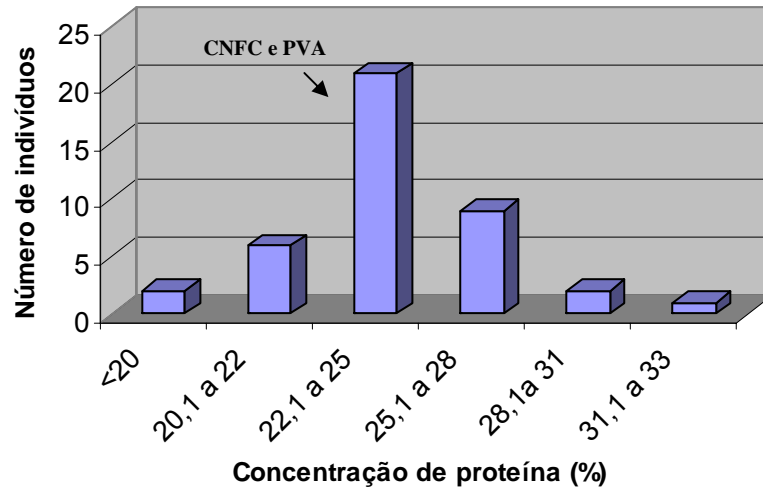
Parâmetros ¹ %	Populações			
	PVA109 x CNFC 7827	Gaurama x CNFC 7827	Baliza x CNFC 7827	Laranja x CNFC 7827
MF3	23,96	23,26	23,35	22,76
M5F3	28,92	27,22	26,81	26,12
MP	22,98	22,98	22,98	22,98
GTOTAL	4,26	1,21	1,61	-0,95
G 5	25,84	18,45	16,66	13,66

1. GTOTAL ganho de seleção considerando MF3; G5 ganho de seleção considerando M5F3.

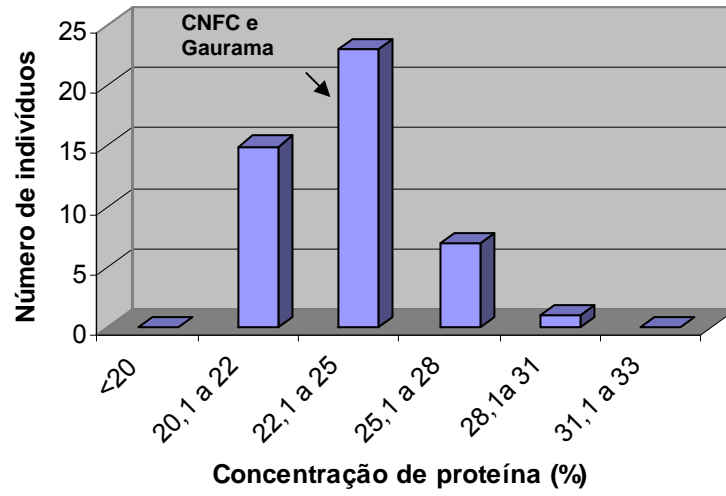
A seleção de sementes de alto teor de proteína em gerações precoces com o auxílio de micro-análises não destrutivas e posterior confirmação deste teor pelo método Kjeldahl possibilita a realização de retrocruzamentos utilizando plantas F_2 de elevado teor protéico. Com isto, aumenta-se a rapidez na obtenção de variedades de alto teor protéico, uma vez que, o método padrão de determinação da concentração de proteína (Kjeldahl) demanda uma quantidade de semente relativamente grande.

Segundo a Tabela 2, os ganhos gerais de seleção, ou seja, considerando todas as progênies $F_{2:3}$ derivadas das sementes F_2 selecionadas pelo método de micro análise não destrutiva variaram de $-0,95$ a $4,26\%$. Este resultado indica que a seleção em F_2 tem baixa eficiência quando utilizada isoladamente. Entretanto, a ampla variação do conteúdo de proteína das progênies $F_{2:3}$ (Figura 2) e as porcentagens de ganho observadas demonstram que o processo de transferência de genes para alto teor protéico por meio de retrocruzamentos é eficiente quando baseado nos teores protéicos de sementes F_2 combinado com as cinco melhores famílias $F_{2:3}$.

PVA 109 X CNFC 7827



Gaurama x CNFC 7827



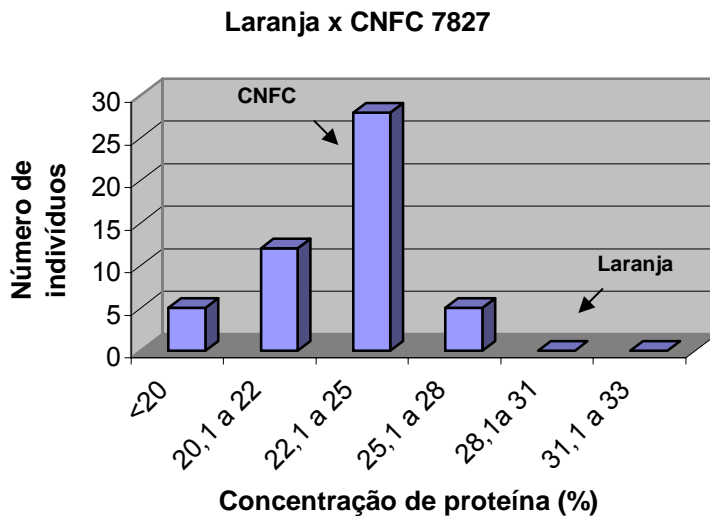
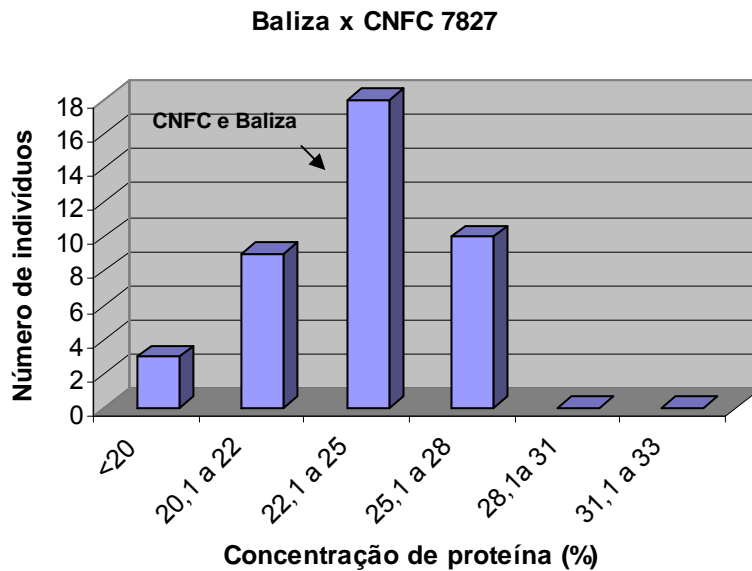


Figura 2: Distribuição de freqüência das concentrações de proteína das famílias F_{2:3} avaliadas pelo método Kjeldahl nas populações derivadas dos cruzamentos PVA 109 x CNFC 7827, Gaurama x CNFC 7827, Baliza x CNFC 7827 e Laranja x CNFC 7827

Avaliação da eficiência da seleção para alto teor de proteína em F₂, pelo método do ácido bicinconínico (BCA)

A seleção de sementes de alto teor de proteína em gerações precoces com o auxílio de micro-análises não destrutivas e posterior confirmação deste teor pelo método Kjeldahl visa a realização de retrocruzamentos utilizando plantas F₂ de elevado teor protéico, buscando-se um aumento da eficiência e rapidez na obtenção de variedades de alto teor protéico.

A seleção em geração F₂ com auxílio de micro análise não destrutiva foi pouco eficiente para a população derivada do cruzamento Laranja x CNFC 7827 (Figura 3). Este problema é costumeiramente encontrado quando se trabalha com gerações precoces em vista destas serem gerações segregantes. Fatores como o efeito de dominância e interações genótipo x ambiente diferenciadas causam dificuldades na seleção dos genótipos realmente superiores.

A média dos indivíduos não selecionados foi de 24,59% enquanto que a média dos indivíduos F₃ selecionados em F₂ foi de 23,09%, quando ambos foram analisados pelo método de Kjeldahl. Esses valores demonstram que não houve ganho de seleção em relação à população não selecionada.

A estimativa de herdabilidade em F₃ para a população em questão foi de 0,81, evidenciando que nesta população ainda existe variabilidade genética passível de ser explorada.

Se for realizada a seleção de 20 indivíduos com maior teor de proteína com base nos resultados do método Kjeldahl dentro desta população de 115 indivíduos (100 não selecionados e 15 selecionados para alto teor protéico em F₂) obter-se-á um ganho de 27,50%; se forem selecionados 10 o ganho sobe para 29,93% e cinco o ganho chega a 32,98%.

A média do teor de proteína, determinada pelo método Kjeldahl, dos 115 indivíduos foi de 24,39%, sendo que este valor representa um aumento de 14,40% em relação ao teor de proteína do genitor recorrente. Enquanto o ganho

obtido por seleção pelo método BCA foi 8,28%. Este resultado indica que a seleção em F_2 reduziu as probabilidades de ganho de seleção nesta população.

Em vista destes resultados, modificações no método de seleção utilizado podem ser propostas visando aumentar sua eficiência. Uma delas é a seleção de um número maior de indivíduos em F_2 , aumentando-se a chance de obter genótipos com as combinações alélicas desejáveis para serem selecionados na geração $F_{2:3}$. Outra proposta é realizar a avaliação do teor de proteína em sementes F_3 pelo método Kjeldahl, pois, nesta geração serão avaliadas sementes de cada planta individual. As sementes dessas plantas serão avaliadas por método destrutivo, eliminando o inconveniente do método não destrutivo que é a extração das proteínas da semente através da maceração com detergente, método que por vezes não consegue extrair o conteúdo total de proteína da amostra. A seleção baseada em plantas F_3 pode ser útil também por se tratar de uma geração onde a homozigose é maior do que em F_2 diminuindo os efeitos indesejáveis da dominância.

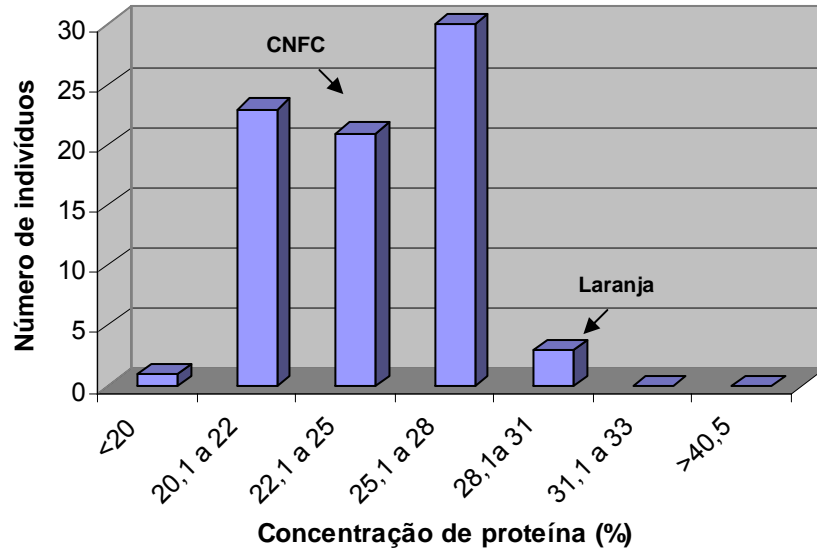


Figura 3: Distribuição de freqüência das concentrações de proteína de sementes F₃ de 100 plantas derivadas do cruzamento Laranja x CNFC 7827 não selecionadas em F₂ avaliadas pelo método Kjeldahl.

CONCLUSÕES

Todas as populações F_2 tiveram herdabilidades altas variando de 58 a 77%, sugerindo que são adequadas para se obter altos ganhos ou efetuar estudos de mapeamento para a característica teor de proteína.

A população F_2 que apresentou os maiores ganhos foi derivada do cruzamento PVA 109 X CNFC 7827, com ganho geral de 4,26%; e levando-se em consideração somente os 5 indivíduos de maior teor de proteína o ganho foi de 25,84%. A população F_2 que apresentou os menores ganhos, derivada do cruzamento Laranja X CNFC 7827, não obteve ganho geral (-0,95%), mas considerando-se somente os cinco indivíduos de maior teor de proteína apresentou um ganho de 13,66%.

A seleção na geração F_2 apresentou baixa eficiência quando utilizada isoladamente. O processo de transferência de genes que conferem alto teor protéico por meio de retrocruzamentos é mais eficiente quando baseado na seleção para teor de proteínas na geração F_3 .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS-AOAC. **Official methods of analysis**. Washington, D. C.:1975. 1094p.

BRESSANI, R., NAVARRETE, D. A., GARCIA-SOTO, A. Culinary practices and consumption characteristics of common beans at the rural home level. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición.**, v.31,n.3, p. 550-570, 1981.

CHIARADIA, A. C. N., GOMES, J. C. **Feijão: química, nutrição e tecnologia**. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes. 1997. 180 p.

CHURCHILL, G. A., DOERGE, R. W. Mapping quantitative trait loci in experimental populations. In: PATERSON, A. H. (Ed). **Molecular dissection of complex traits**. New York: CRC Press, 1998. p. 31-41.

DURIGAN, J. F., SGARBIERI, V. C., BULISANI, E. A. Protein value of dry bean cultivars; factors interfering with biological utilization. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.22, n.35, p.694-698, 1987.

FALCONER, D. S. **Introdução à genética quantitativa**. Trad. de Martinho de Almeida e Silva e José Carlos Silva. 1ª Ed. Viçosa, MG:UFV, 1987. 279p.

OSBORN, T. C. Genetic control of bean seed protein. **CRC Critical Reviews in Plant Science**, v.7, p. 93-116, 1988.

PIRES, C. V. **Caracterização bromatológica e digestibilidade *in vitro* de proteínas de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Viçosa, MG:UFV,

2002. 68p. Tese (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 2002.

SMITH P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H. , PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K.,GOEKE, M. M., OLSON, B. J., KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v.150, p. 76-85, 1985.

CAPÍTULO 2

USO DE FINGERPRINTING NO MELHORAMENTO PARA TEOR DE PROTEÍNA EM FEIJOEIRO

RESUMO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos mais importantes constituintes da dieta dos povos latino-americanos e africanos. O Brasil se destaca como o maior produtor e consumidor mundial de feijão comum. O objetivo deste trabalho foi o uso de marcadores RAPD para construir padrões de *fingerprinting* para seleção de indivíduos geneticamente mais próximos ao genitor recorrente em um programa de retrocruzamento visando aumento do teor de proteínas em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Foram utilizados quatro cultivares de feijoeiro com alto teor de proteína: PVA 109, Gaurama, Baliza e Laranja como fontes doadoras da característica alto teor de proteína e a linhagem CNFC-7827 da Embrapa Arroz e Feijão como genitor recorrente. Quatrocentos indivíduos F₂ de cada cruzamento foram avaliados quanto à concentração de proteína no grão pelo método do ácido bicinconínico. As sementes selecionadas (10%) foram plantadas em casa de vegetação, sendo as plantas F₂ caracterizadas quanto ao nível de similaridade em relação ao genitor recorrente utilizando marcadores RAPD. As distâncias genéticas foram calculadas segundo Nei & Li. Os teores de proteína foram confirmados em F_{2:3} pelo método Kejdahl. Quarenta e um *primers* foram polimórficos apresentando em média 1,6 bandas polimórficas. Os ganhos de seleção para teor de proteína variaram entre 9,92 e 15,65 %, sendo o maior ganho encontrado na população que teve o cultivar PVA109 como genitor doador e o menor valor foi observado na população que teve o cultivar Laranja como doador de genes para alto teor de proteína. Na população derivada do cruzamento PVA 109 x CNFC 7827 os cinco genótipos selecionados com base nas melhores combinações de proteína/similaridade genética foram 19, 22, 27, 30 e 37. Na população derivada do cruzamento Gaurama x CNFC 7827 foram selecionados os indivíduos 7, 8, 42, 45 e 46. Na população derivada do cruzamento Baliza x CNFC 7827 foram selecionados os indivíduos 4, 8, 9, 13 e 14. Na população que teve o cultivar Laranja como doador, foram selecionados os indivíduos 3, 30, 32, 35 e 39. As plantas F₂ das diferentes populações apresentaram distância genética em relação ao genitor

recorrente bastante variável. Foi possível obter ganhos de similaridade em relação à média de similaridade encontrada nas populações F_2 variando de 12 a 16% nas diferentes populações. Com a utilização de indivíduos selecionados de alto teor de proteína mais próximos ao genitor recorrente o número de retrocruzamentos necessários para recuperar o genoma do mesmo deve ser menor. Com isto reduz-se o tempo necessário para a obtenção de novas variedades.

INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos mais importantes constituintes da dieta dos povos latino-americanos e africanos por possuir conteúdo protéico elevado, quando comparado aos cereais, e apresentar grãos ricos em micronutrientes essenciais como o ferro. Esta leguminosa representa também uma importante fonte de recursos para pequenos agricultores. A América Latina é a principal região produtora de feijão do mundo e contribui com quase metade da produção mundial. O Brasil se destaca como o maior produtor e consumidor mundial de feijão comum (CIAT, 2002).

Os programas de melhoramento genético do feijoeiro estão se orientando, cada vez mais, para viabilizar a criação de cultivares de alta qualidade culinária, tecnológica e nutricional.

A seleção de indivíduos que apresentam o genótipo desejado em uma população segregante é uma tarefa que representa grandes desafios para o melhorista de plantas. Os efeitos ambientais e as interações genótipos x ambientes interferem na manifestação do potencial genético de um indivíduo, dificultando a identificação das plantas superiores (MILACH, 1998). A escolha do método de melhoramento mais adequado é função do tipo de herança do caráter a ser melhorado, das condições físico-econômicas do programa de melhoramento e do ambiente alvo para o lançamento de novas variedades (CARVALHO, 1982).

A utilização de marcadores moleculares em programas de introgressão via retrocruzamento é a aplicação mais concreta desse tipo de tecnologia (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Nestes programas, a seleção de indivíduos geneticamente mais próximos ao genitor recorrente reduz o número de retrocruzamentos necessários para obter a recuperação do genoma dos mesmos (OPENSHAW *et al.*, 1994). Marcadores moleculares RAPD são úteis neste trabalho de seleção, pois permitem avaliar regiões dispersas por todo o genoma (WILLIAMS *et al.*, 1993).

Os programas de melhoramento do feijoeiro têm sido voltados para resistência a doenças, aumento de produção e arquitetura da planta. Atualmente novas possibilidades de melhoramento têm surgido, como a seleção assistida por marcadores para piramidação de genes de resistência a doenças. O futuro aponta para as características qualidade tecnológica e nutricional como sendo características que devem receber mais atenção por parte dos melhoristas.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi o uso de marcadores RAPD para construir padrões de *fingerprinting* para seleção de indivíduos geneticamente mais próximos ao genitor recorrente e com altas concentrações de proteína no grão em um programa de retrocruzamento visando aumento do teor de proteínas em feijão.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material genético e cruzamentos

Foram utilizados quatro cultivares de feijoeiro com alto teor de proteína: PVA 109, Gaurama, Baliza e Laranja como fontes doadoras da característica alto teor de proteína com o objetivo de se incorporar alelos para essa característica na linhagem CNFC-7827 da Embrapa - Arroz e Feijão.

O cultivar PVA 109 possui grão vermelho com venações beges e teor de proteína de, aproximadamente, 24% em suas sementes. Os genitores Gaurama e Baliza possuem grão do tipo preto e foram desenvolvidos pelo CEFET - Pato Branco – PR, sendo recomendados para os estados do Paraná e Santa Catarina. Ambos possuem portes adaptados à colheita mecanizada, altos potenciais produtivos, teores de proteína de, aproximadamente, 25 e 23%, respectivamente. São resistentes ao mosaico comum, e, moderadamente suscetíveis à ferrugem e a mancha angular, tolerantes a altas temperaturas. O cultivar Gaurama é resistente à antracnose e tolerante ao crestamento bacteriano. O cultivar Laranja, também desenvolvido pelo CEFET possui grão do tipo carioca, com halo laranja em torno do hilo. É resistente à antracnose, à ferrugem e ao mosaico comum, moderadamente suscetível à mancha angular, tolerante ao crestamento bacteriano e a altas temperaturas. Possui alto potencial produtivo, porte adaptado à colheita mecanizada e teor de proteína nas sementes de aproximadamente 29%. O genitor recorrente (CNFC 7827) é uma linhagem do tipo carioca, desenvolvida pela Embrapa Arroz e Feijão, possui crescimento indeterminado tipo III. É resistente a 4 patótipos do fungo causador da antracnose e ao mosaico comum, moderadamente resistente à ferrugem e a mancha angular. Possui alto potencial produtivo, ciclo normal de 90 dias com florescimento em torno de 42 dias após a germinação e teor de proteína de 23%.

Inicialmente, foram efetuados cruzamentos entre o genitor recorrente e os doadores, obtendo-se as sementes F_1 . Todas as combinações híbridas foram autofecundadas para obter as sementes F_2 (populações segregantes). Estas etapas foram realizadas na Embrapa – Arroz e Feijão. Quatrocentas sementes foram avaliadas quanto a concentração de proteína pelo método do ácido bicinconínico (SMITH *et al.*, 1985) e as selecionadas (cerca de 10%), estas foram plantadas em casa de vegetação para realização de retrocruzamentos e obtenção das sementes $F_{2:3}$. As plantas F_2 derivadas das sementes selecionadas de cada cruzamento foram caracterizadas quanto ao nível de similaridade em relação ao genitor recorrente. As sementes $F_{2:3}$ foram avaliadas quanto a concentração de proteína pelo método Kejdahl para confirmar os ganhos obtidos em F_2 .

Foram utilizados marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) na construção de padrões de *fingerprinting* das plantas F_2 selecionadas para alto teor protéico. As plantas que apresentaram padrão de *fingerprinting* mais semelhantes ao genitor recorrente (CNFC-7827) foram retrocruzadas para obter a geração RC_1F_1 .

Extração do DNA

Foram coletadas folhas das plantas F_2 selecionadas, as quais foram armazenadas em “freezer” a -80°C até serem utilizadas para extração do DNA. A extração foi feita de acordo com o protocolo de DOYLE e DOYLE (1990), com algumas modificações propostas por ABDELNOOR *et al.* (1995).

Análise de RAPD

Amostras de DNA das plantas selecionadas por meio da análise do conteúdo de proteína foram amplificadas pela técnica de RAPD (*Random*

Amplified Polymorphic DNA), de acordo com WILLIAMS *et al.* (1990). Os *primers* utilizados e suas seqüências estão descritos no Quadro 1. Eles foram adquiridos junto a “Operon Technologies” (Alameda, CA, EUA).

As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 25 μ l, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, 100 μ M de cada um dos desoxinucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 μ M de um *primer*, 1,5 unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 25 ng de DNA. As amplificações foram efetuadas em termociclador Perkin-Elmer Cetus, modelo 9600, programado para 40 ciclos, cada um constituído da seguinte seqüência: 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 35°C e um minuto a 72°C. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de sete minutos a 72°C e, finalmente, a temperatura foi reduzida a 4°C.

Após as amplificações foram adicionados, a cada amostra, 3 μ l do corante tipo IV (0,25% de azul de bromofenol e 60% de sacarose). Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%) contendo brometo de etídio (0,5 μ g/ml) e submerso em tampão TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi realizada durante um período de, aproximadamente, 2h e 30 minutos a 120 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, no sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

Quadro 1: *Primers* RAPD utilizados e suas respectivas seqüências.

PRIMERS	Seqüência (5' → 3')	PRIMER S	Seqüência (5' → 3')
OPA 02	TGCCGAGCTC	OPAO 1	AAGACGACGG
OPA 03	AGTCAGCCAC	OPBE 17	GGGAAAAGCC
OPA 04	AATCGGGCTG	OPBF 10	GTGACCAGAG
OPA 07	GAAACGGGTG	OPBF 11	GACGACCGCA
OPA 08	GTGACGTAGG	OPBF 14	CCGCGTTGAG
OPA 11	CAATCGCCGT	OPBF 17	CAAGCTCGTG
OPA 15	TTCCGAACCC	OPBG 04	GTTCCCGACA
OPAA 11	ACCCGACCTG	OPBG 10	GGGATAAGGG
OPAB 18	CTGGCGTGTC	OPBG 12	CCCGAGAAAC
OPAD 12	AAGAGGGCGT	OPBH 09	GTCTTCCGTC
OPAG 01	CTACGGCTTC	OPBH 10	GTGTGCCTGG
OPAG 02	CTGAGGTCCT	OPBH 15	GAGAACGCTG
OPAG 10	ACTGCCCGAC	OPBH 20	CACCGACATC
OPAG 15	CCCACACGCA	OPD 08	GTGTGCCCCA
OPAI14	TGGTGCACCTC	OPG 19	GTCAGGGCAA
OPAK 10	CAAGCGTCAC	OPV 10	GGACCTGCTG
OPAK 16	CAAGCGTCAC	OPY 10	CAAACGTGGG
OPAL 03	CCCACCCTTG	OPY 11	AGACGATGGG
OPAL 04	ACAACGGTCC	OPZ 06	GTGCCGTTCA
OPAL 12	CCCAGGCTAC	OPZ 08	GGGTGGGTAA
OPAN 18	TGTCCTGCGT		

Análises dos dados obtidos por RAPD

Os produtos de amplificação (bandas de DNA) de maior intensidade, e cuja amplificação pôde ser reproduzida, foram tabulados como 1 (presença) e 0 (ausência) para a confecção de uma matriz de dados binários. A similaridade entre os indivíduos F_2 e o progenitor recorrente foi calculada com base no coeficiente de similaridade definido por NEI & LI (1979), de acordo com a seguinte fórmula:

$$d_{ij} = \frac{2a}{2a+b+c}$$

em que

d_{ij} = distância genética

a = presença de banda em ambos os indivíduos i e j (1,1);

b = presença de banda apenas no indivíduo i (1,0);

c = presença de banda apenas no indivíduo j (0,1);

Esta definição de similaridade exclui do cálculo as bandas que são ausentes em ambos os indivíduos, já que a mútua ausência não pode necessariamente ser atribuída a uma causa comum e conseqüentemente ser tida como similaridade. A multiplicação por 2 das bandas que coincidem permite melhor diferenciação de indivíduos com baixos níveis de similaridade. Os cálculos foram realizados utilizando o programa GENES (CRUZ, 1997). Os resultados obtidos serviram de base para a seleção dos indivíduos mais próximos do progenitor recorrente (CNFC 7827).

Ganhos de seleção

As porcentagens de ganho no teor protéico em relação ao progenitor recorrente foram obtidas considerando-se as progênes com maior teor de proteína em $F_{2:3}$ e maior similaridade em relação ao progenitor recorrente em F_2 . Para tal, foi utilizada a seguinte expressão:

$$\% \text{ de Ganho (M)} = \frac{M5F3 - MP \times 100}{MP}$$

onde:

M5F3 representa o teor protéico médio das 5 progênes $F_{2:3}$ de maior teor protéico combinado a altos valores de similaridade genética em relação ao genitor recorrente;

MP representa o teor protéico médio do genitor recorrente.

As porcentagens relativas de ganho obtidas em relação à similaridade foram calculadas segundo a fórmula:

$$\% \text{ de Ganho (S)} = \frac{MS5F2 - MSF2 \times 100}{MSF2}$$

onde:

MS5F2 representa o valor médio de similaridade em relação ao genitor recorrente das 5 progênies F_{2:3} de maior teor protéico;

MSF2 representa o valor médio de similaridade em relação ao genitor recorrente da progênie F₂.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De 305 *primers* RAPD que foram avaliados entre o genitor recorrente e os doadores, 41 foram selecionados por apresentarem polimorfismo consistente e reprodutível. Os indivíduos selecionados para alto teor de proteína de cada população F₂ foram avaliados separadamente. O número de *primers* que foram polimórficos em cada população e o número de bandas polimórficas geradas estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Número de *primers* RAPD polimórficos, número de indivíduos analisados e número de bandas polimórficas nos indivíduos selecionados das quatro populações F₂ analisadas

População F ₂	Nº de indivíduos	Nº de <i>primers</i> polimórficos	Nº de bandas polimórficas
PVA 109 x CNFC 7827	42	25	47
Gaurama x CNFC 7827	46	18	28
Baliza x CNFC 7827	41	24	33
Laranja X CNFC 7827	50	17	27

Pode ser observado que os indivíduos selecionados da população F₂ do cruzamento PVA x CNFC 7827 apresentaram maior número de bandas RAPD polimórficas. Esta observação indica que a variedade PVA é a mais divergente em relação ao genitor recorrente.

A Figura 1 ilustra a análise eletroforética dos produtos de amplificação de RAPD de amostras de indivíduos selecionados para alto teor de proteína da população F₂ do cruzamento Baliza X CNFC7827 com o *primer* OPBF17.

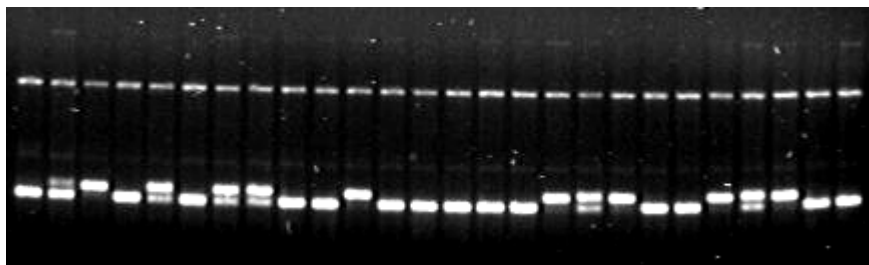


Figura 1: Análise eletroforética dos produtos de amplificação de RAPD de amostras de DNA de indivíduos da população F_2 do cruzamento Baliza X CNFC7827 com o *primer* OPBF17. As duas primeiras canaletas contêm produtos de amplificação dos genitores CNFC 7827 e Baliza, respectivamente. As demais contêm produtos de amplificação de indivíduos da geração F_2 .

O número médio de bandas polimórficas por *primer* foi em torno de 1,6, uma média considerada baixa quando comparada a outros trabalhos com feijoeiro descritos na literatura. VILARINHOS *et al.* (1995) usaram a técnica de RAPD para construir padrões de *fingerprinting* e determinar as distâncias genéticas entre 12 genótipos de feijoeiro que são utilizados internacionalmente para diferenciar raças de *Colletotrichum lindemuthianum*. Vinte e quatro *primers* foram utilizados gerando 59 produtos de amplificação polimórficos, sendo em média 2,5 bandas polimórficas por *primer*.

VASCONCELOS *et al.* (1996) avaliaram a variabilidade genética de 28 cultivares de feijão utilizando marcadores RAPD. Neste trabalho os autores utilizaram 45 *primers* e obtiveram 144 bandas polimórficas. Outro exemplo foi o estudo de 22 genótipos de feijão realizado por EMYGIDIO *et al.* (2003) no qual os autores utilizaram sete *primers* RAPD e encontraram 104 bandas polimórficas. Estudando o polimorfismo entre cultivares de feijoeiro DUARTE *et al.* (1999) utilizaram 33 *primers* RAPD os quais geraram 137 bandas polimórficas.

Existem poucos trabalhos na literatura relatando baixa variabilidade genética entre genótipos de feijoeiro. ALZATE-MARIN *et al.* (2003) em um estudo de *pedigree* e variabilidade genética em genótipos elite de feijão comum

brasileiros, avaliaram 21 cultivares, testando 14 *primers* dos quais 12 apresentaram polimorfismo totalizando 32 bandas polimórficas. Os autores atribuem o baixo polimorfismo encontrado à baixa variabilidade dos progenitores e do uso freqüente dos mesmos progenitores para o desenvolvimento dos cultivares estudados.

O polimorfismo intraespecífico é dependente do nível de divergência entre os genótipos estudados. O melhoramento genético do feijoeiro comum na América Latina tem sido caracterizado por estratégias conservadoras que desejam atender preferências rigorosas dos consumidores por tamanho do grão, formato e cor e superar, obrigatoriamente, doenças que afetam a produção do feijoeiro nos trópicos. Estes fatores têm reduzido as fontes de germoplasma utilizadas nas hibridizações e limitado a variabilidade genética disponível em programas de melhoramento (VOYSEST *et al.* 1994).

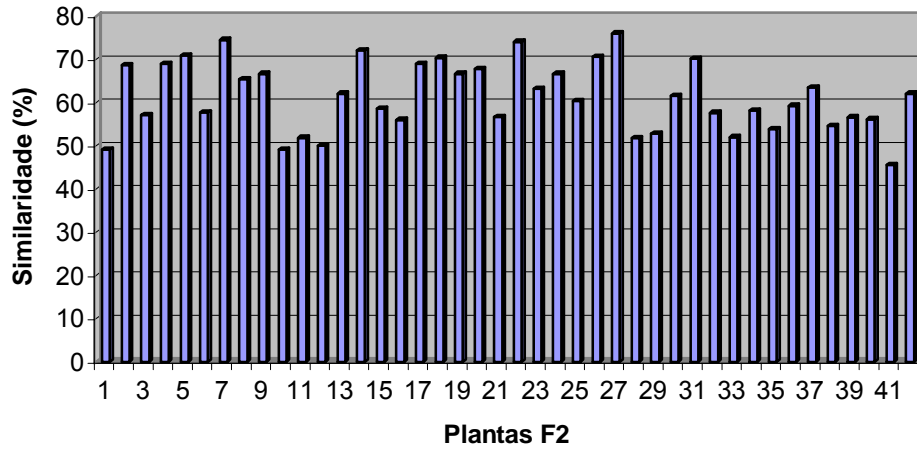
No Brasil constata-se grande similaridade entre cultivares de feijão, em decorrência, provavelmente, da preferência dos melhoristas pelo intercruzamento de cultivares comerciais que, como resultado pode levar a um estreitamento da base genética da cultura em nosso país (EMYGIDIO *et al.*, 2003).

Seleção de indivíduos F_2 com base na concentração de proteínas e na similaridade genética com o genitor recorrente

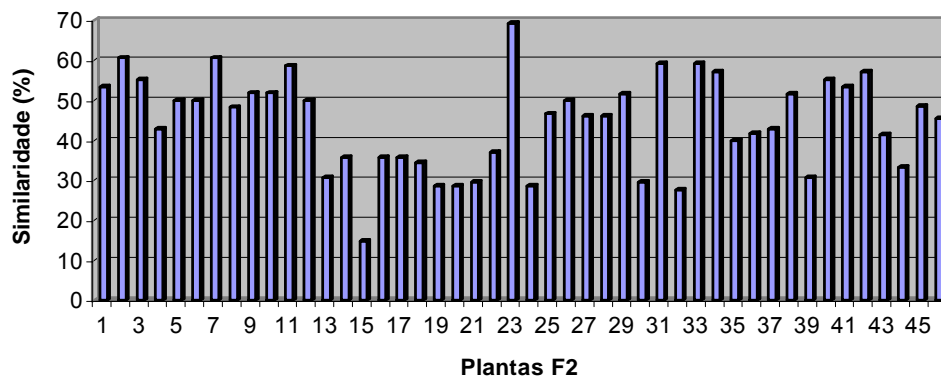
A seleção para concentração de proteína foi realizada primeiramente com base no resultado do método do ácido bicinconínico em 400 indivíduos de cada população F_2 separadamente. Na geração $F_{2:3}$ os indivíduos selecionados foram novamente avaliados pelo método Kjeldahl para confirmação da alta concentração de proteína e seleção das cinco progênes de maior teor.

Para a população F_2 do cruzamento PVA 109 x CNFC 7827 os valores de similaridade genética em relação ao genitor recorrente encontrados variaram de 45 a 76%, sendo a média 61% (Figura 2). Esta distância é relativa, pois a distância entre os genitores foi considerada 100%.

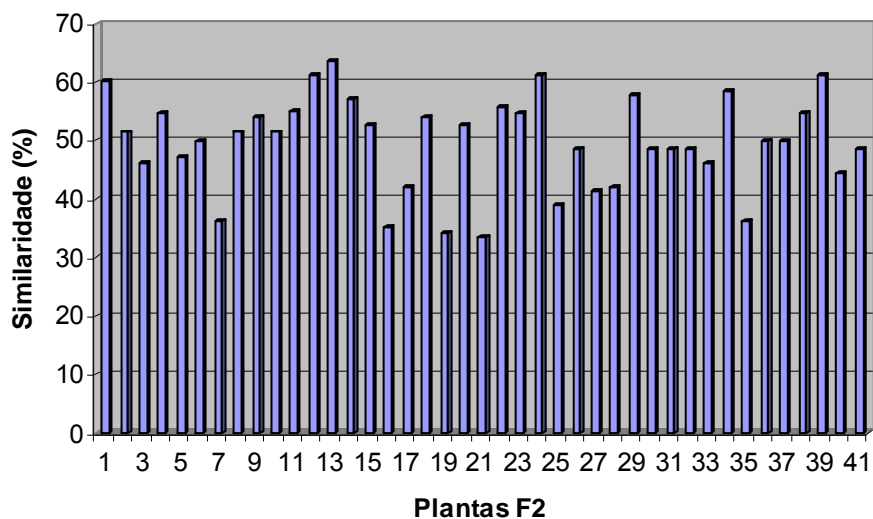
PVA109 X CNFC 7827



Gaurama X CNFC 7827



Baliza X CNFC 7827



Laranja X CNFC 7827

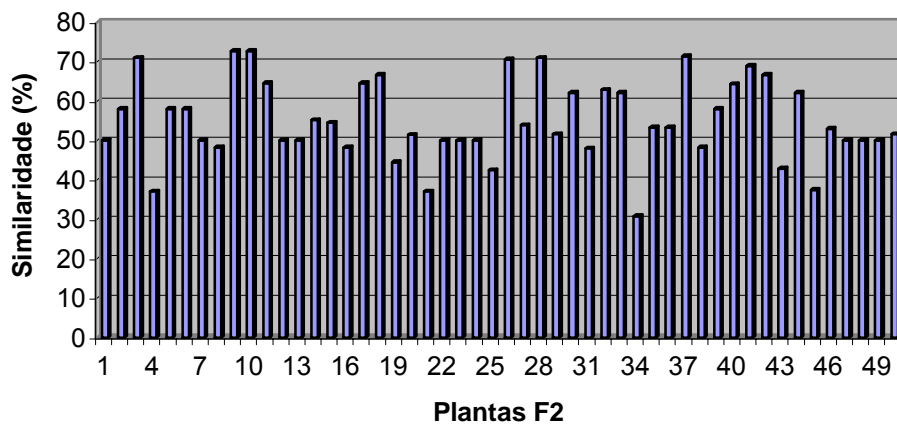


Figura 2: Valores em % de similaridade genética das plantas F₂ em relação ao genitor recorrente obtidos por meio de marcadores RAPD pelo coeficiente de similaridade definido por NEI & LI (1979).

Os cinco genótipos selecionados com base nas melhores combinações de proteína/similaridade genética foram 19, 22, 27, 30 e 37.

Os valores dos teores de proteína, similaridade genética e ganhos obtidos com os indivíduos selecionados na população F_2 dos quatro cruzamentos encontram-se na Tabela 2.

Na população F_2 de Gaurama x CNFC 7827 os valores de similaridade em relação ao genitor recorrente variaram de 14 a 69 % com média 44,8% (Figura 2). A Figura 3 apresenta os 14 indivíduos que apresentaram maiores teores de proteína em $F_{2:3}$ e similaridade genética (em F_2) em relação ao genitor recorrente. Destes foram selecionados os cinco indivíduos 7, 8, 42, 45 e 46 (Tabela 2) que foram usados nos retrocruzamentos.

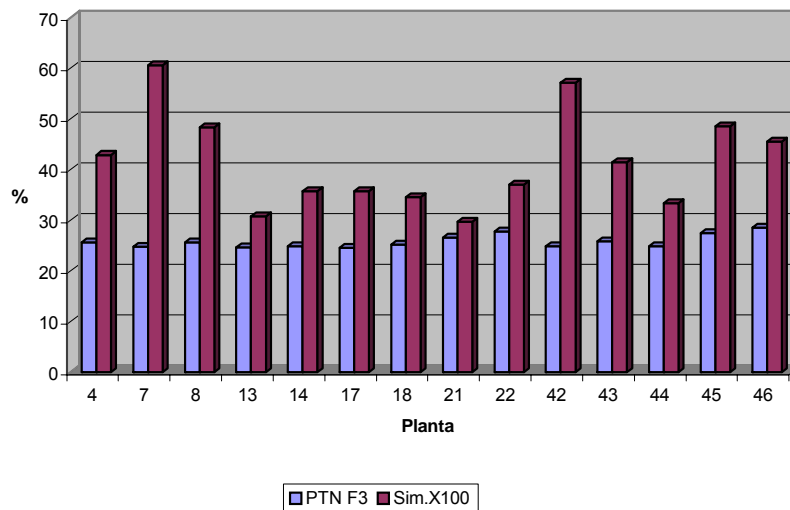


Figura 3: Concentrações (%) de proteína obtidos por Kejdahl em $F_{2:3}$ e valores de similaridade genética (%) obtidos através de marcadores RAPD pelo coeficiente de similaridade definido por NEI & LI (1979) de 14 indivíduos pré-selecionados na população derivada do cruzamento Gaurama x CNFC 7827.

Tabela 2: Concentração de proteínas, similaridades genéticas em relação ao genitor recorrente, médias e ganhos para teor de proteína e similaridade dos indivíduos selecionados nas quatro populações em estudo.

Indivíduos Selecionados	Conc. de Proteína %	Similaridade %	Média de Proteína (%)	Ganho (M) %	Ganho (S) %
PVA XCNFC7827-19	25,04	66,67	26,57	15,65	12,03
PVA XCNFC7827-22	27,43	74,07			
PVA XCNFC7827-23	27,76	76			
PVA XCNFC7827-30	27,45	61,4			
PVA XCNFC7827-37	25,2	63,42			
Gau X CNFC7827-7	24,68	60,61	26	14	16,05
Gau XCNFC7827-8	25,62	48,27			
Gau XCNFC7827-42	24,85	57,14			
Gau XCNFC7827-45	27,39	48,48			
Gau XCNFC7827-46	28,51	45,45			
Bal. XCNFC7827-4	27,45	54,54	26,34	14,61	12,91
Bal. XCNFC7827-8	26,75	51,43			
Bal. XCNFC7827-9	25,69	54,05			
Bal. XCNFC7827-13	26,21	63,41			
Bal. XCNFC7827-14	25,59	57,14			
Lar XCNFC7827-3	24,43	70,97	25,26	9,92	12,15
Lar XCNFC7827-30	24,77	62,07			
Lar XCNFC7827-32	24,95	62,86			
Lar XCNFC7827-35	24,66	53,33			
Lar XCNFC7827-39	27,52	58,06			

* PVA= PVA109; Gau = Gaurama; Bal = Baliza; Lar = Laranja; Ganho(M) = ganho de seleção para teor de proteína considerando valores de similaridade utilizando marcadores; Ganho (S) = ganho de similaridade em relação ao progenitor recorrente.

Na população F_2 derivada do cruzamento Baliza x CNFC 7827 os valores de similaridade em relação ao genitor recorrente variaram de 33 a 63% apresentando média de 49,7% (Figura 2). Foram selecionados os indivíduos 4, 8, 9, 13 e 14 (Tabela 2).

A população que teve a variedade Laranja como genitor doador apresentou valores de similaridade variando de 30,8 a 72,7 sendo a média de 54,8% (Figura 2). Foram selecionados os indivíduos 3, 30, 32, 35 e 39 (Tabela 2).

Os ganhos de seleção para teor de proteína com o auxílio de marcadores moleculares (Ganho M) variaram entre 15,65 e 9,92%, sendo o maior ganho encontrado na população que teve a variedade PVA109 como genitor doador e o menor valor foi observado na população que teve a variedade Laranja como doadora de genes para alto teor de proteína.

Como pode ser observado na Figura 2, as plantas F_2 das diferentes populações apresentaram distâncias genéticas em relação ao genitor recorrente bastante variáveis. A escolha daquelas com maior similaridade em relação ao recorrente permite que a recuperação do genoma recorrente seja mais rápida. Com a seleção baseada na distância genética entre as plantas segregantes e o genitor recorrente foi possível obter ganhos de similaridade em relação à média de similaridade encontrada nas populações F_2 variando de 12 a 16% nas diferentes populações. Com a utilização indivíduos selecionados de alto teor de proteína mais próximos ao genitor recorrente o número de retrocruzamentos necessários para recuperar o genoma do mesmo deve ser menor. Com isto reduz-se o tempo necessário para a obtenção de novas variedades diminuindo assim os custos e dando maior competitividade ao programa de melhoramento.

Como exemplo da eficiência do uso de marcadores em programas de melhoramento para teor de proteína pode ser citado MORAES (2003) que utilizou marcadores moleculares em um programa retrocruzamentos assistidos para introgressão de alelos para alto teor de proteína em soja obtendo valores percentuais de ganho relativo variando de 9,17 a 24,86%.

O próximo passo na utilização de marcadores no programa de melhoramento para qualidade do feijão do BIOAGRO/UFV em parceria com a Embrapa Arroz e Feijão é o mapeamento da característica teor de proteína para que possam ser identificados QTLs que contribuem mais significativamente para o alto teor de proteínas na semente do feijoeiro.

CONCLUSÕES

Os ganhos de seleção para teor de proteína variaram entre 9,92 e 15,65%, sendo o maior ganho encontrado na população que teve o cultivar PVA 109 como genitor doador e o menor valor foi observado na população que teve o cultivar Laranja como doador de genes para alto teor de proteína.

Na população derivada do cruzamento PVA 109 x CNFC 7827 os cinco genótipos selecionados com base nas melhores combinações de proteína/similaridade genética foram os indivíduos 19, 22, 27, 30 e 37. Na população derivada do cruzamento Gaurama x CNFC 7827 foram selecionados os indivíduos 7, 8, 42, 45 e 46. Na população derivada do cruzamento Baliza x CNFC 7827 foram selecionados os indivíduos 4, 8, 9, 13 e 14. Na população que teve o cultivar Laranja como doador foram selecionados os indivíduos 3, 30, 32, 35 e 39.

As plantas F_2 das diferentes populações apresentaram distâncias genéticas em relação ao genitor recorrente bastante variáveis. Foi possível obter ganhos de similaridade em relação à média de similaridade encontrada nas populações F_2 variando de 12 a 16% nas diferentes populações.

Com a utilização de indivíduos selecionados de alto teor de proteína mais próximos ao genitor recorrente o número de retrocruzamentos necessários para recuperar o genoma do mesmo deve ser menor. Com isto reduz-se o tempo necessário para a obtenção de novas variedades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABDELNOOR, R. V., BARROS, E. G. de, MOREIRA, M. A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, v.18, p. 265-273, 1995.

ALZATE-MARIN, A. L., COSTA, M. R., SARTORATO, A., PELOSO, M. J. DEL, BARROS, E. G. MOREIRA, M. A. Genetic variability and pedigree analysis of Brazilian common bean elite genotypes. **Scientia Agricola**, vol. 60, n.2, p.283-290, 2003.

CIAT – www.ciat.org, set/2002.

CRUZ, C. D. **Programa genes aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa, MG:UFV, 1997. 442p.

DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p. p. 13-15, 1990.

DUARTE, J. M., SANTOS, J. B., MELO, L. C. Genetic divergence among common bean cultivars from different races based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, vol.22. n.3, p. 419-426, 1999.

EMYGIDIO, B. M., ANTUNES, I. F., CHOER, E., NEDEL, J. L. Eficiência de coeficientes de similaridade em genótipos de feijão mediante marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Vol.38, n.2, p.243-250, 2003.

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

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre:UFRGS, 1998, 141p.

MORAES, R. M. A. **Introgessão de alelos para alto teor de proteína em soja assistida por marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 139 p. (tese de doutorado). Universidade Federal de Viçosa, 2003.

NEI, M., LI, W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Science USA** vol. 76, p. 5269-5273, 1979.

OPENSHAW, S. J., JARBOE, S. G., BEAVIS, W. D. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: **ASHS/CSSA Joint Plant Breeding Symposium, 2, Corvallis Proceedings...** Corvallis : Oregon State University, 1994.

SMITH P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H. , PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K.,GOEKE, M. M., OLSON, B. J., KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v.150, p. 76-85, 1985.

VASCONCELOS, M., J., V., BARROS, E. G. MOREIRA, M. A., VIEIRA, C. Genetic diversity of the bean *Phaseolus vulgaris* L. determined by DNA- based molecular markers. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n.3, p. 447-451, 1996

VOYSEST, O., VALÊNCIA, M. C. AMEZQUITA, M. C. Genetic diversity among Latin American andean and mesoamerican common bean cultivars. **Crop Science**, vol.34, p. 1100-1110, 1994.

WELSH, J., RALPH, D., MCCLELLAND, M. DNA and RNA fingerprinting using arbitrarily primed PCR. **PCR Protocols**, 2^a Ed., J. J. Sninski *et. al.*, Eds., 1994.

WILLIAMS, J. G. K., RAFALSKI, J. A., TINGEY, S. V. Genetic analysis using RAPD markers. **Methods of Enzymology**, v.218, p. 704-740, 1993.

CONCLUSÕES GERAIS

Todas as populações F_2 tiveram herdabilidades altas variando de 58 a 77%, sugerindo que são adequadas para se obter altos ganhos de seleção ou efetuar estudos de mapeamento para a característica teor de proteína.

A seleção em F_2 tem baixa eficiência quando utilizada isoladamente.

O processo de transferência de genes que conferem alto teor protéico por meio de retrocruzamentos é mais eficiente quando baseado na seleção para teor de proteínas na geração F_3 .

Os ganhos de seleção para teor de proteína variaram entre 9,92 e 15,65%, sendo o maior ganho encontrado na população que teve o cultivar PVA109 como genitor doador e o menor valor foi observado na população que teve o cultivar Laranja como doador de genes para alto teor de proteína.

Na população derivada do cruzamento PVA 109 x CNFC 7827 os cinco genótipos selecionados com base nas melhores combinações de proteína/similaridade genética foram 19, 22, 27, 30 e 37. Na população derivada do cruzamento Gaurama x CNFC 7827 foram selecionados os indivíduos 7, 8, 42, 45 e 46. Na população derivada do cruzamento Baliza x CNFC 7827 foram selecionados os indivíduos 4, 8, 9, 13 e 14. Na população que teve o cultivar Laranja como doador foram selecionados os indivíduos 3, 30, 32, 35 e 39.

As plantas F_2 das diferentes populações apresentaram distâncias genéticas em relação ao genitor recorrente bastante variáveis. Foi possível obter ganhos de similaridade em relação à média de similaridade encontrada nas populações F_2 variando de 12 a 16% nas diferentes populações.

Com a utilização de indivíduos selecionados de alto teor de proteína mais próximos ao genitor recorrente o número de retrocruzamentos necessários para recuperar o genoma do mesmo deve ser menor. Com isto reduz-se o tempo necessário para a obtenção de novas variedades.