DISSERTAÇÃO

ESTIMATIVA DA DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DO TIPO CARIOCA DE FEIJÃO COMUM COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES

JULIANA MORINI KÜPPER CARDOSO

Campinas, SP
2009

INSTITUTO AGRONÔMICO

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL

ESTIMATIVA DA DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DO TIPO CARIOCA DE FEIJÃO COMUM COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES

JULIANA MORINI KÜPPER CARDOSO

Orientadora: Dra. Luciana Lasry Benchimol
Co-orientador: Dr. Sérgio Augusto Morais Carbonell

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre** em Agricultura Tropical e Subtropical Área de Concentração Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia.

Campinas, SP
Março 2009

Ficha elaborada pela bibliotecária do Núcleo de Informação e Documentação do Instituto Agronômico

C268e Cardoso, Juliana Morini Küpper
Estimativa da diversidade genética entre acessos do tipo Carioca de feijão comum com base em marcadores moleculares. / Juliana Morini Küpper Cardoso. Campinas, 2009. 72 fls.

Orientadora: Dra. Luciana Lasry Benchimol
Co-orientador: Dr. Sérgio Augusto Morais Carbonell
Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) - Instituto Agronômico

1. Feijão carioca. 2. Feijão carioca – análise de diversidade
3. Marcadores moleculares I. Benchimol, Luciana Lasry
II. Carbonell, Sérgio Augusto Morais III. Título

CDD. 635.65

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA
DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO AGRONÔMICO
Pós-Graduação
Av. Barão de Itapura 1481 Caixa Postal 28
13001-970 Campinas, SP - Brasil
(019) 3231-5422 ramal 194
pgiac@iac.sp.gov.br

INSTITUTO AGRONÔMICO

Curso de Pós-Graduação

Agricultura Tropical e Subtropical

Certificado de Aprovação

Título: **Estimativa da diversidade genética entre acessos do tipo carioca de feijão comum com base em marcadores moleculares**

Aluno: **Juliana Morini Küpper Cardoso**

Área de Concentração: **Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia**

Processo SAA nº: **12172/07**

Orientadora: **Dra. Luciana Lasry Benchimol**

Aprovado pela Banca Examinadora:

Dra. Luciana Lasry Benchimol - IAC

Dr. Luiz Ricardo Hanai - ESALQ

Dr. Carlos Augusto Colombo - IAC

Campinas, 16 de abril de 2009

Visto:

Adriana Parada Dias da Silveira
Coordenadora
Pós-Graduação Instituto Agronômico

Aos meus avós
Maria Helena e Julcir,
DEDICO

Ao Flávio, cujo carinho e amor,
foram indispensáveis,
OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- À toda minha família, em especial minha mãe e meu avô Julcir por sempre me oferecerem suporte para que eu realize meus sonhos;
- À minha orientadora, Dra. Luciana Lasry Benchimol pela paciência, amizade e pelos grandes ensinamentos;
- A Dra. Maria Imaculada Zucchi, por ensinar a realizar as análises necessárias a este estudo;
- Aos Drs. Sérgio Augusto Morais Carbonell e Alisson Fernando Chiorato por fornecerem a estrutura para a realização deste estudo;
- Às funcionárias da PG-IAC, por simplificar as burocracias;
- Ao meu pai, pelos finais de semana divertidos e descontraídos;
- Aos meus amigos de laboratório, que ofereceram muita ajuda e sugestões no decorrer da pesquisa, principalmente a Paula, Renata e Letícia;
- Aos colegas da Pós-graduação, pela companhia e amizade;
- As minhas queridas amigas Ana, Luana, Gisele e Mariane, por sempre estarem ao meu lado, principalmente, nos momentos mais difíceis;
- Ao meu companheiro Flávio que me ofereceu amparo em todos os momentos;
- À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) por financiar este projeto e pela bolsa de mestrado concedida;
- A DEUS, a quem agradeço todos os dias, por conceder a oportunidade de aprender cada vez mais.

“Ninguém se engane a si mesmo; se algum dentre vós se tem por sábio segundo este mundo, faça-se insensato para ser sábio. Porque a sabedoria deste mundo é loucura diante de Deus; pois está escrito: Ele apanha os sábios na sua própria astúcia. E outra vez: O Senhor conhece os pensamentos dos sábios, que são vãos. Portanto ninguém se glorie entre os homens, porque tudo é vosso.”

1 Corintíos 3:18-21

SUMÁRIO

RESUMO... v
ABSTRACT... vi
1 INTRODUÇÃO 01
2 REVISÃO DE LITERATURA 05
2.1 O feijoeiro... 05
2.2 Origem e domesticação do feijão... 06
2.3 Melhoramento do feijoeiro e a cultivar Carioca... 08
2.4 Marcadores Moleculares 11
2.4.1 Marcadores RAPDs 13
2.4.2 Marcadores AFLPs 15
2.4.3 Marcadores SSRs 16
3 MATERIAL E MÉTODOS 18
3.1 Material vegetal 18
3.2 Extração e quantificação do DNA total dos genótipos de feijão comum 21
3.3 Análise dos SSRs 22
3.4 Análise dos AFLPs 25
3.5 Análise dos resultados 28
3.5.1 Estimativa de distâncias genéticas e análise de agrupamentos 28
3.5.2 Análise do Polimorfismo dos Marcadores (PIC - "Polymorphism Information Content") 28
3.5.3 Análise de Bootstrap 28
3.5.4 Análise multivariada 29
3.5.5 Teste de atribuição de indivíduos a grupos 29
3.5.6 Associação entre as medidas de distâncias genéticas para os diferentes tipos de marcadores (AFLPs e SSRs) 29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 31
4.1 Genotipagem com os marcadores microssatélites (SSRs) 31
4.2 Genotipagem com os marcadores AFLPs 45
4.3 Comparação das análises empregadas com os marcadores SSRs e AFLPs 55
5 CONCLUSÕES 57
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 58

CARDOSO, Juliana Morini Küpper. **Estimativa da diversidade genética entre acessos do tipo Carioca de feijão comum com base em marcadores moleculares.** 2009. 72f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Sub-tropical) - Pós-Graduação - IAC.

RESUMO

O grão comercial tipo Carioca é, tradicionalmente, o preferido para consumo no Brasil, o que justifica os esforços para o desenvolvimento de cultivares superiores, definindo características comerciais mais desejáveis. O objetivo desse trabalho foi o de avaliar a diversidade genética em um conjunto de 60 acessos de feijão comum tipo Carioca. A diversidade genética nesse grupo foi avaliada através de dois tipos de marcadores moleculares: SSRs e AFLPs. Enquanto as distâncias genéticas para SSRs foram calculadas usando a distância genética modificada de Roger's, as distâncias genéticas para AFLPs foram calculadas com o uso do coeficiente de similaridade de Jaccard. A análise por agrupamento foi realizada com o uso do UPGMA. Setenta SSRs foram polimórficos e vinte combinações de AFLPs produziram 635 bandas polimórficas. O valor do PIC ("Polymorphism Information Content") foi calculado para cada tipo de marcador. Os valores de PIC encontrados para SSRs variaram de 0,03 a 0,70, enquanto a variação para AFLPs foi de 0,03 a 0,37. Em geral, esses valores mostraram um melhor poder discriminatório para os marcadores SSRs. O dendograma de SSRs dividiu os genótipos de feijão tipo 'Carioca' em nove grupos. O agrupamento gerado pelos AFLPs produziu uma melhor separação dos genótipos, sendo que os mesmo foram divididos em cinco grupos. Os marcadores SSRs e AFLPs foram eficientes para avaliar a diversidade genética presente entre os acessos de feijão comum do tipo Carioca avaliados, sendo que foi possível constatar que a estruturação genética do conjunto de genótipos avaliados não é forte. Contudo há uma grande diversidade genética entre os acessos avaliados, e esta pode ser explorada pelos melhoristas para direcionar novos cruzamentos no sentido de gerar novas cultivares que atendam as necessidades do produtor e do consumidor desta leguminosa, mantendo as características do tipo de grão Carioca.

Palavras-chave: Feijão comum, marcadores moleculares, análise de diversidade, SSRs e AFLPs.

CARDOSO, Juliana Morini Küpper. **Genetic diversity among 'Carioca' common beans based on molecular markers.** 2009. 72f. Dissertation (Masters Degree in Genetics, Plant Breeding and Biotechnology) - Graduate School - IAC.

ABSTRACT

The Carioca commercial grain is traditionally preferred for consumption in Brazil, justifying the efforts for developing superior cultivars detaining the most common desirable commercial traits. The aim of this work was to evaluate the genetic diversity within a set of 60 'Carioca' common bean accesses. Their genetic diversities were assessed using two types of molecular markers: SSRs and AFLPs. While genetic distances for SSRs were calculated using modified Roger's genetic distance, for AFLPs, they were calculated using Jaccard´s similarity coefficient. Cluster analysis was performed with UPGMA. Seventy SSRs were polymorphic and twenty AFLPs primer combinations produced 635 polymorphic bands. PIC values (Polymorphism Information Content) were calculated for each sort of marker. SSRs PIC values varied from 0.03 to 0.70, whereas AFLP PIC values ranged from 0.03 to 0.37. In general, these values showed a better discriminatory power for SSRs markers. The SSRs dendrogram divided the 'Carioca' genotypes into nine groups. AFLP clustering produced a clearer separation of the genotypes into five groups. Both SSRs and AFLPs were efficient to evaluate genetic diversity among 'Carioca' common beans. However, it was noticed that there wasn´t a strong genetic structure for this set of genotypes although a great genetic diversity among accessions was observed. Indeed, this information could be explored by breeders to direct further crosses and generate new cultivars that fulfill the needs of breeders and consumers of this legume preserving the Carioca grain type.

Keywords: Common bean, molecular markers, diversity analysis, SSRs and AFLPs.

1 INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos mais importantes constituintes da dieta do brasileiro, com um consumo per capita superior a 17 kg/ano. É reconhecidamente uma excelente fonte protéica; contém grandes quantidades de carboidratos complexos, fibras e isoflavonas (ANDERSON et al., 1999; VIEIRA et al., 1998), além de ser uma importante fonte de ferro, fósforo, magnésio e manganês e em menor escala de zinco, e cálcio (BROUGHTON et al., 2003).

O cultivo do feijão ocorre em mais de 100 países, porém, o Brasil e a Índia, que juntos respondem por mais de 33% da colheita global, dominam a produção mundial, seguidos pela China, Mianmar (ex-Birmânia), México, Estados Unidos e Uganda (ZUPPI et al., 2005).

No mercado brasileiro, há uma ampla diversidade e preferência dos consumidores quanto aos tipos de grãos comercializados, especialmente no que se refere à forma, tamanho, brilho e cores. Contudo, a preferência por determinadas cores de grãos varia de acordo com o Estado ou, mesmo, entre regiões. Na região Sul, em certas regiões de Santa Catarina e Paraná, Rio de Janeiro e Espírito Santo, por exemplo, a preferência é pelo tipo comercial preto. No Estado de São Paulo, predomina o consumo de grãos do tipo comercial carioca e, em algumas regiões de Minas Gerais, as preferências são pelos feijões de cor, principalmente, os de tipo mulatinho, roxinho, rosinha e pardo (MOURA, 1998). No Nordeste, o consumo é de *Vigna unguiculata* L. ou, quando se consome *Phaseolus*, a preferência é por feijão mulatinho (SILVA, 2007).

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

A grande variabilidade genética presente no germoplasma do feijão comum que era utilizada na agricultura familiar no Brasil foi extremamente importante, pois esta variabilidade mantida sob cultivo nas pequenas propriedades auxiliou a estratégia de

sobrevivência dos pequenos agricultores, visto que estes selecionavam os genótipos adaptados às condições agromorfológicas e socioeconômicas que possuíam, sendo estas diferentes das encontradas nos cultivos empresariais (CORDEIRO & MARCATTO, 1994).

Contudo, a variabilidade genética que era mantida pela agricultura familiar está sendo perdida, sendo isto decorrência de dois eventos que alteraram a cadeia produtiva do feijão comum: a) o lançamento do feijão comum do tipo Carioca e a conseqüente substituição das outras cultivares e variedades por este tipo de grão, no período de 1968 a 1974; e b) o desenvolvimento do programa de feijão irrigado (Pró-Feijão) lançado em 1980, sendo que ocorreu uma expansão imediata deste tipo de plantio no norte e oeste do Estado de São Paulo (CONAFE, 2008).

Na maioria dos programas de melhoramento do feijoeiro, os cruzamentos são realizados entre linhagens e cultivares pertencentes a um mesmo grupo gênico, ou seja, do grupo que possui cultivares com as características agronômicas e culinárias mais aceitas na região. Neste sentido, muito pouco da variabilidade genética da espécie é explorada sendo que menos de 5% da variabilidade existente na espécie está sendo utilizada para fins de melhoramento desta cultura (SINGH, 1993).

Os melhoristas utilizam os bancos de germoplasma para escolher genitores que serão utilizados para promover cruzamentos e obter novas cultivares, posto que, nos bancos de germoplasma a variabilidade é preservada e conservada, sendo possível encontrar variedades melhoradas, crioulas, espécies silvestres, que podem possuir diversas características de importância agronômica (NASS, 2001).

Atualmente, no Brasil, a maior parte dos programas para o melhoramento genético do feijoeiro tem dado maior ênfase à obtenção de cultivares do grupo comercial Carioca pela grande demanda do mercado (ZIMMERMANN et al., 1996). O feijão do tipo Carioca é o mais produzido no país, com 63% do total da produção nacional. A produção do feijão carioca está distribuída uniformemente entre as 3 safras (safra das águas, safra da seca e safra de inverno), sendo que cada uma com participação de 33% na produção total desse tipo de feijão (CONAB, 2008). Apesar de ser um único grupo comercial dito ‘carioca’ e pertencer ao “pool” gênico Mesoamericano, os diferentes genótipos de feijão deste grupo apresentam variações agronômicas e tecnológicas, como diferenças em produtividade e tempo de cozimento (LEMOS et al., 2004).

No processo de escolha da estratégia adequada de melhoramento, é de vital importância o conhecimento da variabilidade do germoplasma existente. Esta só pode ser eficientemente utilizada se for devidamente avaliada e quantificada (VANDERBORGHT, 1988).

O estudo da diversidade genética presente em feijão era anteriormente feito apenas por meio de marcadores morfológicos e agronômicos considerados “descritores mínimos”, utilizados para caracterizar cada acesso, os quais são: emergência, floração média, cor da flor, hábito de crescimento, porte da planta, cor da vagem durante a maturação, características da semente e ciclo da cultura (SINGH et al., 1991a). Entretanto, como estes marcadores são afetados pela ação gênica de dominância, efeito ambiental, pleiotropia e epistasia, suas caracterizações são menos estáveis.

Com o advento dos marcadores moleculares, pode-se estimar a diversidade genética diretamente ao nível do DNA, reduzindo-se a interferência das variações ambientais na mensuração do caráter. Além de não sofrerem influência do ambiente, os marcadores moleculares apresentam elevado número de marcas por genoma, elevado polimorfismo, e são livres de pleiotropia. Entre os principais tipos destacam-se os RFLPs (“Restriction Fragment Lenght Polymorphism”; BOTSTEIN et al., 1980), os RAPDs (“Random Amplified Polymorphic DNAs”; WILLIAMS et al., 1990), AFLPs (“Amplified Fragment Length Polymorphism”; ZABEAU et al., 1993), e SSRs (“Simple Sequence Repeats”; TAUTZ, 1989).

Nos programas de melhoramento, os marcadores moleculares são abundantemente utilizados para estimar os níveis de diversidade e heterozigosidade entre diferentes materiais, estimar o tipo de distribuição espacial e temporal de populações em relação ao fluxo gênico (SOLÉ-CAVA, 2001); para mapeamento de QTLs (“Quantitative Trait Loci”, SIBOV et al., 2003), para introgressão gênica (AHMADI et al., 2001), entre outras aplicações.

De posse de medidas de diversidade genética, os melhoristas podem utilizá-las na predição de melhores cruzamentos, abreviando etapas de avaliação de descritores morfológicos e de genitores em dialélicos.

No Brasil, os programas de melhoramento do feijoeiro têm visado sobretudo o aumento da produção de sementes e a resistência às doenças. Além disso, os melhoristas buscam por cultivares mais resistentes à seca e mais apropriados a colheita mecanizada, porém, estas características são colocadas em segundo plano. Para que um programa de

melhoramento seja bem sucedido é necessário que o melhorista possua conhecimento a respeito da variabilidade genética existente dentro do seu banco de germoplasma.

Desta forma, visando obter um maior conhecimento a respeito da variabilidade genética dos genótipos do tipo Carioca, o presente trabalho teve por objetivos:

a) Acessar a diversidade genética presente entre acessos do tipo Carioca com marcadores moleculares SSRs e AFLPs;

b) Comparar a eficiência e a informatividade associada a cada classe de marcador;

c) Encontrar as melhores combinações gênicas em termos de distância gênica a fim de serem direcionadas ao programa de melhoramento do feijoeiro do Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O feijoeiro

O feijoeiro comum é uma planta anual, cresce em todos os continentes, sob extremas condições ambientais. É um organismo diplóide verdadeiro (2n=2x=22) e possui um genoma pequeno estimado entre 450 e 650 Mb (BENNETT & LEITCH, 1995). Outros estudos realizados mostram que 60% do genoma do feijão é composto por seqüências de cópias simples (TALBOT et al.,1984).

O feijoeiro é uma planta autógama, ou seja, a autofecundação é o processo predominante para a obtenção de novos grãos ou sementes. A taxa de fecundação cruzada possui variações de acordo com o cultivar e as condições ambientais. Esta taxa foi estimada no Estado de Minas Gerais, e foram encontradas estimativas inferiores a 3,0% (MARQUES JÚNIOR & RAMALHO, 1995). Devido ao sistema de polinização, pode-se inferir que um cultivar de feijão é constituído por uma linha pura ou por uma mistura de linhas puras. Uma linha pura, do ponto de vista genético, é um genótipo que possui todos os seus locos em homozigose e alelos iguais em todos os genes. Por isso, com as sucessivas multiplicações das sementes via autofecundação, a sua constituição genética não é alterada. Portanto, a não ser que ocorra mistura mecânica, mutações, a constituição do cultivar permanece inalterada.

O feijão é um dos mais importantes componentes da dieta alimentar do brasileiro, por ser reconhecidamente uma excelente fonte protéica, além de possuir bom conteúdo de carboidratos, vitaminas, minerais, fibras e compostos fenólicos com ação antioxidante que podem reduzir a incidência de doenças. A maioria das cultivares de feijão apresenta em torno de 25% de proteína, que é rica no aminoácido essencial lisina, mas pobre nos aminoácidos sulfurados. Essa deficiência, contudo, é suprida pelo consumo dessa leguminosa com alguns cereais, especialmente o arroz. Isto torna a tradicional dieta brasileira, o arroz com feijão, complementar, no que se refere aos aminoácidos essenciais (VIEIRA et al., 2006).

Além do papel relevante na alimentação do brasileiro, o feijão é um dos produtos agrícolas de maior importância socioeconômica, devido principalmente à mão-de-obra empregada durante o ciclo da cultura. Estima-se que são utilizados, somente em Minas Gerais, na cultura do feijão, cerca de 7 milhões de homens por dia-ciclo de produção, envolvendo cerca de 295 mil produtores (VIEIRA et al., 2006).

O Brasil é o maior produtor e consumidor desta leguminosa, seguido pela Índia, China e México. No período agrícola de 2006/2007, a produção foi de 3.350 toneladas e a previsão para o período agrícola de 2007/2008 foi de 1.255 toneladas (CONAB, 2008). Contudo, a produção nacional ainda é inferior ao seu potencial, apresentando produtividade média equivalente a 800 kg/ha (MAPA, 2006). Essa baixa produtividade ocorre devido a vários fatores, dentre os quais, a incidência de doenças é considerada uma das maiores causas, e atualmente as ocorrências de estiagem têm contribuído para acentuar este fator. Como o rendimento desta cultura ainda é consideravelmente baixo, buscam-se alternativas para a obtenção de cultivares mais produtivas através da melhoria do desempenho produtivo da cultura, associado ao conhecimento e exploração da variabilidade genética.

2.2 Origem e domesticação do feijão

O gênero *Phaseolus* originou-se das Américas, sendo que possui 55 espécies, onde cinco são cultivadas: *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray var. *latifolius* Freeman e *P. polyanthus* Greenman (DEBOUCK, 1993). Dentre estes, o feijão-comum, *Phaseolus vulgaris*, é a mais importante, pois é a espécie mais cultivada e também a mais utilizada nos cinco continentes.

Com base em informações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, GEPTS et al. (1986), KOENIG, SINGH & GEPTS (1990), GEPTS & BLISS (1985), SPRECHER (1988) e KOENIG & GEPTS (1989) estabeleceram a hipótese de três centros de origem para o feijão: 1) o primeiro no México e na América Central (Mesoamericano), 2) o segundo na região Andina, e 3) e o terceiro, de menor importância, na Colômbia. Para a determinação destes centros de origem, os autores se basearam em características como o tipo de faseolina – principal proteína de reserva de feijões selvagens e cultivados – bem como no tamanho das sementes. GEPTS (1984 e 1988), por meio de análises eletroforéticas, determinou vários tipos de faseolina. Foi verificado que ocorria uma correspondência na distribuição geográfica entre os feijões silvestres e cultivados. Os feijões do tipo “S” predominam no México e América Central (92%), enquanto os do tipo “T” predominam nos Andes do Sul (50%). O do tipo “B” somente foi encontrado em feijões silvestres e cultivados na Colômbia. Já os tipos “C”, “H” e “A” foram encontrados em formas cultivadas nos Andes.

Os centros de origem correspondem aos centros de domesticação, já que cultivares de feijão apresentam o mesmo tipo de faseolina, específica de cada centro de origem, de seus acenstrais selvagens (GEPTS et al., 1986).

A faseolina pertence à família “7S” ou vicilina, a família das proteínas de reserva de sementes de leguminosas e é composta por três unidades polipeptídicas glicosiladas. Pertence a uma família multigênica, constituída por, aproximadamente, sete genes para a faseolina do tipo “T”, oito genes para faseolina do tipo “S” e nove genes para o tipo “C” (TALBOT et al., 1984). As seqüências primárias de clones de cDNAs evidenciaram que a faseolina é constituída por duas famílias distintas (alfa e beta), com 98% de homologia entre elas.

Há uma correlação entre o tipo de faseolina e o tamanho da semente. Cultivares do tipo “T”, “C”, “H” e “A” têm sementes maiores do que os com tipo “S” e “B” (VASCONCELOS, 1995). No Brasil, são comuns os cultivares de sementes pequenas e faseolina do tipo “S”, como os feijões Carioca, Enxofre, Rosinha e muitos outros, e também feijões graúdos com faseolina do tipo “T”, como os cultivares ‘Manteigão Fosco’, ‘Jalo’ e muitos outros.

Os dois principais centros de domesticação têm relação com dois grupos de germoplasma conforme se evidencia no chamado nanismo ou fraqueza do híbrido F1. Essa anormalidade está relacionada ao fato das plantas F1 terem fraco crescimento, exibindo diversas anormalidades. A fraqueza do híbrido F1 somente pode ocorrer quando se cruzam cultivares de sementes pequenas e faseolina do tipo “S” com cultivares de sementes grandes e faseolina “T” ou “C” (SINGH & GUTIÉRREZ, 1984; GEPTS, 1988). Sendo assim, ela pode acontecer quando se cruzam cultivares do México e América Central com cultivares dos Andes. Provavelmente, isto seria um indicativo de que houve um grande isolamento geográfico entre os germoplasmas das duas regiões (BÓREM, 1999).

Dentro dos centros de domesticação, os genótipos puderam ser divididos em raças, baseando-se em análises de características agronômicas, morfológicas, bioquímicas e informações sobre adaptação (SINGH, 1991 b). De acordo com SINGH (1993), os genótipos de feijão dos principais centros de domesticação foram agrupados em seis raças ou doze grupos gênicos.

2.3 Melhoramento do feijoeiro e a cultivar ‘Carioca’

Os trabalhos com melhoramento genético em feijoeiro no Brasil foram iniciados no IAC, na seção de genética, em 1932, tendo como base realizar avaliações sobre a capacidade produtiva da espécie, porte de planta e resistência a doenças, para posterior utilização na obtenção de linhagens e cruzamentos artificiais.

Desta forma, linhagens passaram a ser analisadas quanto às características mencionadas, enquanto plantas eram selecionadas em populações derivadas de cruzamentos. Nesta época, observou-se que as linhagens de tegumento preto eram mais produtivas que as demais por apresentarem resistência à seca e principalmente, ao patógeno da ferrugem. Constatou-se também que as sementes de cor preta não possuíam boa aceitação comercial, o que não acontecia com materiais dos grupos rosinha, roxinho e manteiga (BULISANI, 2008).

Em meados de 1970, trabalhos realizados por pesquisadores do Instituto Agronômico no município de Palmital - SP identificaram uma planta de maior capacidade produtiva, onde a coloração do grão era creme com listras marrom, e o proprietário da fazenda a chamava de carioquinha, devido a uma raça de suínos que também possuía as listras pelo corpo. Após vários estudos foi recomendada como cultivar com o nome de Carioquinha. Muitos trabalhos foram realizados pela seção de Genética e Leguminosa do IAC como forma de demonstrar aos agricultores que a cultivar era produtiva. Este trabalho promoveu uma revolução no comércio de feijão no Brasil, pois a cultivar superou a tradição do consumo de feijões dos tipos rosinha, roxinho, manteiga e jalo e viabilizou o agronegócio do feijão no Brasil, sendo um tipo de grão ainda cultivado após 36 anos de seu lançamento (BULISANI, 2008).

Trabalhos de melhoramento foram e ainda estão sendo realizados na Instituição para obtenção de novas cultivares com características mais produtivas, eretas e resistentes aos principais patógenos da cultura. Desde 1968, o programa já apresentou mais de 32 novas cultivares de feijoeiro, a exemplo das cultivares ‘IAC - Carioca Akytã’ (POMPEU, 1997), ‘IAC - Carioca Aruã’ (POMPEU, 1997), ‘IAC - Carioca Pyatã’ (POMPEU, 1997), ‘IAC-UNA’ (POMPEU, 1997), ‘IAC-Carioca Eté’ (O AGONÔMICO, 1999), ‘IAC-Carioca Tybatã’ (O AGRONÔMICO, 2001), ‘IAC-Diplomata’ (CARBONELL et al., 2008), ‘IAC- Alvorada’ (CARBONELL et al., 2008).

O desenvolvimento da agricultura criou uma ampla diversidade entre as espécies escolhidas para domesticação (BRUSH et al., 1981). Essa diversidade se expressa, entre

outras maneiras, no grande número de variedades que as espécies cultivadas apresentam. Contam-se em centenas ou milhares as variedades de arroz, centeio, cevada, trigo, sorgo, milho, feijão, batata, ihhame, goiaba, uva, dentre outras (CLEVELAND et al., 1994; STRUSS & PLIESKE, 1998; CATTAN-TOUPACE et al., 1998; BRUSH et al., 1981; HAMON & TOURE, 1990).

Todavia, os avanços tecnológicos, a mecanização, o crescente uso de insumos e os programas de melhoramento genético das espécies cultivadas, que caracterizam o modelo da agricultura moderna, levaram a uma imensa redução na diversidade genética das principais culturas (CLEVELAND et al., 1994).

Nas últimas décadas, o cultivo do feijoeiro na maioria das regiões produtoras do Brasil é realizado predominantemente com a cultivar 'Carioca' (ABREU et al., 1994). Estima-se que anualmente sejam cultivados mais de 2 milhões de hectares com feijões com este tipo de grão. Embora a freqüência de mutação por loco seja muito baixa, espera-se que a variabilidade nos cultivares em uso prolongado pelos agricultores seja alta em razão do grande número de locos que podem sofrer mutação, dos muitos indivíduos que são cultivados simultaneamente e pelo fato dos agricultores reutilizarem os grãos colhidos como semente. Ademais, com a ação da seleção natural, deve permanecer somente os alelos favoráveis a uma maior adaptação à região considerada. Muito embora grande parte dessa variação seja perdida, pelo fato de que apenas uma pequena amostra dos grãos colhidos seja reutilizada como sementes, supõe-se que permaneça variação suficiente para se ter sucesso com a seleção (SANTOS et al., 2002). A utilização dessa variabilidade bem sucedida é freqüentemente relatada na literatura (SANTOS et al., 1978; RAMALHO et al., 1982; FONSECA, 1993).

Todas as cultivares do grupo carioca possuem a cultivar 'Carioca' como progenitor em alguma das etapas dos cruzamentos que lhes deram origem, sendo que, devido a este fator, todos esses cultivares possuem grandes semelhanças com o cultivar 'Carioca', conforme descrito por RIBEIRO (2001).

Todavia, há diferenças quanto à genealogia destes cultivares. VIERA et al. (2000) analisaram características morfológicas quantitativas de seis cultivares cariocas (Tabela 1) e encontraram que os mais divergentes foram os cultivares 'IAPAR 57' e 'IAPAR 81'; enquanto o 'Carioca MG' e 'IAPAR 57' foram os mais similares. Esta semelhança foi atribuída à existência de progenitores que apresentam sementes de tegumento de cor preta, como o cultivar 'Cornell 49-242' na genealogia do cultivar 'Carioca MG' e o cultivar 'Porrilo' na genealogia do cultivar 'IAPAR 57'. Observou-se

um agrupamento pela similaridade genética por meio de análise de marcadores morfológicos quantitativos dos cultivares ‘Carioca’ e ‘Aporé’, o que pode ser entendido já que estes cultivares foram obtidos por meio de cruzamentos com 50% ou mais de alelos do cultivar carioca. Em se considerando características morfológicas qualitativas, foi observado maior similaridade genética entre os cultivares ‘Carioca’ e ‘Carioca MG’, e ‘Carioca’ e ‘IAPAR57’, enquanto as menores similaridades estão entre o cultivar ‘IAPAR 81’ com os cultivares ‘Aporé’, ‘Carioca’ e ‘Pérola’.

Tabela 1 - Genealogia de seis cultivares de feijão carioca.

CULTIVAR	GENEALOGIA
‘Carioca’	Seleção dentro de lavoura de produtores
‘Carioca MG’	Car. 80/Rio Tibagi
‘Apóré’	Car./México 168//Car. / Bat 76
‘Pérola’	Seleção Aporé
‘IAPAR 57’	Porrilo Sintético/Aeté 1-38)//CENA 83-1/IAPAR BAC 32//CENA 83-2/CENA 83-1
‘IAPAR 81’	BAT 93/Carioca 80/G. N. Nebraska 1 Sel. 27)//Sel. Aroana 5/A 1764/4/a259

Este trabalho não encontrou nenhuma característica morfológica que separasse todos os seis materiais, tanto que, ao final, recomendou que a certificação genética de cultivares de feijão do tipo Carioca fosse feita utilizando marcadores moleculares associados aos morfológicos.

CEOLIN et al. (2007) avaliaram a divergência genética de 18 genótipos de feijão comum pertencentes ao grupo carioca por meio do método de Tocher (baseado na distância de Mahalanobis) e por gráficos de variáveis canônicas. Os resultados mostraram que as duas primeiras variáveis canônicas foram suficientes para explicar 88,23% da variabilidade total observada. Os resultados revelaram que as combinações dos genótipos ‘Pérola’ X ‘CNFC 8008’, ‘CNFC 8005’ X ‘CNFC 8009’, ‘Pérola’ X ‘CNFC 8009’, ‘Princesa’ X ‘CNFC 8008’ e ‘Princesa’ X ‘CNFC 8009’ foram as mais indicadas para realizar o melhoramento interpopulacional (os genótipos com prefixo ‘CNFC’ são provenientes da EMBRAPA).

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

2.4 Marcadores moleculares

Os marcadores genéticos são quaisquer características, processos bioquímicos ou fragmentos de DNA que permitem a distinção de indivíduos geneticamente diferentes, sendo que estas marcas são herdadas de acordo com as leis de herança genética propostas por Mendel. Quatro tipos de marcadores genéticos têm sido empregados para auxiliar no melhoramento de plantas, sendo eles: morfológicos, citológicos, bioquímicos e moleculares (BORÉM & MIRANDA, 2005). Os marcadores morfológicos e bioquímicos foram amplamente utilizados, contudo, atualmente não estão sendo mais empregados devido ao baixo polimorfismo e à influência do ambiente. Atualmente, os marcadores moleculares estão sendo abundantemente utilizados em diversos estudos em plantas, isto porquê eles são neutros e abundantes no genoma, permitindo assim uma maior precisão e refinamento nos estudos genéticos (BORÉM & CAIXETA, 2006).

Basicamente, os marcadores moleculares são um conjunto de metodologias que visam detectar variações nas seqüências de DNA, ou seja, por meio destes marcadores é possível explorar o polimorfismo natural existente entre os indivíduos. Estas diferenças podem ocorrer devido aos processos de adição, deleção ou substituições de pares de bases, como também podem se dar por meio de rearranjos dos segmentos de DNA devido a efeitos de deleções, inserções, inversões ou translocações ocorridas nas fitas de DNA (CAIXETA et al., 2006).

Nos programas de melhoramento, os marcadores moleculares de DNA são abundantemente utilizados para estimar os níveis de diversidade e heterozigosidade entre diferentes materiais, estimar o tipo de distribuição espacial e temporal de populações em relação ao fluxo gênico (SCHUSTER et al., 2007), para mapeamento de QTLs (“Quantitative Trait Loci”, LIU et al., 2008), para introgressão gênica (HERRERA et al., 2002), entre outras aplicações.

A caracterização da variação genética presente em um banco de germoplasma é essencial para um bom andamento de um programa de melhoramento. Marcadores moleculares podem ser utilizados para estimar os níveis de diversidade e heterozigosidade entre diferentes acessos, o tipo de distribuição espacial e temporal de populações em relação ao fluxo gênico (SOLÉ-CAVA, 2001).

A análise da diversidade genética presente em feijão tem sido estudada por meio de diversas técnicas, de marcadores bioquímicos, como a faseolina (GEPTS et al., 1986; KOENIG et al., 1990; BROWN et al., 1982), isoenzimas (KOENIG & GEPTS, 1989; SINGH et al., 1991 a; SANTALLA et al., 2002), mtDNA (KHAIRALLAH et al., 1990, 1992) ou por moleculares tipo RFLPs (BECERRA-VELÁSQUEZ & GEPTS, 1994), RAPDs (HALEY et al., 1994; SKROCH & NIENHUIS 1995; FREYRE et al., 1996; BEEBE et al., 2000; GALVÁN et al., 2001, 2006; FRANCO et al., 2001; CHIORATO et al., 2007), AFLPs (TOHME et al., 1996; MACIEL et al., 2001; PAPA & GEPTS, 2003; ROSALES-SERNA et al., 2005), ISSRs (GALVÁN et al., 2003; GONZÁLES et al., 2005), SSRs (YU et al., 1999; GUO et al., 2000; MÉTAIS et al., 2002; GAITÁN-SOLÍS et al., 2002; MASI et al., 2003; BLAIR et al., 2003, 2006 a, 2006 b, GRISI et al., 2007) e STSs (MURRAY et al., 2002).

Entretanto, dentre os marcadores moleculares existentes, os mais robustos para avaliar a diversidade presente dentro de um grupo são: AFLPs (“Amplified Fragment Length Polymorphism”; ZABEAU et al., 1993), e SSRs (“Simple Sequence Repeats”; TAUTZ, 1989).

Estudos comparativos entre marcadores moleculares foram realizados com milho. BARBOSA et al. (2003) avaliaram a relação intrapopulacional e interpopulacional de híbridos de milho tropical por meio de marcadores AFLPs e SSRs. Os autores concluíram que marcadores do tipo AFLPs são os mais apropriados para realizar estudos de diversidade genética de linhagens de milho proveniente de diferentes grupos heteróticos.

GARCIA et al. (2004) compararam marcadores do tipo RAPDs, RFLPs, AFLPs e SSRs em um estudo de diversidade de linhagens de milho tropical. Os resultados obtidos sugerem que os marcadores AFLPs são a melhor escolha para avaliar a diversidade genética. Além disso, os autores concluem que os AFLPs apresentam um bom nível de precisão nas estimativas genéticas. Os resultados obtidos com AFLPs correlacionaram com os obtidos com RFLPs, enquanto o RFLP é extremamente

laborioso, o AFLP é um sistema rápido e seguro que não requer conhecimento prévio de seqüência de DNA.

LABORDA et al. (2005) por meio de marcadores AFLPs e SSRs avaliaram a diversidade genética em linhagens de milho tropical. Os autores encontraram um alto nível de variabilidade genética sendo que, esta grande diversidade existente no material tropical levou a resultados distintos com uso de marcadores diferentes, onde o uso simultâneo de AFLPs e SSRs pode não ser a maneira mais eficiente de avaliar a variabilidade em genótipos altamente divergentes. Devido à habilidade dos SSRs em revelar vários aspectos da variação genômica, essa técnica foi considerada mais apropriada para análises de diversidade.

MARAS et al. (2008), em um estudo de diversidade genética de feijão comum, testaram a eficiência de marcadores SSRs e AFLPs para realizar este tipo de análise. Para tanto, genotiparam 29 acessos de feijão comum com 10 combinações de pares de "primers" de AFLPs e 14 SSRs. Os autores concluíram que ambos os marcadores foram eficientes para acessar a variabilidade genética dos genótipos avaliados.

2.4.1 Marcadores RAPDs

Um marcador molecular amplamente utilizado para avaliar a diversidade genética é o RAPD (WILLIAMS et al., 1990). Este marcador apresenta algumas limitações, como a baixa reprodutibilidade dos resultados e a natureza dominante, não permitindo a distinção entre os locos heterozigotos e homozigotos dominantes. Atualmente, este marcador tem sido cada vez mais abandonado devido às suas limitações (GARCIA et al., 2004).

Dentre as várias aplicações da técnica, pode-se citar a construção de mapas genéticos para a localização de genes de interesse econômico, a obtenção de "fingerprintings" genômicos, a análise de divergência genética em populações e germoplasmas, e o estabelecimento de relações filogenéticas (FERREIRA & GATTAPAGLIA, 1995). Estes marcadores têm sido muito úteis no estudo da diversidade genética de várias espécies de feijão (VILARINHOS, 1994; VASCONCELOS, 1995; ALZATE-MARIN, 1996; YOUNG & KELLY, 1997; DUARTE, 1998; MACHADO, 1999; PARK et al. 1999; BEEBE et al., 2000).

MACHADO (1999) avaliou por distâncias genéticas com marcador RAPD 12 cultivares de feijão, sendo 11 pertencentes ao grupo carioca e classificou as referidas

cultivares em cinco grupos distintos: Grupo I) ‘Esal 693’; Grupo II) ‘Ouro Negro’; Grupo III) ‘IAC Carioca Aruã’; Grupo IV) ‘PF-9029975’ e Grupo V) ‘CI-21’, ‘CI-128’, ‘H-4-7’, ‘Apóré’, ‘Pérola’, ‘Carioca 300V’, ‘A285’, ‘Rudá’ e ‘Carioca MG’.

VIEIRA et al. (2000) analisaram, também, a similaridade genética entre cultivares de feijão do grupo carioca por meio de marcadores RAPD o qual possibilitou a separação dos cultivares em três grandes grupos: I) ‘Carioca’ e ‘Carioca MG’; II) ‘Pérola’ e ‘IAPAR 57’; III) ‘Aporé’ e ‘IAPAR 81’. Segundo MACHADO (1999), o agrupamento ‘Carioca’ com ‘Carioca MG’ pode ser entendido devida existência de aproximadamente 50% de alelos do cultivar ‘Carioca’ envolvido nos cruzamentos para obtenção do cultivar ‘Carioca MG’. Os cultivares ‘Pérola’ e ‘IAPAR 57’ têm certo grau de parentesco, pois o cultivar ‘Pérola’ é uma linha pura obtida com base na seleção dentro do cultivar ‘Aporé’, que possui como progenitores dos cruzamentos para a obtenção do cultivar ‘IAPAR 57’, os cultivares ‘Cornell 49-242’ e ‘Porrillo’ (sementes com tegumento preto). Esta última também foi utilizada como um dos progenitores dos cruzamentos para a obtenção do cultivar ‘Pérola’ e ‘IAPAR 57’, que possuem características codificadas pelos genes relacionados a cor do tegumento. A similaridade genética encontrada entre ‘IAPAR 81’ e ‘Aporé’ pode ser entendida devido a progenitores de origem como ‘Porrilllo’, ‘Cornell 79-242’ e ‘Jamapa’ que possuem sementes com tegumento preto.

MENEZES et al. (2004) avaliaram 98 linhagens de feijão com RAPD das quais 88 pertencentes ao tipo Carioca e concluíram que a acentuada divergência genética de mais de 50% das linhagens indica que o cultivar ‘Carioca’ utilizado pelos agricultores é completamente diferente do cultivar original.

CHIORATO et al. (2007) avaliaram 220 acessos de feijão comum pertencentes ao banco de germoplasma de feijão do IAC por meio de 23 descritores morfo-agronômicos e 19 RAPDs. Os acessos estudados correspondem a genótipos do “pool” gênico Andino e Mesoamericano e de cultivares gerados pelo programa de melhoramento do IAC. Os acessos Mesoamericanos e os cultivares melhorados foram agrupados em um mesmo grupo, distintamente dos acessos Andinos. Com base nos dados moleculares, 47% de similaridade genética foi detectada entre acessos Mesoamericanos e resultados semelhantes foram observados para os cultivares melhorados (50%). Os Andinos apresentaram 60% de similaridade genética. O “cluster” formado pelos cultivares melhoradas e genótipos Mesoamericanos apresentou diferença quanto à coloração do tegumento.

2.4.2 Marcadores AFLPs

Marcadores AFLPs (ZABEAU & VOS 1993) apresentam polimorfismo baseado em diferenças entre genótipos na distribuição dos sítios de restrição e na amplificação diferencial de fragmentos. Podem ser detectados após uma reação de PCR (LIN & KUO, 1995) e eletroforese em géis de poliacrilamida. Têm sido utilizados como uma poderosa ferramenta para o DNA "fingerprinting" (PALLOTTINI et al., 2004) e mapeamento genético (SANTOS et al., 2002).

A técnica de AFLP detecta um maior número de locos comparativamente às demais, possibilita ampla cobertura do genoma e apresenta um baixo custo por informação (locos). A utilização de enzimas de restrição combinada com condições adequadas à hibridação dos "primers" durante as reações de amplificação agrega a robustez da técnica de RFLP com a praticidade da PCR. Marcadores AFLPs reúnem a capacidade exploratória dos polimorfismos dos RFLPs (presença ou ausência de sítios de restrição) com a vantagem da PCR (VIEIRA et al., 2004).

PAPA & GEPTS (2003), por meio de marcadores AFLPs, analisaram a estrutura genética de feijões selvagens e de feijões domesticados, pertencentes ao "pool" gênico Mesoamericano de diferentes níveis geográficos, a fim de testar a hipótese de fluxo gênico assimétrico e investigar a origem dos feijões selvagens. Os autores mostraram que o fluxo gênico ocorre com maior intensidade dentro das populações selvagens do que nas domesticadas. Outros trabalhos também apresentaram os mesmos resultados, alegando que está ocorrendo uma perda da diversidade genética nos feijões domesticados.

SVETLEVA et al. (2006) caracterizaram molecularmente acessos de feijão comum (*P. vulgaris* L.) da Bulgária e de outros locais por meio de marcadores ISSRs e AFLPs. Os resultados demonstraram que ambos "pools" gênicos detêm uma heterogeneidade parecida, o que evidencia que a diversidade genética está preservada nestes grupos, fato essencial para realizar um bom programa de melhoramento para este cultivar. Segundo os autores, ambos os marcadores ofereceram informações satisfatórias para realizar a caracterização genética dos acessos que estavam sendo avaliados e para estimar a diversidade genética existente.

2.4.3 Marcadores SSRs

Os marcadores microssatélites (TAUTZ, 1989; WEBER & MAY, 1989) representam um importante avanço para estudos genéticos. Este tipo de marcador apresenta alto nível de polimorfismo, codominância, heterozigosidade, mostrando padrão de herança Mendeliana. Além disso, é possível ser analisado a partir de qualquer tipo de tecido em qualquer estágio de desenvolvimento, sendo necessária pequena quantidade de DNA.

Os microssatélites têm sido usados para a análise genética em diferentes espécies de plantas (SANTOS et al., 2003; KOEHLEC-SANTOS et al., 2003; BIANCHI et al., 2004; DÍAZ & BLAIR, 2006; SILVA et al., 2007; BLAIR et al., 2007).

Os microssatélites têm sido cada vez mais usados para a análise genética em feijão comum, com os mais variados objetivos, como análises dos efeitos da seleção natural (RODRIGUES & SANTOS, 2006), conhecimento da variabilidade genotípica (BLAIR (a) et al., 2006; BUSO et al., 2006) e, principalmente, visando o melhoramento por seleção assistida de QTLs, mais especificamente por ligação aos locos de resistência a doenças (CORRÊA et al., 2001; ALZATE-MARIN et al., 2005; FERREIRA et al., 2005; BLAIR (b) et al., 2006; MIKLAS, 2006).

GÓMEZ et al. (2004) avaliaram a diversidade de feijão comum da Nicarágua utilizando inicialmente um conjunto de 12 indivíduos provenientes de dezessete regiões da Nicarágua e 20 microssatélites já previamente desenvolvidos para feijão (YU et al, 1999; GÁITAN-SOLIS et al., 2002; CIAT, 2002; BLAIR, 2003).

SICARD et al. (2005) estudaram a diversidade genética de raças da Itália central de *Phaseolus vulgaris* L. e *P. coccioneus* L. Três tipos de marcadores moleculares (ISSRs, SSRs e CpSSRs) foram utilizados. Os resultados demonstraram que *P. vulgaris* apresentou uma diversidade genética maior do que *P. coccineus*, para SSRs, sendo as estimativas de diversidade (PIC) foram de 0,85 para *P. vulgaris* e 0,72 para *P. coccineus*.

RODRIGUES & SANTOS (2006) fizeram uso de 105 microssatélites para avaliar o polimorfismo que estes apresentavam para as gerações derivados do cruzamento entre os cultivares ‘Carioca MG’ x ‘ESAL 686’, ambos pertencentes à variedade *P. vulgaris*. Do total de microssatélites utilizados, 37 foram desenvolvidos por YU et al. (2000) e 68 foram desenvolvidos por GAITÁN-SOLÍS et al. (2002). Trinta SSRs apresentaram polimorfismo para os genitores e para o “bulk” da família

$F_{24:27}$, estes locos foram selecionados naturalmente, sendo que 29 alelos vieram dos genitores ‘Carioca MG’ e um alelo veio do genitor ‘ESAL686’. Os autores concluíram que a seleção natural afetou todas as gerações e sua intensidade foi específica para cada loco e geração.

ZHANG et al. (2008) utilizaram 30 microssatélites para acessar a diversidade genética de 229 genótipos de feijão comum, sendo estes variedades chinesas. Os resultados obtidos por este estudo indicaram que os marcadores microssatélites foram eficientes para estimar a diversidade presente nos genótipos avaliados. Com isso, os autores concluíram que a China é um dos centros secundários de diversidade genética do feijão comum, ou seja, formou-se a partir de tipos que migraram do centro primário (o que possui a maior diversidade de espécies).

O uso de SSRs visando acessar a diversidade genética existente em diferentes “pools” gênicos de feijão, pode auxiliar a introduzir variabilidade adicional de espécies selvagens para cultivares utilizados tradicionalmente em programas de melhoramento, já que a variabilidade foi grandemente reduzida pela síndrome de domesticação (KOINANGE et al., 1996).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Material foliar de 60 acessos de feijoeiro (*P. vulgaris* L.) do tipo Carioca pertencentes ao Banco de Germoplasma do Instituto Agronômico foi utilizado neste estudo (Tabela 2).

Tendo em vista que os programas de melhoramento do feijoeiro no Brasil têm como principal objetivo, aumentar a capacidade de produção de sementes e a resistência a doenças, a maioria dos genótipos que foram utilizados neste estudo possuem estas características, como, por exemplo, a cultivar 'IAC-Carioca' (grão do tipo Carioca; hábito de crescimento indeterminado II/III; porte semi-ereto; resistente ao mosaico-comum), 'Carioca MG' (grão do tipo Carioca, hábito de crescimento indeterminado II; porte ereto; resistente ao mosaico-comum e à algumas raças de antracnose) e 'Aporé' (grão do tipo Carioca; hábito de crescimento indeterminado III; resistente à mancha angular, ao mosaico-comum e a algumas raças de antracnose).

As sementes foram germinadas em casa de vegetação. De cada cultivar, quantidades iguais de folhas de 10 plantas (em "Bulk") foram misturadas, no momento de coleta do material. As folhas coletadas foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas por 72h (-60^{o}C, 05 a 10 microns de Hg) e após as amostras foram moídas em moinho mecânico (Ciclotec-1093 Sample Mill, Tecator). O pó resultante foi acondicionado em frascos plásticos hermeticamente fechados e armazenado em freezer – 20^{o}C.

Tabela 2 - Número dos genótipos utilizados (seqüência da genotipagem em gel de poliacrilamida), nome dos acessos de feijão comum do tipo Carioca, genealogia destas cultivares e a procedência das mesmas.

Número dos genótipos	Genótipos	Genealogia	Procedência
01	**A-449**	G2910 / A19	**CIAT**
02	**Aporé**	Carioca / México 168 /4/ Carioca /// Porrillo No. 1 / Gentry 21439 // 51052 / Cornell 49-242	**EMBRAPA**

Continua

Tabela 2 - *Continuação*

03	**Branquinho**	Desconhecida	**VARIEDADE CRIOULA**
04	**BRS - Cometa**	A 769 / 4 / EMP 250 /// A 429 / XAN 252 // C 8025 / G 4449 /// WAF 2 / A 55 // GN 31 / XAN 170	**EMBRAPA**
05	**BRS - Horizonte**	EMP 250 / 4 / A 769 /// A 429 / XAN 252 // Pinto VI 114	**EMBRAPA**
06	**BRS - Pontal**	BZ3836 // FEB 166 / AN910523	**EMBRAPA**
07	**BRS - Requinte**	Carioca MG // POT 94 / AN910523	**EMBRAPA**
08	**BRSMG-Talismã**	Seleção recorrente envolvendo os seguintes genitores: BAT 477, IAPAR 14, FT 84-29, Jalo EEP, A 252, A 77, Ojo de Liebre, ESAL 645, Pintado, Carioca, ESAL 645, P 85, P 103, H-4, AN910522, ESAL 624, Carioca MG	**EMBRAPA**
09	**Campeão II**	Aporé / Carioca comum	**VARIEDADE CRIOULA**
10	**Caneludo**	Desconhecida	**VARIEDADE CRIOULA**
11	**Carioca Comum**	Seleção massal em material local (Palmital-SP)	**IAC**
12	**Carioca Lustroso**	Desconhecida	**VARIEDADE CRIOULA**
13	**Carioca MG**	Carioca / Cornell 49-242 // Rio Tibagi	**UFLA**
14	**Carioca Precoce**	-	**EMBRAPA**
15	**CV-48**	Seleção recorrente envolvendo os seguintes genitores: BAT 477, IAPAR 14, FT 84-29, Jalo EEP, A 252, A 77, Ojo de Liebre, ESAL 645, Pintado, Carioca, ESAL 645, P 85, P 103, H-4, AN910522, ESAL 624, Carioca MG	**UFLA**
16	**FEB-186**	A525 // A767 // G2500C / A445 // G12727 / XAN11	**CIAT**
17	**FEB-200**	A767 // G4495 / PVA 1111 // G4449 / XAN112	**CIAT**
18	**FT-Bonito**	IAPAR-14 / IAC-Carioca 80	**FT-SEMENTES**
19	**FT-Paulistinha**	Carioca / México 168 // Carioca 1070	**FT-SEMENTES**
20	**FT-PortoReal**	FT 85-75	**FT-SEMENTES**
21	**Goytacazes**	A 106 / A 63	**VARIEDADE CRIOULA**
22	**Guará**	-	**EPAGRE**

Continua

Tabela 2 - *Continuação*

23	**H96A28 - P4 - 1 - 1- 1 - 1**	Vax! / Aruã // Akytã / IAPAR14 // A686	**IAC**
24	**H96A102-1-1-152**	Aruã/G5686 // Xan251 / Akytã // Pyatã / Mar1 // Pérola	**IAC**
25	**H96A31-P2-1-1-1-1**	Vax1 / Aruã // Aruã / Mar1 // Maravilha / Cal143	**IAC**
26	**IAC - Alvorada**	Pyatã / A686 // Maravilha / G2338 // Maravilha / And277 // L317-1	**IAC**
27	**IAC-Apuã**	Emp81 / H853-50-2	**IAC**
28	**IAC-Aysó**	Carioca / Cornell 49-242	**IAC**
29	**IAC-Carioca**	Carioca / Cornell 49-242	**IAC**
30	**IAC-Carioca Akytã**	DOR 41 // 10-3-1 / TU1B1-2 / 10-9-1	**IAC**
31	**IAC-Carioca Aruã**	10771.122 // H5380-41 / A156 // H5380-41 / AB136	**IAC**
32	**IAC-Carioca Pyatã**	DOR 41 // 10-3-1 / TU1B1-2 / 10-9-1	**IAC**
33	**IAC-Carioca Tybatã**	L933 / LM30630	**IAC**
34	**IAC-Votuporanga**	Emp81 / H853-50-2 // H853-50-2 / Phaseolus aborigineus	**IAC**
35	**IAC-Ybaté**	G4000 / H858-50-2	**IAC**
36	**IAPAR - 14**	Carioca 99 / G / N / Nebraska 1 Sel / 27 // BAT 614	**IAPAR**
37	**IAPAR - 57**	Porrillo Sintético / Aeté 1-38 // CENA 83-1 / IAPAR BAC32 // CENA 83-2 / CENA 83-1	**IAPAR**
38	**IAPAR - 80**	A 2488 / EMP 117 /5/ Veranic 2 / Tlalnepantla 64 // Jamapa / Tara /// Carioca 99 / G.N.Nebraska1#27 /4/ Sel.Aroana	**IAPAR**
39	**IAPAR - 81**	Veranic 2 / Tlalnepantla 64 // Jamapa / Tara /// [(Carioca 99 / G.N.Nebraska 1#Sel 27) // Sel.Aroana]} /5/ Aroana /// Veranic 2 / Tlalnepantla 64 // Jamapa / Tara /4/ A 259	**IAPAR**
40	**IAPAR -72**	Carioca / *Phaseolus coccineus*	**IAPAR**
41	**IAPAR - 31**	IAPAR BAC 4 / RAI 46//IAPAR BAC2 / IGUAÇÚ /3/ BAT 93/ IAPAR BAC 4	**IAPAR**

Continua

Tabela 2 - *Continuação*

42	**IPR- Aurora**	RM8454-21-1/ IAPAR-14	**IAPAR**
43	**Juriti**	BAT93 / 2 / Carioca Sel.99 / Great Northen Nebraska 1 sel#27 / 3 / sel. Aroana / 4 / A176 / A259 / 5 / II 133 / XAN87	**IAPAR**
44	**L 507-1**	-	**IAC**
45	**L-476-2**	-	**IAC**
46	**LH-II**	Carioca MG / Carioca / EMGOPA 201 Ouro // Carioca / EMGOPA 201 Ouro	**UFLA**
47	**LP 01-38**	-	**IAPAR**
48	**LP 9979**	-	**IAPAR**
49	**LP88-175**	-	**IAPAR**
50	**Mar 2**	A252 / G5653	**CIAT**
51	**MD-806**	-	**CIAT**
52	**Mex 279**	-	**CIAT**
53	**OPNS-331**	Ouro Negro / Pérola	**UFLA**
54	**OPS-16**	Ouro Negro / Pérola	**UFLA**
55	**Pérola**	Carioca / México 168 / 4 / Carioca /// Porrillo No. 1 / Gentry 21439 // 51052 / Cornell 49-242	**EMBRAPA**
56	**Rubi**	Carioca / México 168 / 4 / Carioca /// Porrillo No. 1 / Gentry 21439 // 51052 / Cornell 49-242	**EMBRAPA**
57	**Rudá**	Carioca / Rio Tibagi	**CIAT**
58	**Taquarí**	Desconhecida	**CATI**
59	**TO**	-	**CIAT**
60	**Z-28**	IAPAR 81 / AN9022180 // PF 9029975 / A-805	**UFLA**

3.2 Extração e quantificação do DNA total dos genótipos de feijão comum

O DNA das amostras foi extraído a partir de pó de folhas liofilizadas usando o método de extração do CTAB (HOISINGTON et al., 1994). Para realizar a extração do DNA dos 60 genótipos, 400 mg das folhas liofilizadas e moídas foram colocadas em tubos do tipo falcon de 15 mL, e nestes foram acrescentados 9,0 mL de tampão de extração CTAB (pré-aquecido à 65ºC com 0,2% de βmercaptoetanol). Os tubos falcon contendo a mistura de pó e tampão de extração foram incubados por 1h30min à 65 ºC, agitando os tubos por inversão a cada 10 minutos. Após esta etapa, os tubos foram retirados do banho-maria e deixados sobre a bancada por 5 minutos para que os mesmos

resfriassem. Em seguida, foi adicionado a cada tudo 4,5 mL de solução composta por clorofórmio misturado a álcool isoamílico na proporção de 24:1. Os tubos foram agitados levemente por inversão durante 10 minutos, e em seguida as amostras foram centrifugadas por 20 minutos à 2.500 rpm, sendo que a temperatura foi mantida em torno de 20ºC - 25ºC, para não ocorrer a precipitação do CTAB. A parte aquosa superior contida nos tubos foi transferida para novos tubos falcon de 15 mL, e nestes novamente foi colocado 4,5 mL de solução composta por clorofórmio misturado a álcool isoamílico na proporção de 24:1. Realizou-se a mistura por inversão durante 10 minutos. Novamente, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 2.500 rpm. A fase aquosa superior foi transferida para novos tubos falcon e nestes foi adicionado 6,0 mL de 2-propanol e as amostras foram gentilmente misturados por inversão até o aparecimento do DNA. Os tubos foram centrifugados por 20 minutos à 2.500 rpm, a fase aquosa foi descartada, e foi adicionado 1 mL de solução de lavagem “Wash1” (76% de EtOH e 0,2M de NaOAc). Este líquido permaneceu nos tubos por 5 minutos e em seguida foi descartado. Para efetuar outra lavagem, 2 mL de solução “Wash2” (76%de EtOH e 10 mM de NH_4OAc) foi adicionado, e após um minuto, esta solução foi descartada. Os tubos contendo as amostras de DNA de cada genótipo ficaram durante 1 hora secando sobre a bancada, e após este tempo, as amostras foram resuspendidas em 1 mL de TE (pH = 8,0) e 20 µL de RNAse (10 ng/µL).

Alíquotas de DNA obtidas de cada genótipo foram quantificadas em gel de agarose 1% ao lado de um padrão de concentração de DNA, construído a partir de DNA de fago λ numa gama crescente de 50 a 300 ng. Mediante comparação visual da intensidade das bandas do DNA das amostras e dos padrões, as concentrações de cada amostra foram estimadas. O DNA de cada acesso foi acondicionado em geladeira à 4 ºC.

3.3 Análise dos SSRs

Para o estudo da diversidade genética, 85 microssatélites (BENCHIMOL et al., 2007; CARDOSO et al., 2008), foram selecionados, sendo que destes, 65 foram genotipados em gel de poliacrilamida 6%, e os outros 20 microssatélites foram genotipados em seqüenciador automático com “primers” fluorescentes, e destes 10 microssatélites marcados com fluorescência são inéditos e ainda não foram publicados.

As reações de amplificação com os 65 microssatélites foram realizadas com 50 ng de DNA, 1 U de *Taq* DNA polimerase, 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,15 mM de cada dNTP, 0,8 µM de cada "primer" ("forward" e "reverse") e 1x de tampão da enzima, num volume total de 25 µl. As condições de amplificação utilizadas foram: 1) 94^{o}C, 1 min; 2) 94^{o}C 1 min; 3) temperatura de anelamento (Ta) específica para cada SSR por 1 min.; 4) 72^{o}C 1 min, 5) volta ao passo 2 por 30 vezes; 6) 72^{o}C por 5 min.; 7) 15^{o}C, incubação. O termociclador MyCycler da BioRAD foi utilizado para fazer as reações de amplificação.

Para verificar a qualidade das amplificações, primeiramente os produtos das reações de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (1,0 %), corado com brometo de etídeo para visualização das bandas. Os locos que apresentaram um adequado padrão de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida denaturante (6%), sendo que os locos que não apresentaram padrão adequado de amplificações foram submetidos a novas reações de PCR. A coloração dos géis de poliacrilamida denaturante foi realizada utilizando-se nitrato de prata de acordo com CRESTE et al. (2001).

Para realizar a genotipagem dos 20 microssatélites adicionais pelo método de fluorescência, as amplificações foram realizadas do seguinte modo: as reações de PCR foram realizadas em um volume final igual a 15 µL, contento 30 ng de DNA, 1 U de *Taq* DNA polimerase, 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,15 mM de cada dNTP, tampão 1x, 0,8 pmol/µl de "primer reverse" com M13 (marcado com duas cores de florescência: HEX e 6-FAM, que apresentam coloração verde e azul, respectivamente) e 0,2 pmol/µl do "primer foward". As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: 1) 94ºC por 1 min; 2) 30 ciclos a 94ºC por 1 min, temperatura de anelamento (Ta) específica para cada SSR por 1 min e 72ºC por 1 min; 3) 8 ciclos a 94ºC por 1 min, 53ºC por 1 min, 72ºC por 1 min, e 4) extensão final a 72°C por 10 min. As amostras para realizar a genotipagem foram preparadas em uma mistura de 9 µL de formamida (Applied Biosystems), 0,25 µL de "Rox" (Applied Biosystems) e 1,5 µL da reação de amplificação. Os fragmentos amplificados foram genotipados em seqüênciador automático 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). As análises dos produtos foram realizadas utilizando o "software" GeneMapper® v3.7 da Applied Biosystems (Figuras 1 e 2).

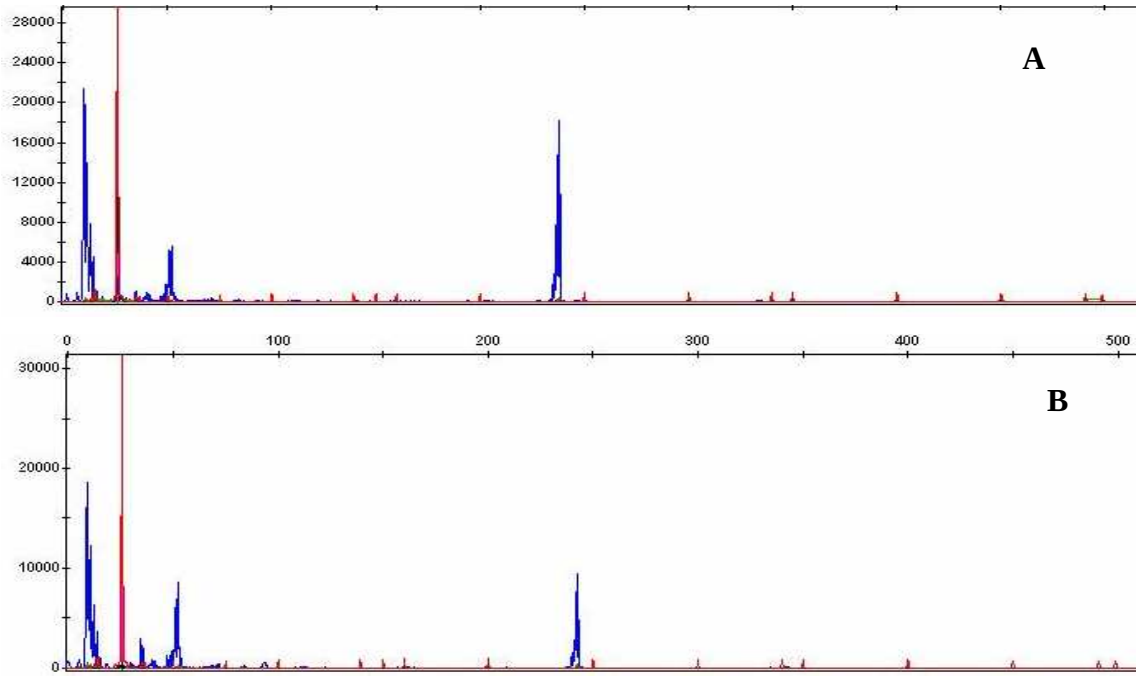

Figura 1 - Eletroferogramas com picos dos dois alelos do microssatélite SSR-IAC01 com a florescência 6-FAM (coloração azul). Os picos com coloração vermelha são do "Rox" (padrãode peso molecular). Programa GeneMapper® v3.7 (Applied Biosystems). A parte (A) da figura corresponde ao alelo de menor peso molecular, enquanto que a parte (B) da figura corresponte ao alelo de maior peso molecular.

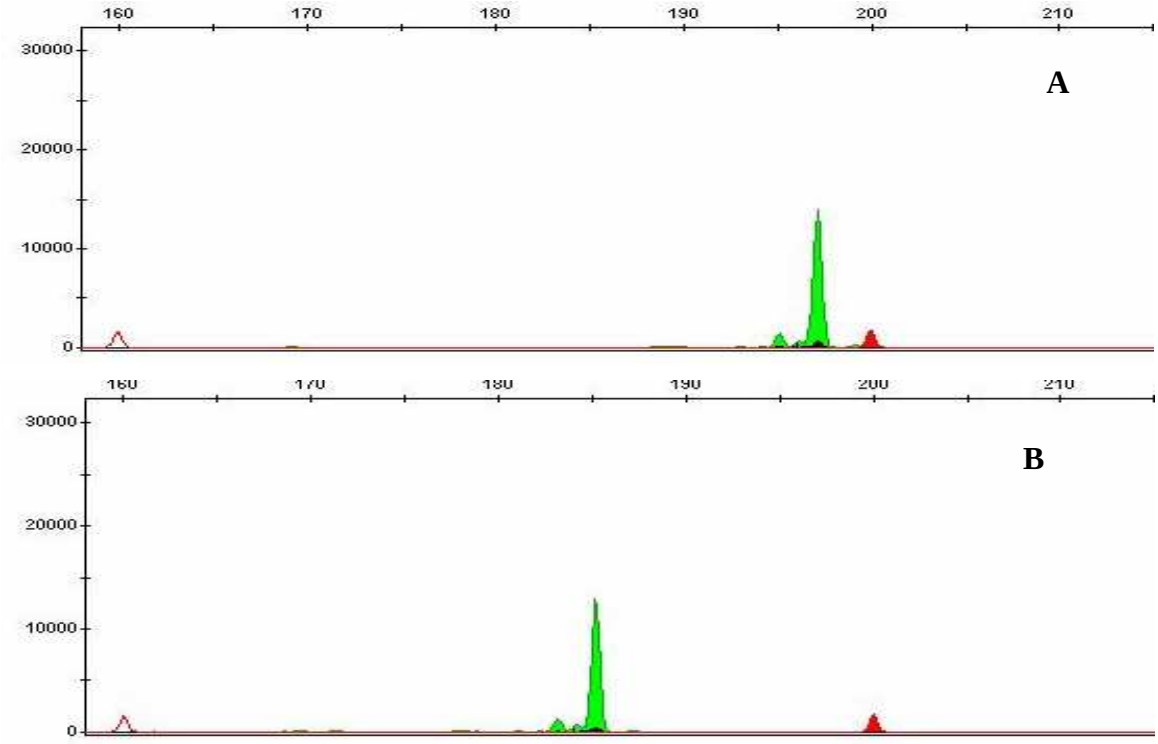

Figura 2 - Eletroferogramas com picos dos dois alelos do microssatélite SSR-IAC143 com a florescência HEX (coloração verde). Os picos com coloração vermelha são do "Rox" (padrão de peso molecular). GeneMapper® v3.7 (Applied Biosystems). A parte (A) da figura corresponde ao alelo de maior peso molecular, enquanto que a parte (B) da figura corresponte ao alelo de menor peso molecular.

O “primer” universal comumente usado até hoje é o M13, derivado do bacteriófago M13, um importante vetor já há muito tempo usado no seqüenciamento de DNA (DAVID et al., 1993). Na genotipagem por fluorescência, ele é muito usado por caracterizar uma seqüência muito diferente de seqüências de plantas, o que garante que ele irá anelar, durante a PCR, apenas com a seqüência de interesse (INAZUKA et al., 1996; KRISHNA et al., 2004).

3.4 Análise dos AFLPs

Para realizar as amplificações dos 60 acessos de feijão comum do tipo Carioca com os marcadores AFLPs, utilizou-se a metodologia proposta por VOS et al. (1995) com algumas modificações, conforme descrito a seguir:

(1) Digestão do DNA genômico total: 100 ng de DNA foram digeridos utilizando a combinação de duas enzimas de restrição, sendo uma de corte raro (*Eco*RI), e a outra de corte freqüente (*Mse*I). A digestão se deu em um volume final de 20 µL contendo 5 U da enzima *Eco*RI (New England Biolabs), 5 U da enzima *Mse*I (New England Biolabs), 2 µL de tampão 2 (tampão da enzima *Mse*I), 2 µg de BSA (New England Biolabs). A solução de digestão foi incubada em termociclador MyCycler da BioRAD durante 4 horas a 37ºC para a digestão do DNA e, após para efetuar a inativação das enzimas, a solução permaneceu por mais 20 minutos a 65 ºC.

(2) Ligação dos adaptadores: adaptadores específicos contendo as seqüências das enzimas *Eco*RI (5’- CTCGTAGACTGCGTACC – 3’/ 5’- CTGACGCATGGTTAA -3’) e *Mse*I (5’- GACGATGAGTCCTGAG – 3’/ 5’ - TACTCAGGACTCAT - 3') foram ligados às extremidades dos fragmentos de DNA gerados pela restrição. Os adaptadores de fita dupla foram previamente preparados misturando-se quantidades equimolares dos dois oligos de fita simples (300 pMols da seqüência do adaptador da enzima *Eco*RI, e 3000 pMols da seqüência do adaptador da enzima *Mse*I). A solução foi aquecida a 94ºC por 2 minutos no termociclador MyCycler da BioRAD, e foi resfriada lentamente em temperatura ambiente. A ligação dos adaptadores às extremidades dos fragmentos foi realizada adicionando-se 20 µL da reação de digestão, 3,0 µL de T4 “Buffer” (Invitrogen), 0,5 µL (5 pMol/ µL) do adaptador da enzima *Eco*RI, 0,5 µL (50 pMol/ µL) do adaptador da enzima *Mse*I, 0,5 µL de ATP à 10mM (Invitrogen), 0,5 µL de T4 DNA ligase à 1U/ µL (Invitrogen) e 5,0 µL de água Milliq autoclavada, sendo que o volume

final de reação é igual a 30 µL. A ligação foi realizada por 16 horas a 16ºC, seguido por um período se 20 minutos a 65ºC no termociclador MyCycler da BioRAD.

(3) Reação de pré-amplificação: esta reação foi realizada utilizando-se "primers" específicos contendo as seqüências das enzimas *Eco*RI e *Mse*I. A reação foi feita em um volume final igual a 15 µL contendo 3,0 µL da reação de ligação diluída 6x em água Milliq autoclavada, 1,5 µL de tampão 10X, 0,9 µL (25 mM) de cloreto de magnésio, 0,9 µL (2,5 mM) de mix de dNTPs, 1,2 µL (10 µM) de "primer" contendo a seqüência da enzima *Eco*RI (5' - AGACTGCGTACCAATTC - 3'), 1,2 µL (10 µM) de "primer" contendo a seqüência da enzima *Mse*I (5'- GATGAGTCCTGAGTAA), 0,3 µL (1 U/ µL) da enzima *Taq* DNA polimerase, e 6,0 µL de água Milliq autoclavada. Esta mistura foi incubada por 2 minutos a 94 ºC, e em seguida foi submetida a 26 ciclos nas seguintes condições: 94ºC por 30 segundos, 56ºC por 30 segundos e 72ºC por 1 minuto. Os produtos da reação foram diluídos 10X em água Milliq autoclavada e foram armazenados a -20 ºC.

(4) Amplificação seletiva: Um total de 10 "primers" de *Eco*RI e de 10 "primers" de *Mse*I, contendo três nucleotídeos seletivos cada, foram sintetizados, possibilitando desta forma realizar 100 possíveis combinações para a genotipagem dos 60 genótipos. A fim de verificar o grau de polimorfismo gerado a partir de cada combinação, cinco acessos dentre os 60 foram selecionados para realizar a genotipagem das 100 possíveis combinações, sendo que as 20 combinações mais polimórficas de "primers" específicos para os adaptadores acrescidos de 3 bases seletivas na extremidade 3' foram utilizados neste processo (Tabela 3). A reação de amplificação foi realizado em um volume final de 15 µL contendo 3,0 µL da reação de pré-amplificação diluída 10X em água Milliq autoclavada, 1,5 µL de tampão 10x, 0,9 µL (2,5 mM) de cloreto de magnésio, 0,9 µL de mix de dNTPs (2,5 mM), 1,2 µL "primer" (10 µM) contendo a seqüência da enzima *Eco*RI com mais três bases seletivas na extremidade 3', 1,2 µL de "primer" (10 µM) contendo a seqüência da enzima *Mse*I com mais três bases seletivas na extremidade 3', 0,3 µL (1 U/ µL) da enzima *Taq* DNA polimerase, e 6,0 µL de água Milliq autoclavada. Esta mistura foi incubada por 2 minutos a 94 ºC, e em seguida foi submetida a 12 ciclos nas seguintes condições: 94ºC por 30 segundos, 65ºC por 30 segundos e 72ºC por 1 minuto; após seguiu-se 23 ciclos nas seguintes condições: 94ºC por 30 segundos, 56ºC por 30 segundos e 72ºC por 1 minuto e 72ºC por 5 minutos.

Tabela 3 - Seqüências das combinações de pares de "primers" que foram utilizadas para realizar o processo de amplificação seletiva dos marcadores AFLPs.

Combinações de pares de "primers"
*Eco*RI (GACTGCGTACCAATTC**TAA**/*Mse*I (GATGAGTCCTGAGTAA**GAA**)
*Eco*RI (GACTGCGTACCAATTC**TCA**/*Mse*I (GATGAGTCCTGAGTAA**GAA**)
*Eco*RI (GACTGCGTACCAATTC**TCA**/*Mse*I (GATGAGTCCTGAGTAA**GAC**)
*Eco*RI (GACTGCGTACCAATTC**TCA**/*Mse*I (GATGAGTCCTGAGTAA**GAC**)
*Eco*RI (GACTGCGTACCAATTCTAT/*Mse*I (GATGAGTCCTGAGTAAGTA)
*Eco*RI (GACTGCGTACCAATTCTAT/*Mse*I (GATGAGTCCTGAGTAA**GTG**)
*Eco*RI (GACTGCGTACCAATTCTTA/*Mse*I (GATGAGTCCTGAGTAA**GAT**)
*Eco*RI (GACTGCGTACCAATTCTTG/*Mse*I (GATGAGTCCTGAGTAA**GAA**)
*Eco*RI (GACTGCGTACCAATTCTTG/*Mse*I (GATGAGTCCTGAGTAA**GAT**)
*Eco*RI (GACTGCGTACCAATTC**TCT**/*Mse*I (GATGAGTCCTGAGTAA**GAA**)
*Eco*RI (GACTGCGTACCAATTC**TCT**/*Mse*I (GATGAGTCCTGAGTAA**GAT**)
*Eco*RI (GACTGCGTACCAATTC**TCT**/*Mse*I (GATGAGTCCTGAGTAA**GTA**)
*Eco*RI (GACTGCGTACCAATTC**TCT**/*Mse*I (GATGAGTCCTGAGTAA**GTT**)
*Eco*RI (GACTGCGTACCAATTC**TTT**/*Mse*I (GATGAGTCCTGAGTAA**GTA**)
*Eco*RI (GACTGCGTACCAATTC**TTT**/*Mse*I (GATGAGTCCTGAGTAA**GTC**)
*Eco*RI (GACTGCGTACCAATTC**AAG**/*Mse*I (GATGAGTCCTGAGTAA**CGG**)
*Eco*RI (GACTGCGTACCAATTC**AAG**/*Mse*I (GATGAGTCCTGAGTAA**CCT**)
*Eco*RI (GACTGCGTACCAATTC**AAG**/*Mse*I (GATGAGTCCTGAGTAA**CTC**)
*Eco*RI (GACTGCGTACCAATTC**ACC**/*Mse*I (GATGAGTCCTGAGTAA**CGG**)
*Eco*RI (GACTGCGTACCAATTC**ACC**/*Mse*I (GATGAGTCCTGAGTAA**CCC**)

Os produtos das amplificações seletivas foram submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida denaturantes (7%), corados com nitrato de prata (CRESTE et al., 2001).

3.5 Análise dos resultados

3.5.1 Estimativa de distâncias genéticas e análises de agrupamentos

Para a leitura das bandas polimórficas, a presença (1) e ausência (0) dos fragmentos obtidos em diferentes genótipos foram consideradas, sendo que para os SSRs os dados foram convertidos para freqüências alélicas. Para os AFLPs, a similaridade genética foi calculada de acordo com o coeficiente de similaridade de JACCARD (1908), utilizando o programa NTSYS-pc, versão2.0j ("Exeter Software", NY; RHOLF 1993). Já para os SSRs, as distâncias genéticas foram calculadas utilizando a distância modificada de Rogers (MRD – GOODMAN & STUBER, 1983), através do programa TFPGA, versão 1.3 (MILLER, 1997).

As matrizes de similaridade/distância foram analisadas por UPGMA ("Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Averages"), como sugerido por SNEATH (1979). A correlação cofenética (rcof) entre a matriz de similaridade original e a matriz de similaridade gerada a partir do dendrograma obtido foi produzida como uma forma de avaliar a concordância entre os agrupamentos obtidos com cada marcador e sua estrutura original (BUSSAB et al., 1990).

3.5.2 Análise do Polimorfismo dos Marcadores (PIC – "Polymorphism Information Content")

Os marcadores microssatélites e AFLPs obtidos foram analisados pelo número de alelos por loco, pela freqüência alélica por loco e pelo conteúdo de polimorfismo (PIC) dado pela expressão: PIC = $1-\sum_{i=1}^{n} p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n} 2p_i^2 p_j^2$, onde fi é a frequência do i-ésimo alelo para uma dada marca, somado ao longo dos n alelos (LINCH & WALSH 1998). O PIC fornece uma estimativa do poder discriminatório do loco, considerando o número de alelos que são expressos e também as freqüências relativas destes alelos.

3.5.3 Análise de "Bootstrap"

A análise de "Bootstrap" foi utilizada para verificar a precisão do número de marcas polimórficas de SSRs e AFLPs necessárias para calcular as estimativas das distâncias genéticas entre os pares de genótipos de feijão estudados (TIVANG et al.,

1994). O programa BooD (COELHO, 2002), escrito utilizando a função “RANNUNI” do SAS (SAS INSTITUTE, 1989), foi utilizado para empreender estas análises.

3.5.4 Análise multivariada

A representação dos agrupamentos formados entre os cultivares de feijões cariocas foi realizada pela análise de coordenadas principais (PCO - GOWER, 1966), em três dimensões, utilizando o “software” NTSYS (RHOLF, 1993).

3.5.5 Teste de atribuição de indivíduos a grupos

Com base na estatística bayesiana, o programa Structure (PRITCHARD et al., 2000) foi utilizado alternativamente para inferir os agrupamentos. O número de grupos variou de K=2 a K=15, com cinco repetições de cada K conduzidas usando o modelo “admixture”, para os dados dos SSRs, e o modelo de “no admixture” para os dados dos AFLPs. As freqüências dos alelos foram correlacionadas, ultilou-se 200.000 de período de “burn” e 500.000 de MCMC (http://cbsuapps.tc.cornell.edu/structure.aspx), para haver uma melhor acuracidade nos resultados gerados. Para verificar qual K era o mais adequado para inferir os agrupamentos, foi calculada a razão de verossimilhança do conjunto de dados obtidos pela análise do Structure, sendo que a média de cada Ln (logaritmo de maior probabilidade de origem individual para encontrar-se em um mesmo “cluster”) é calculada (LnPD), e o maior valor da razão de verossimilhança (LnPD) forneceu a melhor estimatica de K para o conjunto de acessos avaliados, com o menor desvio.

3.5.6 Associação entre as medidas de distâncias genéticas para os diferentes tipos de marcadores (AFLPs e SSRs)

Para realizar a associação (correlação) das matrizes obtidas por meio do agrupamento UPGMA, geradas com os resultados da genotipagem dos marcadores SSRs e AFLPs, a função Mxcomp do “software” NTSYS-pc, versão2.0j (“Exeter Software”; RHOLF 1993) foi utilizada empregando o teste de Mantel (MANTEL, 1967). Para efetuar a correlação das matrizes foi necessário converter os dados da

matriz de dissimilaridade (SSRs) para uma matriz de similaridade, sendo que uma é complemento do valor da outra para integrar a unidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Genotipagem com os marcadores microssatélites (SSRs)

A genotipagem de 85 microssátelites foi realizada por meio da análise de géis de poliacrilamida denaturante corados com nitrato de prata. Visando aperfeiçoar a técnica e reduzir os gastos com a preparação de diversos géis de poliacrilamida, em um mesmo gel, foram aplicados dois diferentes microssatélites, sendo que em uma primeira aplicação colocou-se os 30 primeiros acessos amplificados com um SSR, seguidos do "ladder" de 10 pb, e depois os outros 30 acessos com outro SSRs, juntamente com outra aplicação do "ladder" de 10 pb. Após a entrada do DNA até 1/3 do gel, efetuou-se a segunda aplicação dos outros 30 genótipos amplificados com cada microssatélite (Figuras 3 e 4).

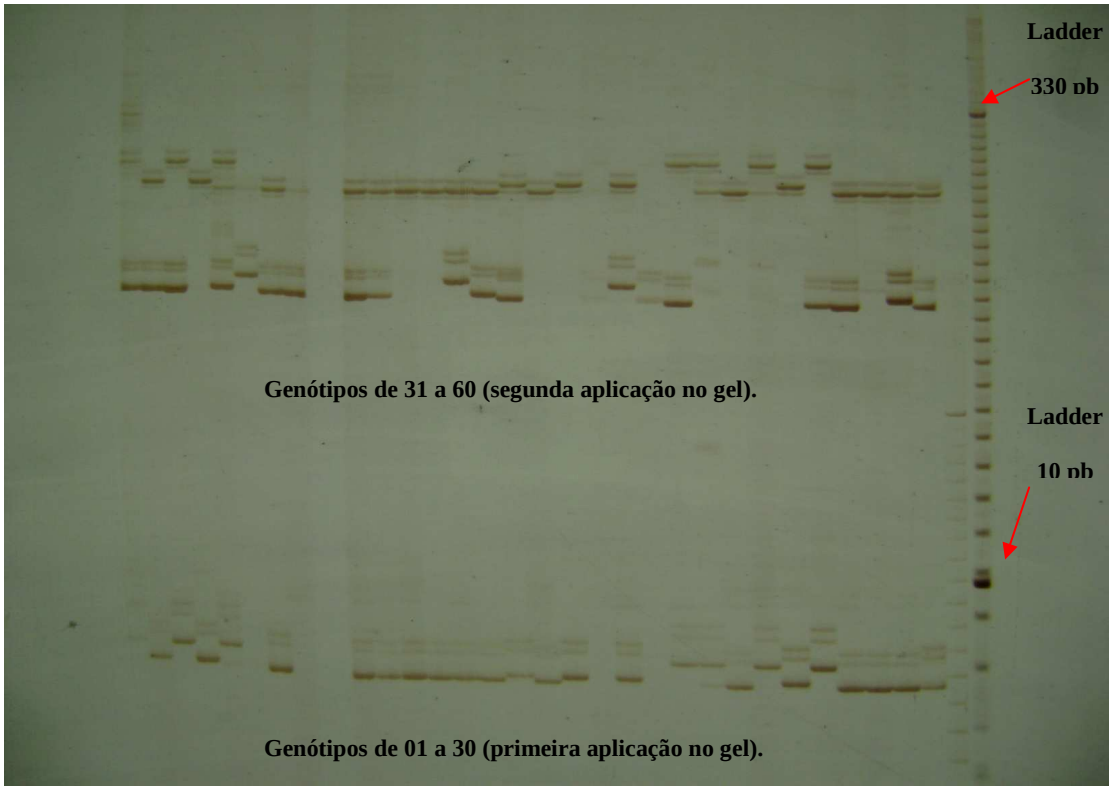

Figura 3 - Perfil do microssatélite SSR-IAC62 (polimórfico) em gel de acrilamida 6% corado com nitrato de prata, com produtos de tamanho de 198 – 210 pb (pares de base), em feijão comum.

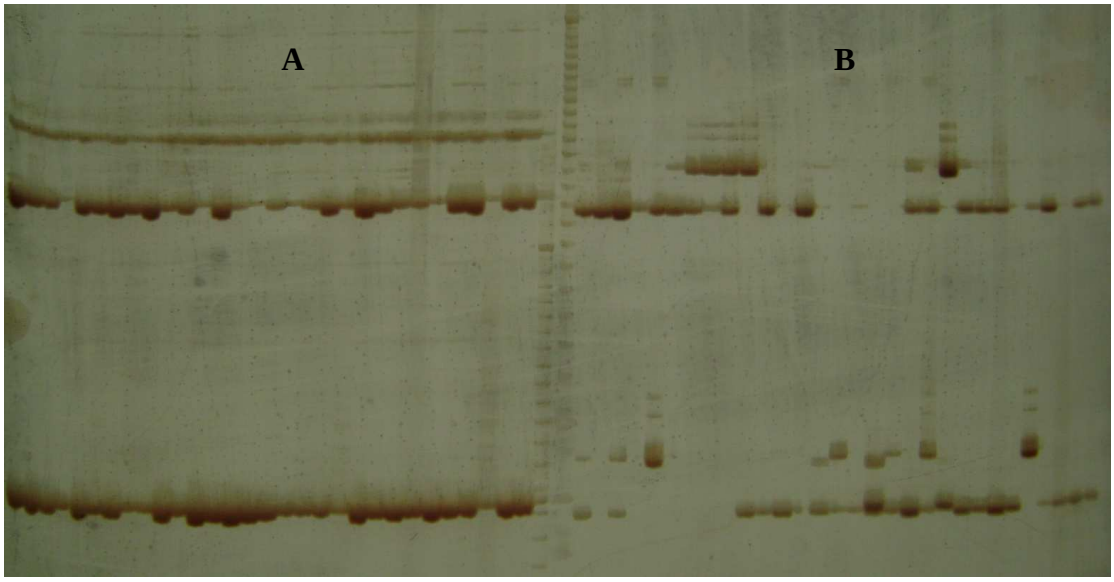

Figura 4 - Perfil dos microssatélites SSR-IAC127(A), com tamanhos entre 168-170, e SSR-IAC128 (B) com produtos de tamanho de 168-190 em gel de acrilamida 6% corado com nitrato de prata, em feijão comum. Ambos marcadores apresentaram padrão polimórfico.

Dos 85 microssatélites utilizados, 70 (82,4%) apresentaram padrão polimórfico e 15 (17,6%) padrão monomórfico (Tabela 4). Por meio da genotipagem dos 60 acessos do tipo Carioca, utilizando 50 microssatétiltes foi gerado um total de 120 bandas polimórficas. O número de alelos variou de 2 a 4, com uma média de 2,4 alelos por loco, sendo que os maiores números de alelos observados foram encontrados nos locos SSR-IAC10, SSR-IAC11, SSR-IAC46, SSR-IAC62 e SSR-IAC68 (com 4 alelos cada). Números idênticos de alelos por loco foram encontrados por CAMPOS et al. (2007) e HANAI et al. (2007). CAMPOS et al. (2007) avaliaram 20 microssatélites a partir de 14 acessos de feijão comum do Banco de Germoplasma do IAC, incluindo genótipos Andinos e Mesoamericanos. Quinze microssatélites apresentaram padrão polimórfico, apresentando valor médio de 2,07 alelos por loco. HANAI et al. (2007) avaliaram 40 microssatélites em 23 genótipos de feijão comum de origem Mesoamericana e Andina, utilizando microssatélites de origem gênica (provenientes de ESTs) e de origem genômica. Do total de microssatélites, 26 SSRs apresentaram padrão polimórfico, sendo que foi encontrado de 2 a 7 alelos por loco.

Tabela 4 - Dados dos 85 microssatélites que foram utilizados para genotipar os 60 acessos de feijão comum do grupo 'Carioca'. Dos 85 SSRs selecionados, 20 foram genotipados utilizando a técnica de fluorescência (*).

Nº	**Nomenclatura dos SSRs**	**Motivos**	**Ta**	**Tamanho dos fragmentos amplificados**	**Nº de alelos**	**PIC**
01	SSR-IAC01*	(CT)8	56	240-262	2	0,43
02	SSR-IAC05	(TG)6(GA)5 (AG)10 (ACA)5	50	164-166	2	0,10
03	SSR-IAC09	(CA)9C (CA)2(TA)6	56	160-168	2	monomórfico
04	SSR-IAC10	(GA)12(AG)6 (AG)6	56	176-188	4	0,68
05	SSR-IAC11	(GA)24	56	186-204	4	0,60
06	SSR-IAC13	(GA)10A (GA)4GG (GA)9	56	180	1	monomórfico
07	SSR-IAC14*	(GT)7	56	226-256	5	0,30
08	SSR-IAC16	(GA)8	56	220-224	3	0,29
09	SSR-IAC18*	(GT)8	56	270-300	3	0,59
10	SSR-IAC20	(GA)7AA (GA)2	56	182	1	monomórfico
11	SSR-IAC21	(AC)6	56	138-140	2	0,40
12	SSR-IAC22	(TA)8(GA)9	56	146-148	2	0,09
13	SSR-IAC24	(AC)7(AT)6	56	166-168	2	0,06
14	SSR-IAC25	(CA)6CAA (CA)2 CAA(CA) 3CG (CA)5	56	260-300	3	0,49
15	SSR-IAC27	(GT)5	56	260-278	2	0,11
16	SSR-IAC28	(GT)5(TC)10(TA) 14	56	280	1	monomórfico
17	SSR-IAC29	(GA)23	56	58-158	2	0,10
18	SSR-IAC32*	(TG)7 (TA)6	56	62-80	3	0,48
19	SSR-IAC34	(GA)12	56	180-182	2	0,49
20	SSR-IAC35	(CT)5	56	240-242	2	0,50
21	SSR-IAC45	(TG)5	56	202	1	monomórfico
22	SSR-IAC46	(CA)7	56	220-260	4	0,63
23	SSR-IAC47*	(GA)20	56	300-330	4	0,56

Continua

Tabela 4 - *Continuação*

24	SSR-IAC49	(AG)9	56	228-230	2	0,13
25	SSR-IAC51	(GA)5 CA (GA)9 CA (GA)2	56	150-160	2	0,25
26	SSR-IAC52	(GA)11	56	221-225	3	0,56
27	SSR-IAC53	(GA)9	56	164-168	3	0,52
28	SSR-IAC54	(AC)6 CAAA (TA)3 C (AT)5	56	110-112	2	0,09
29	SSR-IAC55	(GA)13	56	194-202	3	0,52
30	SSR-IAC56*	(AC)8	56	270-300	3	0,37
31	SSR-IAC57	(GT)5	56	280	1	monomórfico
32	SSR-IAC58	(TG)10	56	184	1	monomórfico
33	SSR-IAC59*	(AC)7	61	35-170	3	0,55
34	SSR-IAC62	(AG)14	45,3	198-210	4	0,67
35	SSR-IAC63	(AC)6	59,8	210	1	monomórfico
36	SSR-IAC64*	(AC)6	56	270-290	4	0,53
37	SSR-IAC65	(TG)5	60	270-272	2	0,10
38	SSR-IAC66	(GA)10	56	136-144	3	0,49
39	SSR-IAC67	(GT)7	56	110	1	monomórfico
40	SSR-IAC68	(CT)8	56	260-272	4	0,53
41	SSR-IAC70	(AC)8	60	186-188	2	0,48
42	SSR-IAC73	(AT)6(GT)6	60	198-230	3	0,53
43	SSR-IAC77	(CA)6(CT)4	60	188-190	2	0,44
44	SSR-IAC83	(TC)11	45	250-260	3	0,61
45	SSR-IAC87	(AC)9	63,5	220-240	3	0,41
46	SSR-IAC88	(CA)7(AT)7	60	210-220	3	0,52
47	SSR-IAC91	(AC)3(TC)2	60	200-210	2	0,06
48	SSR-IAC96	(CA)5(TA)2	60	254-258	2	0,47
49	SSR-IAC97	(AC)3(TC)2	60	240	1	monomórfico
50	SSR-IAC98	(CT)8(TA)3(TG)8	60	230-290	3	0,60
51	SSR-IAC100	(AT)4(GT)8	60	206-210	2	0,09
52	SSR-IAC101	(AC)7	60	186-190	2	0,29
53	SSR-IAC102	(CT)7 GTCA (CT)8	60	176-178	2	0,39
54	SSR-IAC127	(TA)3 T (TGA)3 G (TA)3	63,3	168-170	2	0,50
55	SSR-IAC128	(AC)7 GGA (TC)2	56,7	168-190	2	0,31

Continua

Tabela 4 - *Continuação*

56	SSR-IAC129	(TG)2 G (CT)2 TCT (GA)2	56,7	250-258	2	0,47
57	SSR-IAC134	(AC)6	56,7	218-250	2	0,41
58	SSR-IAC136	(CA)7 (AT)5	56,7	240-270	2	0,43
59	SSR-IAC141	(TCT)3 A (CT)13	59,4	214-218	2	0,40
60	SSR-IAC143*	(TC)2 T (TC)2 T (TC)2	63,3	170-200	4	0,51
61	SSR-IAC144*	(CT)10	56,7	170-220	4	0,70
62	SSR-IAC147	(CA)5	56,7	230-240	2	0,46
63	SSR-IAC155	(AG)9	56,7	196-200	2	0,04
64	SSR-IAC156	(TC)3 TG (GC)2	56,7	230	1	monomórfico
65	SSR-IAC159	(AC)6/(AC)4 C (CT)2	56,7	284-296	2	0,29
66	SSR-IAC160	(TG)2 (TA)2 (TG)5	56,7	170-174	2	0,44
67	SSR-IAC166	(CA)2 AA (AC)3/(TA)2 GAC (TG)3	56,7	186-190	2	0,05
68	SSR-IAC167	(TG)7 (CG)3	56,7	138-168	2	0,34
69	SSR-IAC174	(AT)3 A (AT)2 (AC)7 TTT (CA)3	53,2	140	1	monomórfico
70	SSR-IAC179	(AC)2 CTTT (AC)2 CTA (TC)5	63,3	180-186	2	0,48
71	SSR-IAC180	(AC)3 T (CA)3 TAA/ (AC)3(AC)3 G (CA)2	63,3	206	1	monomórfico
72	SSR-IAC181	(AT)2 AC (AT)3/(AG)5 TAA (AG)2 C (AG)2	58,4	120	1	monomórfico
73	SSR-IAC183	(AG)18 A (AC)4	56	190-196	2	0,27
74	SSR-IAC209	(AC)2 (TG)3	56,7	198-200	2	0,48
75	SSR-IAC211	(CA)10 (TA)8	43,8	176	1	monomórfico
76	FJUNA 128*	(AG)15	60	260-300	6	0,61
77	FJUNA 167*	(AT)4 AG (GT)6/(AT)4 (GT)6	60	290-310	4	0,41
78	FJUNA 210*	(CT)10	60	196-210	4	0,64

Continua

Tabela 4 - *Continuação*

79	FJUNA 232*	(CA)5	60	160-206	3	0,67
80	FJUNA 235*	(AT)2 (GT)3	60	256-300	2	0,36
81	FJUNA 245*	(TC)9	60	200-226	5	0,27
82	FJUNA 258*	(CA)6	60	200-236	4	0,42
83	FJUNA 390*	(GT)4 AT (GT)3	60	190-250	5	0,64
84	FJUNA 399*	(TG)8	60	240-260	4	0,56
85	FJUNA 414*	(AC)11 (AT)12	45	144-296	5	0,69

Adicionalmente, foi realizada a genotipagem dos mesmos acessos com outros 20 microssatélites utilizando a técnica de fluorescência. Um total de 77 bandas polimórficas foi obtido e, o número de alelos variou de 2 a 6, com uma média de 3,9 alelos por loco. Os maiores números de alelos observados foram encontrados pelos microssatélites SSR-IAC14, FJUNA-128, FJUNA245, FJUNA-390 e FJUNA-414.

A técnica de fluorescência mostrou-se mais eficiente para realizar a genotipagem de marcadores microssatélites do que a de gel de poliacrilamida denaturante corado com nitrato de prata, posto que, por meio da fluorescência, foi detectado um maior número de alelos por loco. A técnica de fluorescência é mais refinada para detectar polimorfismo mesmo de 1 pb. É mais eficiente e demanda um tempo menor de preparo e avaliação, facilitando a análise de genotipagem com o intuito de avaliar a variabilidade genética presente em um determinado conjunto de genótipos.

MASI et al. (2003) testaram a eficiência das técnicas de PCR “multiplex” com SSRs e a genotipagem por fluorescência utilizando genótipos de feijão comum. Neste trabalho, os autores concluíram que as duas técnicas são eficientes, economizando o tempo de realização. HAO et al. (2008) utilizaram a técnica de “primers” de SSRs marcados com fluorescência para avaliar a diversidade genética de 5.029 acessos de feijão comum. Os autores formaram um banco de germoplasma na China a partir deste estudo. Os autores concluíram que a técnica de genotipagem utilizando “primers” marcados com fluorescência foi muito eficiente, posto que, permitiu em um período curto de tempo avaliar um grande número de genótipos e dividí-los de acordo com sua variabilidade genética.

Através dos resultados obtidos pela análise realizada pelo programa Structure com os dados obtidos com a genotipagem dos SSRs (Figura 5), foi possível dividir os

acessos em 10 grupos (K=10; Figura 6), sendo que, abaixo se tem os acessos que compõem cada grupo formado:

- Grupo 1: ‘BRS-Cometa’, ‘BRS-Horizonte’, ‘Aporé’, ‘A-449’, ‘BRS-Pontal’, e estes genótipos apresentam o genitor ‘Pérola’ na ascendência (exceto o acesso ‘Aporé’);
- Grupo 2: ‘IAPAR-72’, ‘IAPAR-57’, ‘IPR-Aurora’, ‘MD-806’ e ‘Mex-279’, sendo que os genótipos ‘IAPAR-72’, ‘IAPAR-57’ e ‘MD-806’ apresentam tolerância ao mosaico dourado, que tem como agente causal o vírus BGMV (“Bean Gold Mosaic Vírus”);
- Grupo 3: ‘LH-II’, ‘OPNS-331’, ‘Mar 2’, ‘Taquari’, ‘Pérola’, ‘L-476-2’, ‘Rubi’ e ‘L 507-1’, onde os genótipos ‘LH-II’ e ‘Taquari’ apresentam o genitor ‘Rubi’ na ascendência, e os acessos ‘Pérola’, ‘Mar 2’ e ‘OPNS-331’possuem tolerância a mancha angular, causada pelo patógeno *Phaseoisariopsis griseola* (Sacc.);
- Grupo 4: ‘BRS-Requinte’, ‘BRSMG-Talismã’, ‘Carioca MG’, ‘CV-48’, ‘Branquinho’, ‘Carioca Precoce’, ‘FT-Bonito’ e ‘IAC-Carioca Tybatã’, sendo que destes somente o acesso ‘IAC-Carioca Tybatã’ não possui grão de tamanho pequeno;
- Grupo 5: ‘Caneludo’, ‘FEB-186’, ‘FT-Paulistinha’, ‘FEB-200’, ‘IAPAR-81’, ‘IAC-Carioca Pyatã’, ‘Goytacazes’, ‘IAC-Carioca Aruã e ‘Campeão II’, onde os genótipos ‘FEB-186’ e ‘FEB-200’ possuem tolerância a baixa fertilidade;
- Grupo 6: ‘H96A31-P2-1-1-1-1’, ‘IAC-Alvorada’, ‘Guará’ e ‘IAC-Carioca Akytã’, sendo os acessos ‘H96A31-P2-1-1-1-1’, ‘IAC-Alvorada’ tolerantes ao escurecimento;
- Grupo 7: ‘IAPAR-31’, ‘LP88-175’, ‘Juriti’, ‘OPS-16’, ‘Rudá’ e ‘IAPAR-80’, sendo os acessos ‘IAPAR-31’, ‘LP88-175’ e ‘IAPAR-80’ pertencentes ao programa de melhoramento do IAPAR;
- Grupo 8: ‘Carioca Lustruso’, ‘H96A28-P4-1-1-1-1’, ‘Carioca Comum’, ‘IAC-Ybaté’ e ‘H96A102-1-1-152’, sendo que destes, somente o acesso ‘Carioca Comum’ não possui listra amarela no grão;
- Grupo 9: ‘LP 01-38’, ‘LP 9979’, ‘Z-28’, ‘IAPAR-14’ e ‘TO’, sendo os genótipos ‘LP 01-38’, ‘LP 9979’, ‘IAPAR-14’ pertencentes ao programa de melhoramento do IAPAR, e os acessos ‘TO’ e ‘Z-28’ possuem grãos de tamanho grande;

- Grupo 10: ‘IAC-Votuporanga’, ‘IAC-Carioca Akytã’, ‘IAC-Aysó’, ‘IAC-Carioca’ e ‘IAC-Apuã’, onde todos estes genótipos pertencem ao programa de melhoramento do IAC.

Além disso, foi possível verificar que ocorreu uma distribuição dos genótipos de acordo com a instituição de melhoramento a que pertencem (Grupo 7, Grupo 9 e Grupo 10), sendo que esta divisão pode ser atribuída ao fato de cada instituição de pesquisa que realiza o melhoramento do feijoeiro possuir objetivos específicos para obter novas cultivares, por exemplo, o IAC visa obter cultivares resistentes a antracnose e a mancha angular, enquanto que o IAPAR visa obter cultivares resistentes à seca. Ao observar a divisão dos 60 acessos em 10 grupos, realizada pelo programa Structure, nota-se que exceto pelo Grupo 2, nos demais grupos há uma grande miscigenação alélica (Figura 5), e este fato pode ter ocorrido devido aos cruzamentos realizados para obter estes acessos (Tabela 2), haja visto que nos programas de melhoramento genitores semelhantes são utilizados para obter diferentes variedades.

Relatos em literatura de trabalhos que realizam estudos de variabilidade genética têm utilizado o programa Structure para verificar se a formação dos grupos gerados por dendrogramas são de fato robustos, tais como, em feijão (DÍAS & BLAIR, 2006; BLAIR et al. 2007), em soja (JUN et al., 2007) e em arroz (GARRIZ et al., 2004), sendo que, nestes estudos, os autores encontraram correspondência entre os agrupamentos gerados pela análise de UPGMA com os grupos formados através da análise dos dados com o programa Structure.

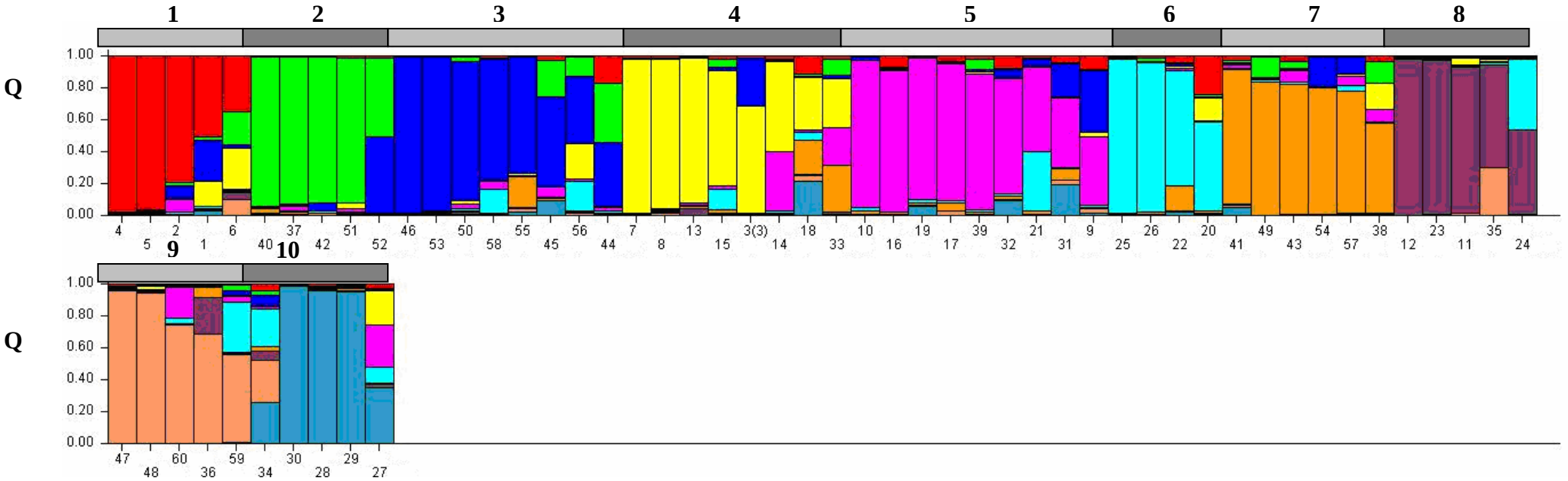

Figura 5 - Representação dos 60 genótipos de feijão comum pertencentes ao grupo 'Carioca' de acordo com a análise bayesiana do programa Structure. Os acessos avaliados foram divididos em 10 grupos (K=10). Os acessos estão representados pelas barras coloridas. A mesma cor em acessos diferentes indica que eles pertencem a um mesmo grupo. Cores diferentes no mesmo genótipo indicam a porcentagem do genoma compartilhado com cada grupo**.** As barras na cor cinza representam os grupos encontrados. Q: coeficiente de partição do indivíduo em cada grupo.

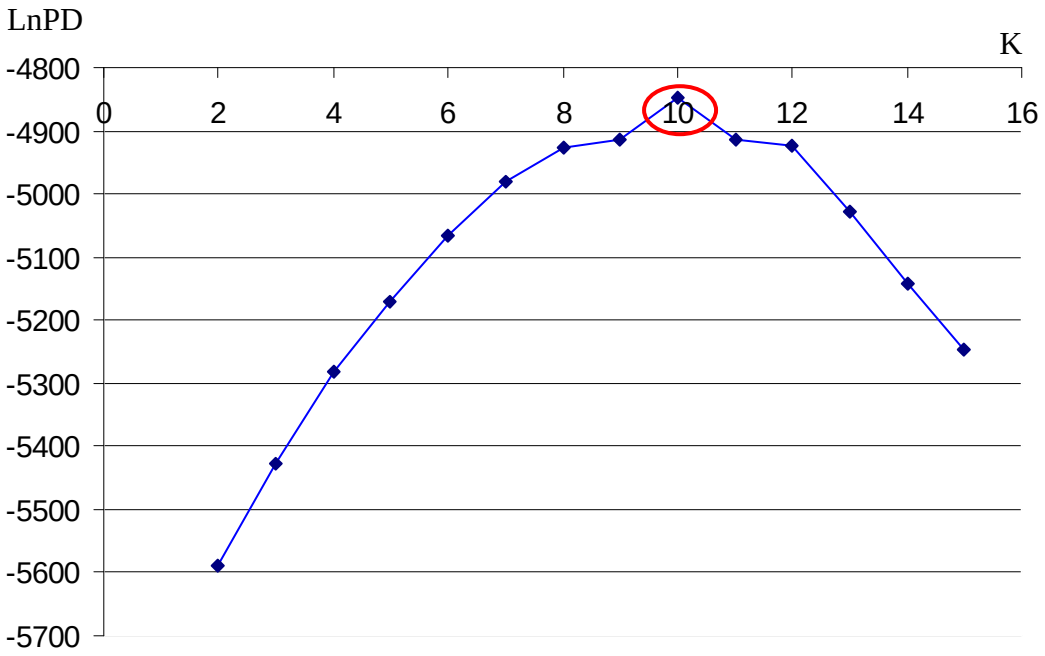

Figura 6 - Gráfico de Pritchard obtido através dos dados gerados pela análise do Structure utilizando os dados da genotipagem os marcadores SSRs, com o K variando de 2 a 15 grupos, sendo que o valor de K mais provável é aquele que possui uma maior verossimilhança (LnPD, circunferência em vermelho).

O dendrograma gerado a partir do agrupamento UPGMA realizado com os dados obtidos pela genotipagem dos SSRs com os 60 acessos de feijão comum pertencentes ao tipo Carioca (Figura 7) revelou que há uma alta variabilidade genética presente entre os acessos e que a estrutura genética deste conjunto de genótipos é fraca, sendo que as distâncias genéticas variaram de 0,37 a 0,63. Valores inferiores de distância genética foram observados por DÍAZ & BLAIR (2006) ao avaliarem a estrutura genética de 60 acessos de feijão comum pertencentes ao "pool" mesoamericano utilizando marcadores SSRs, obtiveram uma variação das distâncias genéticas de 0,26 a 0,46. Sendo assim, os 60 genótipos avaliados por DÍAZ & BLAIR (2006) apresentaram uma menor variabilidade genética do que a encontrada nos 60 acessos de feijão comum do tipo Carioca, pertencentes ao Banco de Germoplasma do IAC.

Além disso, pelo dendrograma, foi possível dividir os 60 genótipos de feijão comum do tipo Carioca em 9 grupos, sendo que para tanto, foi utilizada uma linha de corte em torno da distância genética de 0,58, e a composição de cada grupo identificado está descrita abaixo.

- Grupo 1: ‘A449’, ‘Branquinho’, ‘FT-Bonito’, ‘FT-Porto Real’, ‘BRS-Requinte’, ‘BRSMG-Talismã’, ‘Carioca MG’, ‘Carioca Precoce’, ‘CV-48’, ‘Guará’, ‘IAC-Carioca Apuã’, ‘H96A31-P2-1-1-1-1’, ‘IAC-Alvorada’, ‘Caneludo’, ‘Goytacazes’, ‘FT-Paulistinha’, ‘FEB-200’, ‘IAPAR81’, ‘IAC-Carioca Tybatã’, ‘IAPAR 57’, ‘IAPAR 80’, ‘IAPAR 31’, ‘LP 88-175’, ‘OPS-16’, ‘Juriti’, ‘Rudá’, ‘Iac-Votuporanga’, ‘L-476-2’, ‘LH II’, ‘Taquari’, ‘Pérola’, ‘Mar 2’, ‘OPNS 331’ e ‘Rubi’;
- Grupo 2: ‘FEB-186’, ‘IAC-Carioca Aruã’ e ‘IAC-Carioca Pyatã’;
- Grupo 3: ‘Aporé’, ‘BRS-Cometa’, ‘BRS-Horizonte’, ‘BRS-pontal’, ‘Campeão II’ e ‘L 507-1’;
- Grupo 4: ‘IAPAR 72’, ‘MD 806’, ‘IPR-Aurora’ e ‘Mex 279’;
- Grupo 5: ‘IAC-Aysó’, ‘IAC-Carioca’ e ‘IAC-Carioca Akytã;
- Grupo 6: ‘IAPAR 14’, ‘LP 01-38’ e ‘LP 9979;
- Grupo 7: ‘TO’ e ‘Z-28;
- Grupo 8: ‘Carioca Comum’, ‘Carioca Lustroso’, ‘H96A28-P4-1-1-1-1’ e ‘IAC-Ybaté’
- Grupo 9: ‘H96A102-1-1-152’ (possui o maior grão do conjunto analisado).

Ao realizar a comparação entre os 10 grupos obtidos com a análise do Structure com os 9 grupos obtidos com o dendrograma, foi possível verificar que existem algumas correspondências entre os grupos gerados pelo o dendrograma com os grupos gerados pela análise com Structure com uso de SSRs, sendo que: alguns acessos que compõem o Grupo 1 do dendrograma são os mesmos que foram parcialmente os seguinte grupos do Structure: Grupo 3 (‘Mar 2’, ‘Taquari’, ‘Pérola’, ‘L-476-2’, ‘Rubi’, e ‘LH II’); Grupo 4 (‘BRS-Requinte’, ‘BRSMG-Talismã’, ‘Carioca MG’, ‘CV-48’, ‘Branquinho’, ‘Carioca Precoce’, ‘FT-Bonito’ e ‘IAC-Carioca Tybatã’); Grupo 6 (‘H96A31-P2-1-1-1-1’, ‘IAC-Alvorada’ e ‘Guará’) e Grupo 7 (‘IAPAR-31’, ‘LP88-175’, ‘Juriti’, ‘OPS-16’, ‘Rudá’ e ‘IAPAR-80’). Os acessos ‘Aporé’, ‘BRS-Cometa’, ‘BRS-Horizonte’, ‘BRS-Pontal’ estão tanto no Grupo 3 do dendrograma quanto no Grupo 1 do Structure. Enquanto que, o Grupo 5 do dendrograma possui todos os acessos inseridos no Grupo 10 do Structure, e o Grupo 8 do dendrograma é composto pelos mesmos acessos do Grupo 8 do Structure, com a exceção do genótipo ‘H96A102-1-1-152’.

O indicativo do desempenho de análise do agrupamento para os dados da genotipagem com SSRs dos 60 acessos do tipo Carioca foi obtido pelo coeficiente de correlação cofenética (r_{cof}), entre a matriz de dissimilaridade original e a matriz cofenética. O r_{cof} obtido foi de 0,66, indicando que o dendrograma não forneceu a melhor representação das relações genéticas expressadas pelas distâncias genéticas obtidas para o conjunto original dos dados. De fato, as distâncias genéticas não foram bem traduzidas nos agrupamentos, visto que cada indivíduo formou quase um agrupamento único, indicando que a estrutura genética deste conjunto é de fato fraca.

A análise de "Bootstrap" empregada para avaliar a acuracidade dos agrupamentos gerados pelas análises com SSRs apresentou também uma baixa representatividade estatística para a maioria dos nós, o que mostra que os agrupamentos gerados não estão estáveis, ou seja, caso outros SSRs sejam incorporados à análise, a estrutura do dendrograma pode ser alterada (Figura 7).

O maior valor de PIC encontrado foi de 0,70 (SSR-IAC144) e o menor PIC foi de 0,03 (SSR-IAC155) (Tabela 4). Os valores demonstraram que, no geral, os locos avaliados apresentam uma boa informatividade. Outros trabalhos ao utilizarem marcadores microssatélites em feijão encontraram valores semelhantes de PIC. MÉTAIS et al. (2002), em um estudo com 45 linhagens diferentes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), encontraram valores de PIC entre 0,12 a 0,72, sendo estes valores referentes a 15 marcadores microssatélites. BENCHIMOL et al. (2007) ao avaliarem a diversidade genética de variedades Andinas e Mesoamericanas, utilizando microssatélites, obtiveram uma variação no valor do PIC de 0,05 a 0,83. Contudo deve-se lembrar que os genótipos avaliados eram mais divergentes, e, além disso, a informatividade oferecida pelos SSRs é dependente do número e tipo de genótipos que são avaliados. Dos microssatélites utilizados por BENCHIMOL et al. (2007), 53 SSRs foram os mesmos utilizados para realizar a análise de diversidade para os 60 genótipos de feijão do tipo Carioca, e destes 6 SSRs apresentaram valores de PIC semelhantes (SSR-IAC-01, SSR-IAC32, SSR-IAC55, SSR-IAC64, SSR-IAC70 e SSR-IAC-83).

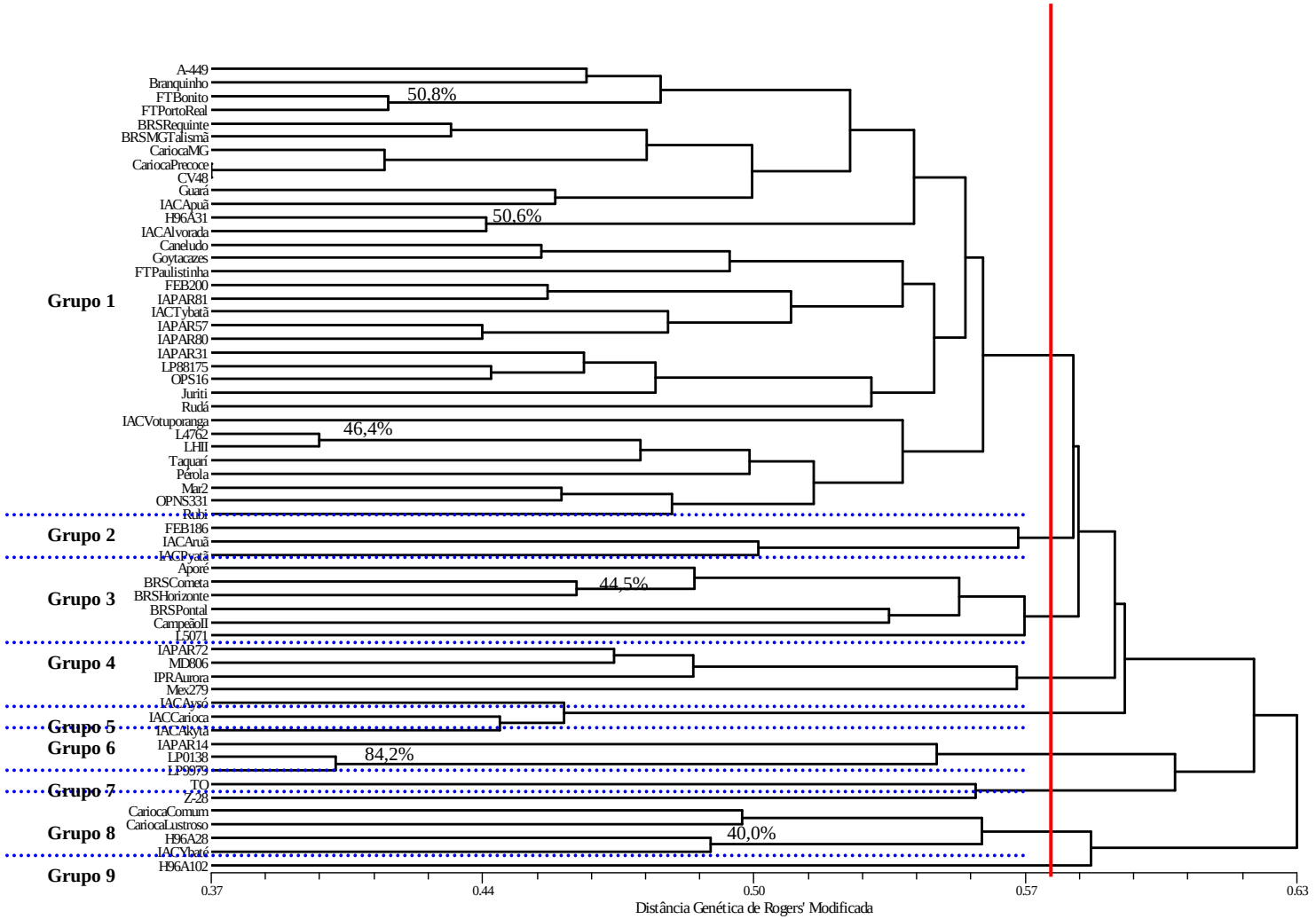

Figura 7 - Dendrograma dos 60 genótipos de feijão comum do tipo Carioca, gerado a partir da análise de UPGMA com os dados da genotipagem realizada com os 70 marcadores polimórficos do tipo microssatélites. Os valores de "Bootstrap" obtidos estão representados na forma de porcentagem (apenas para valores igual ou acima de 40%). As linhas em azul representam os 9 grupos que podem ser visualizados no dendrograma, com o ponte de corte indicado (linha vermelha).

A análise de coordenadas principais (PCO), realizada em três eixos, explicou 20,95% da variância do total dos dados (1º eixo - 7,61%; 2º eixo - 6,98% e 3º eixo - 6,35%), sendo que esta variância foi baixa, mas está de acordo com o observado por outros trabalhos (BENCHIMOL et al., 2006; ZHANG et al., 2008). Como cerca de 80% da variância dos dados foi perdida, esta análise não foi capaz de agrupar claramente os acessos (Figura 8). Entretanto, foi possível constatar que o 'Carioca Comum' se distanciou geneticamente dos demais genótipos com grãos do tipo Carioca (exceto do 'IAC-Ybaté'). Isto é interessante, pois na prática há o senso comum de que todos as cultivares cariocas são semelhantes, já que o 'Carioca Comum' foi a base genética do melhoramento dos demais acessos do tipo Carioca. MENEZES et al. (2004) e PALOMINO et al. (2005), ao avaliarem a diversidade genética de genótipos de feijão comum pertencentes ao grupo 'Carioca', utilizando marcadores RAPDs, também constataram que os genótipos do tipo Carioca utilizados atualmente pelos agricultores e pelos pesquisadores em programas de melhoramento são bem diferentes do 'Carioca Comum' original. Este deu origem aos demais grãos do mesmo grupo, e portanto, caso o melhorista deseje resgatar características agronômicas de interesse que pertençam ao acesso 'Carioca comum' original, este deverá ser re-introduzido nos programas de melhoramento do feijoeiro.

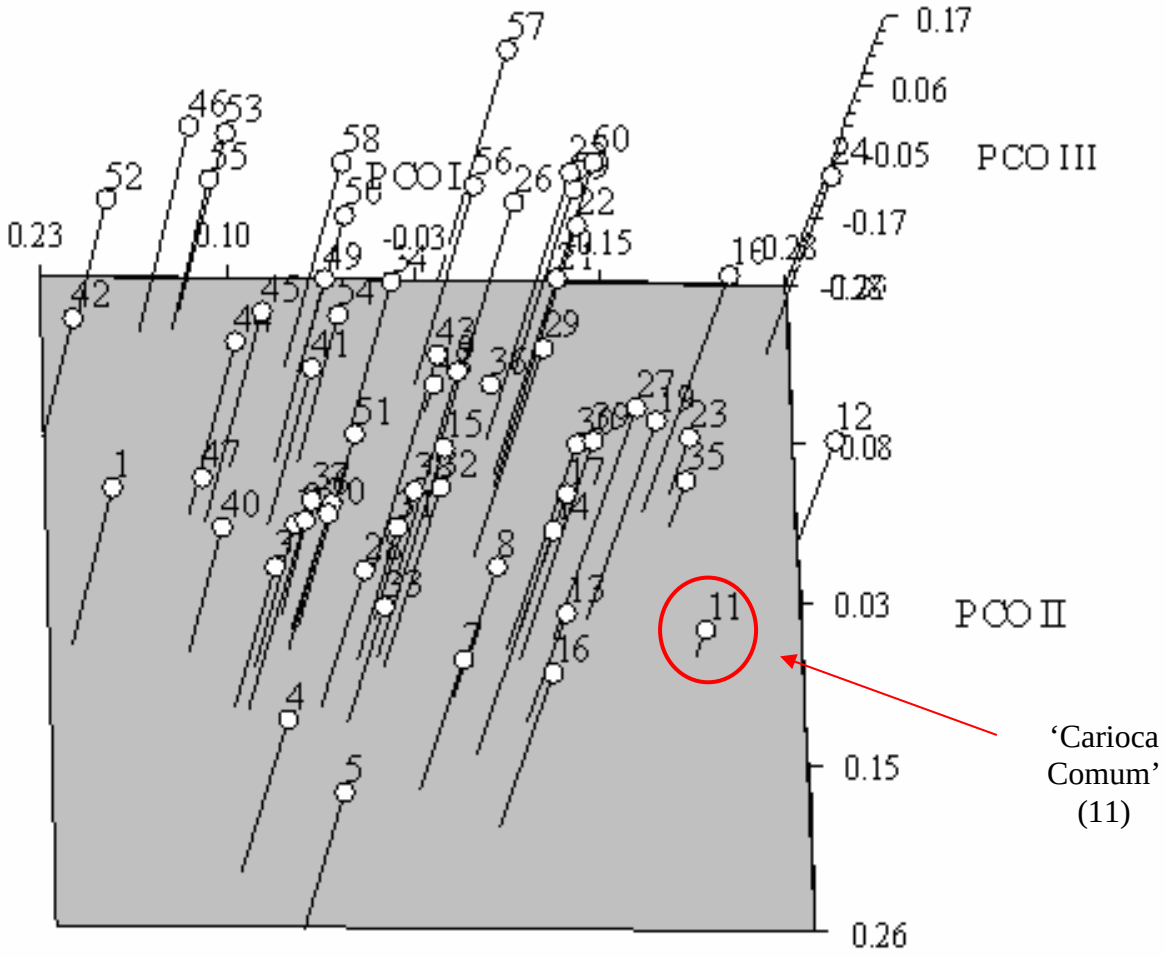

Figura 8 - Análise de coordenadas principais (PCO) realizada com os dados obtidos por SSRs em 60 acessos de feijão comum do tipo Carioca. Os acessos estão representados por números, sendo que a correspondência com os nomes dos genótipos encontra-se na Tabela 2.

4.2 Genotipagem com os marcadores AFLPs

A partir de 20 combinações de "primers" específicos foi obtido um total de 725 bandas, sendo que 635 (87,6%) apresentaram padrão polimórfico (Figura 9) e 90 (12,4%) apresentaram padrão monomórfico. O número de fragmentos amplificados por par de "primers" variou de 71 (E-TAA/M-GAA) a 20 (E-ACC/M-CGG) (Tabela 5). Outros trabalhos realizados com feijão comum utilizando marcadores AFLPs também observaram índices elevados de polimorfismo. KUMAR et al. (2008), por meio de 8 combinações de *Eco*RI com *Mse*I, avaliaram a diversidade genética de 44 acessos de

feijão comum, sendo que foram gerados um total de 820 locos, e destes, 698 locos foram polimórficos (85%). SVETLEVA et al. (2006) caracterizaram molecularmente 78 feijões por meio de marcadores ISSRs e AFLPs. Ao todo, os autores utilizaram 4 seqüências de ISSRs e 3 combinações de *Eco*RI com *Mse*I, sendo que foram obtidos 164 locos AFLPs (32,9% de polimorfismo). PAPA & GEPTS (2003) utilizaram 20 combinações *EcoR*I com *Mse*I, sendo que foi obtido um total de 213 locos. Destes, 192 (90,1%) apresentaram padrão polimórfico. Sendo assim, é possível constatar que por meio da análise de diversidade realizada com os marcadores AFLPs, os 60 acessos de feijão comum do tipo Carioca são bastante divergentes.

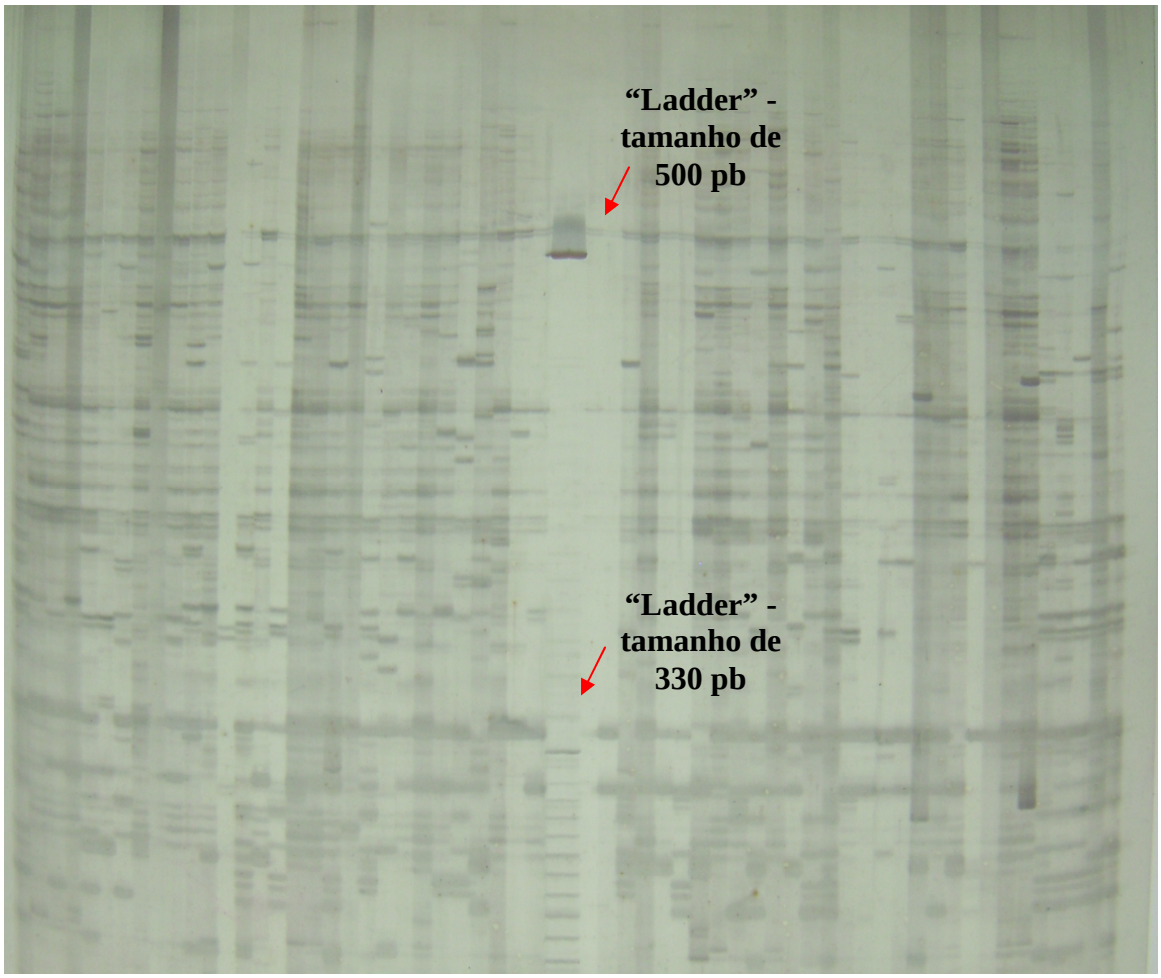

Figura 9 - Representação da genotipagem dos 60 acessos de feijão comum do tipo Carioca em gel de poliacrilamida 7% corado com nitrato de prata com os marcadores AFLPs (combinação - *Eco*RI GACTGCGTACCAATTC**TTA**/ *Mse*I GATGAG TCCTGAGTAA**GAT**.

Tabela 5 - Combinações de pares de "primers" de AFLPs e suas características, que foram utilizadas na genotipagem dos 60 acessos de feijão comum do tipo Carioca.

Combinação de "primers"	Numero de bandas	Bandas polimórficas	Nível de polimorfismo (%)
E-TAA/M-GAA	71	65	91,5%
E-TCA/M-GAA	23	21	91,3%
E-TCA/M-GAC	24	22	91,6%
E-TCA/M-GAC	33	29	87,9%
E-TAT/M-GTA	33	29	87,9%
E-TAT/M-GTG	59	52	88,1%
E-TTA/M-GAT	34	30	88,2%
E-TTG/M-GAA	24	20	83,4%
E-TTG/M-GAT	32	29	90,6%
E-TCT/M-GAA	27	24	88,9%
E-TCT/M-GAT	37	34	91,9%
E-TCT/M-GTA	41	33	80,5%
E-TCT/M-GTT	42	37	88,0%
E-TTT/M-GTA	54	47	87,0%
E-TTT/M-GTC	26	20	83,4%
E-AAG/M-CGG	47	45	95,7%
E-AAG/M-CCT	33	29	87,9%
E-AAG/M-CTC	39	35	89,7%
E-ACC/M-CGG	20	16	80,0%
E-ACC/M-CCC	26	18	69,2%
Total	725	635	87,6%

Os resultados obtidos pelo programa Structure com os dados de AFLP (Figura 10) permitiram realizar a divisão dos genótipos em dois grandes grupos (K=2, Figura 11), sendo:

- Grupo 1: é composto acessos 'Carioca Precoce', 'FEB-186', 'L 507-1', 'Rubi', 'Rudá', 'Juriti', 'Z-28', 'TO' e 'Taquari', sendo que estes acessos possuem algumas características em comum, como: apresentam alta produtividade, grãos relativamente maiores;
- Grupo 2: é composto pelos genótipos 'A-449', 'Goytacazes', 'IAPAR-31', 'Aporé', 'Guará', 'IPR-Aurora', 'Branquinho', 'H96A-P4-1-1-1-1', 'BRS-Cometa', 'H96A102-1-1-152', 'BRS-Horizonte', 'H96A31-P2-1-1-1-1', 'L-476-2', 'BRS-Pontal', 'IAC-Alvorada', 'LH-II', 'BRS-Requinte', 'IAC-Apuã', 'LP01-38', 'BRS-Talismã', 'IAC-Aysó', 'LP 9979', 'Campeão II', 'IAC-Carioca', 'LP88-175', 'Caneludo', 'IAC-Carioca', 'IAC-Carioca Akytã', 'Mar 2', 'Carioca Comum', 'IAC-

Carioca', 'IAC-Carioca Aruã', 'MD-806', 'Carioca Lustroso', 'IAC-Carioca Pyatã', 'Mex 279', 'Carioca MG', 'IAC-Carioca Tybatã', 'OPNS-331', 'IAC-Votuporanga', 'OPS-16', 'CV-48', 'IAC-Yabaté', 'Pérola', 'IAPAR-14', 'FEB -200', 'IAPAR-57', 'FT-Bonito', 'IAPAR-80', 'FT-Paulistinha', 'IAPAR-81', 'FT-PortoReal' e 'IAPAR-72', e estes acessos possuem grãos relativamente pequenos.

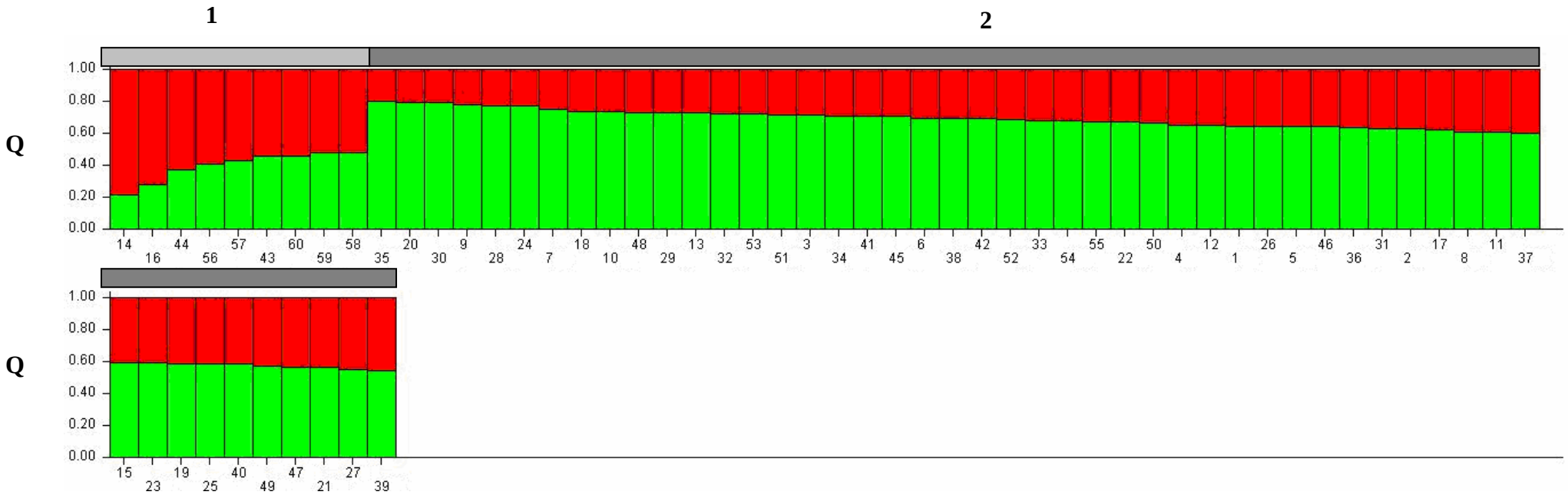

Figura 10 - Representação dos 60 genótipos de feijão comum pertencentes ao grupo ‘Carioca’ genotipados com marcadores AFLPs. Utilizando o programa Structure os acessos avaliados foram divididos em 2 grupos. Os acessos estão representados pelas barras coloridas. A mesma cor em acessos diferentes indica que eles pertencem a um mesmo grupo. Cores diferentes no mesmo genótipo indicam a porcentagem do genoma compartilhado com cada grupo**.** As barras na cor cinza representam os grupos encontrados. Q: coeficiente de partição do indivíduo em cada grupo.

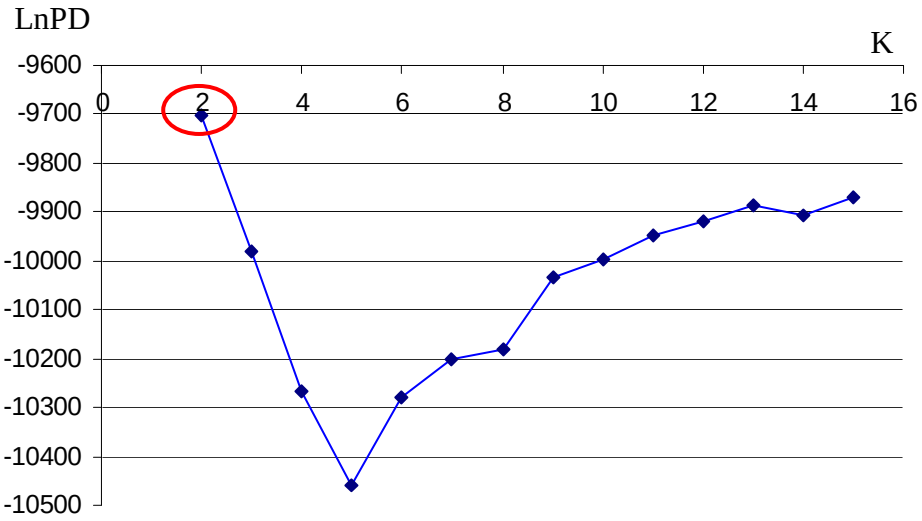

Figura 11 - Gráfico de Pritchard obtido através dos dados gerados pela análise do Structure utilizando os dados da genotipagem os 635 locos polimórficos dos marcadores AFLPs, com o K variando de 2 a 15 grupos, sendo que o valor de K mais provável é aquele que possui uma maior verossimilhança (LnPD, circunferência em vermelho).

A divisão dos acessos em dois grupos realizada pelo Structure para os dados gerados com a genotipagem dos AFLPs não foi tão eficiente e clara quanto a obtida pela mesma análise utilizando os dados da genotipagem dos SSRs, pois na ao observar a divisão dos acessos com os dados dos AFLPs pelo programa Structure (Figura 10) nota-se que não há uma separação distinta dos genótipos, e observa-se um único grupo com um compartilhamento de alelos. Isto indica que a análise realizada pelo programa Structure com os dados dos AFLPs não forneceu uma divisão consistente dos acessos em grupos bem definidos, sendo que isto pode ser atribuído ao fato de que o programa Structure foi desenvolvido para avaliar dados de marcadores codominantes, porém pode-se realizar análises utilizando marcadores de natureza dominante como os AFLPs, porém haverá uma perda de informatividade dos resultados obtidos (PRITCHARD et al., 2000).

O dendrograma gerado a partir da análise com os marcadores AFLPs comprovou que há grande variabilidade genética presente entre os 60 genótipos avaliados (Figura 12). A existência desta variabilidade também foi observada ao realizar a genotipagem dos mesmos acessos com marcadores moleculares do tipo microssatélites. A distância genética variou de 0,09 a 0,63. Entretanto, o dendrograma obtido com AFLPs apresentou uma melhor estruturação genética dos genótipos avaliados do que o obtido com SSRs. Esta variabilidade pode ser explorada pelos pesquisadores para realizar novos cruzamentos no sentido de gerar

cultivares elites que atendam as necessidades do produtor e do consumidor desta leguminosa, mantendo os cruzamentos entre genótipos do tipo Carioca e o tipo de grão.

Utilizando uma linha de corte em torno da distância genética de 0,10, foi possível observar a divisão dos acessos em 5 grupos (Figura 12). Assim, tem-se:

- Grupo 1: é composto por dois subgrupos - (a) Contém os acessos 'A-449', 'Branquinho', 'BRS-Horizonte', 'BRS-Cometa', 'BRS-Pontal', 'BRS-Requinte', 'BRSMG-Talismã', 'Carioca Comum', 'Caneludo' e 'Carioca Lustroso'; e (b) É composto pelos acessos 'Carioca Precoce', 'FEB-186', 'L 507-1', 'IAC-Alvorada', 'Rubi', 'Rudá', 'Taquarí', 'TO', 'Z-28', 'Goytacazes', 'IAPAR-72', 'IPR-Aurora', 'LP 01-38', 'CV-48', 'H96A31-P2-1-1-1-1', 'H96A28-P4-1-1-1-1', 'IAC-Apuã', 'IAPAR-31', IAPAR-57', 'IAPAR-14', 'IAPAR-80', 'Juriti', 'LP88-175', 'Guará', 'Mar 2'. Neste sub-grupo, os acessos 'Carioca Precoce', 'FEB186', 'L 507-1', 'Rubi', 'Rudá', 'Taquari', 'TO' e 'Z-28', são encontrados também no Grupo 1 do Structure (Figura 10);
- Grupo 2: é composto pelos genótipos 'FEB-200', 'FT-Bonito', 'H96A102-1-1-152', 'IAC-Aysó', 'FT-Paulistinha', 'FT-Porto Real', 'MD-806', 'OPS-16', 'Pérola', 'IAC-Carioca', 'IAC-Carioca Akytã', 'IAC-Carioca Pyatã', 'L-476-2', 'LH-II', 'Mex 279', 'OPNS-331', 'IAC-Carioca Tybatã', 'IAC-Votuporanga', 'IAC-Ybaté', 'IAPAR-31';
- Grupo 3: possui os acessos 'Campeão II' e 'LP9979';
- Grupo 4: é formado somente pelo genótipo 'IAC-Carioca Aruã';
- Grupo 5: é composto pelos acessos 'Aporé' e 'Carioca MG'.

PALOMINO et al. (2005) ao avaliarem a diversidade genética 28 genótipos de feijão comum do tipo Carioca utilizando marcadores RAPD verificaram que o acesso 'IAC-Carioca Aruã' apresentou a maior distância genética, sendo que este formou um sub-grupo a parte. Este fato confirmou-se no presente estudo, ou seja, por meio da genotipagem dos acessos com os marcadores AFLPs o acesso 'IAC-Carioca Aruã' também apresentou a maior distância genética (Figura 12), e formou um grupo a parte, isto pode ter ocorrido pois apresentam diferenças químicas e morfológicas para os demais grãos de feijão do tipo Carioca, como baixas taxas de lignina e componentes fenólicos.

Os acessos 'Carioca Comum', 'Pérola' e 'Carioca MG' não possuem uma grande similaridade genética (Figura 12), posto que encontran-se em grupos distintos de acordo com a genotipagem realizada com os marcadores AFLPs. Apesar dos genótipos 'Pérola' e 'Carioca MG' possuírem a cultivar 'Carioca Comum' em suas ascendências, uma baixa similaridade

genética entre estes acessos era esperada, visto que estes acessos diferem em muitas características agonômicas importantes, como resistência a algumas raças da antracnose e da mancha angular. Contudo, MACHADO et al. (2000) MENEZES et al., (2004) realizarem estudos para estimar a diversidade genética de acessos de feijão comum do tipo Carioca utilizando marcadores RAPDs, verificaram que a existência de similaridade genética entre os acessos 'Carioca Comum', 'Pérola' e 'Carioca MG', porém os autores relataram que este resultado não era esperado.

O coeficiente de correlação cofenética (r_{cof}) foi utilizado para verificar o desempenho da análise do agrupamento obtido entre a matriz de dissimilaridade original e a matriz cofenética. O r_{cof} obtido foi igual a 0,75, valor mediano de correspondência entre as distâncias genéticas, obtidas pela análise com os AFLPs, com o agrupamento visualizado no dendrograma de AFLPs.

Mesmo assim, a análise de "Bootstrap" empregada para avaliar a acuracidade dos nós no agrupamento gerado com AFLPs apresentou uma baixa representatividade estatística para a maioria dos nós (Figura 12).

Os locos AFLPs apresentaram um menor poder discriminatório, visto que o menor valor de PIC encontrado foi de 0,03 (E-TAT/M-GTG) e o maior valor de PIC foi de 0,37 (E-AAG/M-CGG). Isto se deve provavelmente ao fato de que os marcadores SSRs revelam a variação intra-alélica, o que não ocorre com os marcadores AFLPs. Os valores de PIC encontrados para este tipo de marcador estão de acordo com outros estudos realizados com estes marcadores em feijão comum (KUMAR et al., 2008).

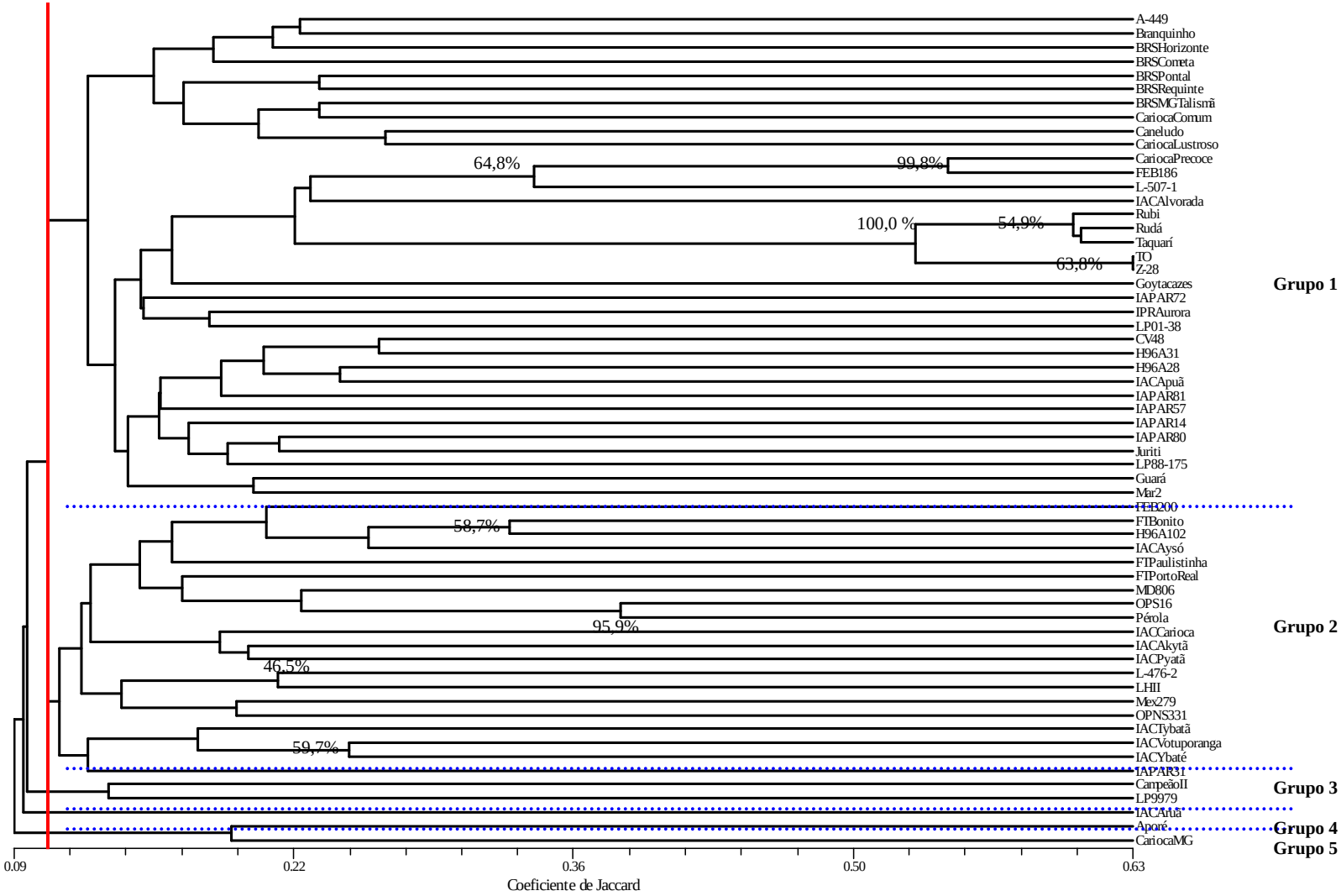

Figura 12 - Dendrograma dos 60 genótipos de feijão comum do tipo Carioca gerado a partir da análise de similaridade genética a partir dos 635 locos AFLPs. Os valores de "Bootstrap" obtidos, acima de 40%, estão representados em porcentagem. As linhas em azul representam a divisão entre os 5 grupos que podem ser visualizados no dendrograma, sendo que para efetuar esta divisão utilizou-se uma linha de corte (linha vermelha).

A análise de coordenadas principais (PCO) realizada com os dados da genotipagem dos 60 acessos de feijão comum do tipo Carioca com marcadores AFLPs demonstrou que o ‘Carioca Comum’ possui perfil molecular distinto dos demais acessos avaliados. Entretanto, a variância dos dados, explicada por esta análise, foi baixa (12,64%; 1º eixo - 5,57%, 2º eixo - 3,87% e 3º eixo - 3,20%), e novamente não adequada para amostrar a diversidade presente no conjunto de genótipos de feijão comum do tipo Carioca avaliados (Figura 13). KUMAR et al. (2008), ao avaliarem a diversidade genética de feijão comum com marcadores AFLPs total demonstraram que os resultados obtidos pela análise do PCO em três dimensões explicaram 6,19% da variação existente entre os acessos estudados. ZHANG et al. (2008) ao avaliarem a diversidade genética de variedades de feijão comum da China observaram que o resultado advindo da análise do PCO em três dimensões explicou 5,6% da variabilidade genética existente entre os genótipos avaliados. Mesmo assim, esta análise evidenciou uma proximidade genética entre as cultivares ‘Rubi’, ‘Rudá’, ‘Taquari’, ‘TO’ e ‘Z-28’. Este agrupamento também pôde ser observado no dendrograma (Figura 12).

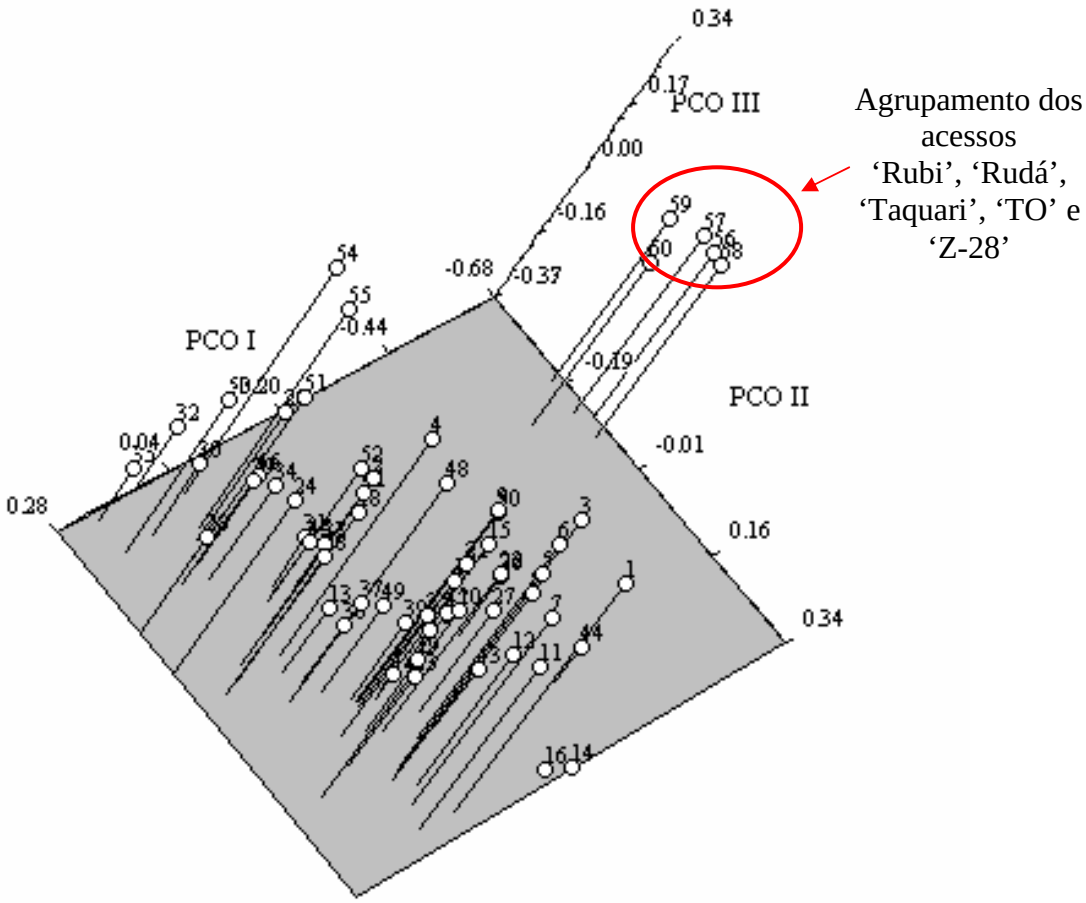

Figura 13 - Representação da análise de coordenadas principais (PCO) realizada com os dados obtidos por meio da genotipagem dos 60 acessos de feijão comum do tipo Carioca com os marcadores AFLPs. Os acessos estão representados por números, sendo que a correspondência com os nomes dos genótipos encontra-se na Tabela 2.

4.3 Comparação das análises empregadas com os marcadores SSRs e AFLPs

O coeficiente de correlação linear das distâncias genéticas obtidas pelos marcadores SSRs e AFLPs foi negativo r = -0.08, ou seja, não houve correlação entre os dendrogramas obtidos, sendo que, deve-se considerar também a natureza codominante e de alta variação dos marcadores SSRs, e que amostra as informações genéticas de forma distinta em relação aos marcadores AFLPs. Enquanto os marcadores SSRs podem ser gênicos ou genômicos e revelam a variabilidade intra-loco, os marcadores AFLPs revelam a variabilidade inter-loco.

Os resultados obtidos pelo presente estudo demosntraram que tanto os marcadores SSRs quanto os marcadores AFLPs utilizados foram eficientes para acessar a diversidade genética presente entre os 60 acessos de feijão comum do tipo Carioca, posto que, por meio destes marcadores foi possível verificar que a estrutura genética do conjunto avaliado não é forte, sendo que esta não estruturação pode ser atribuída ao modo de obtenção dos 60 genótipos de feijão comum do tipo Carioca, ou seja, há ocorrência de diversas recombinações para obter os acessos avaliados (Tabela 2). Os resultados fornecidos pelos marcadores moleculares utilizados neste estudo poderão ser utilizados pelos melhoristas para obter novas cultivares de feijão comum do tipo Carioca, sendo que a selecão dos genitores poderá ocorrer utilizando as informações das distâncias genéticas de cada acesso associada às características agronômicas desejadas.

Outros estudos que avaliaram a eficiência e a informatividade dos marcadores SSRs e AFLPs para acessar a diversidade genética de um conjunto de acessos de feijão comum foram realizados. MARAS et al. (2008) avaliaram a eficiência dos marcadores SSRs e AFLPs para estimar a diversidade genética de acessos de feijão comum pertencentes aos “pool” mesoamericano e andino. Os autores concluíram que ambos os marcadores moleculares foram eficientes para caracterizar os acessos avaliados, sendo que ambos marcadores forneceram um alto nível de polimorfismo, e além disso observou-se a divisão dos 29 acessos de acordo com o “pool” gênico a que pertenciam. MASI et al. (2009) utilizaram marcadores SSRs e AFLPs para analizar a estrutura genética de cultivares de feijão comum que apresentavam diferentes hábitos de crescimento. Os autores concluíram que tanto os marcadores SSRs quanto os marcadores AFLPs foram eficientes para analisar a estrutura genética de acessos de feijão comum, e que as informações obtidas com estes marcadores moleculares pode ser muito útil para estudar a evolução da estrutura genética de cultivares de feijão comum durante o processo de conservação e fornecer informações relevantes e necessárias para escolher medidas adequadas para explorar os recursos genéticos vegetais.

5 CONCLUSÕES

a) A estrutura da genética do conjunto avaliado não é forte, porém há uma grande diversidade genética entre os genótipos avaliados neste estudo.

b) Os marcadores SSRs e AFLPs foram eficientes para acessar a diversidade genética existente entre os genótipos do tipo Carioca.

c) A cultivar ‘Carioca comum’, que deu origem as demais cultivares, apresentou-se distante geneticamente dos demais genótipos atuais deste tipo de grão.

d) Os acessos foram divididos de acordo com características agronômicas, como: tamanho dos grãos, tolerância a doenças que atacam o feijão e aos acessos pertencerem a uma determinada instituição de melhoramento.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A.F.B.; RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; MARTINS, L.A. Progresso do melhoramento genético do feijoeiro nas décadas de setenta e oitenta, nas regiões sul e Alto Paranaíba em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, p. 105-112, 1994.

AHMADI, N.; ALBAR, L.; PRESSOIR, G.; PINEL, A.; FARGETTE, D.; GHESQUIÈRE, A. Genetic basis and mapping of the resistance to *Rice yellow* mottle vírus. III. Analysis of QTL efficiency in introgressed progenies confirmed the hypothesis of complementary epistasis between two resistance QTLs. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, p. 1084-1092, 2001.

ALZATE-MARIN, A.L.; BAÍA, G. S.; FILHO, S.M.; JÚNIOR, T. J. DE P.; SEDIYAMA, C. S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Use of RAPD-PCR to identify true hybrid plants from crosses between closely related progenitors. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, p. 621-623, 1996.

ALZATE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.D.L.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 333-342, 2005.

ANDERSON, J.W.; SMITH, B.M.; WASHNOCK, C.S. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, p. 464-474, 1999.

BARBOSA, A.M.M.; GERALDI I.O.; BENCHIMOL, L.L ; GARCIA, A.A.F., SOUZA, C.L.JR.; SOUZA, A.P. Relationship of intra- and interpopulation tropical maize single cross hybrid performance and genetic distances computed from AFLP and SSR markers. **Euphytica**, v. 130, p. 87–99, 2003.

BECERRA-VELÁSQUEZ, V.L.; GEPTS, P. RFLP diversity of common bean (Phaseolus vulgaris) in its centers of origin. **Genome**, v. 37, p. 256–263, 1994.

BEEBE, S.; SKROCH, P.W.; TOHME, J.; DUQUE, M.C.; PEDRAZA, F.; NIENHUIS J. Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. **Crop Science**, v. 40, p. 264–273, 2000.

BENCHIMOL, L.L.; CAMPOS, T.; CARBONELL, S.A.M.; COLOMBO, C.A.; CHIORATTO, A.F.; FORMIGHIERI, E.F.; SOUZA, A.P. Structure of Genetic Diversity among Common Bean (Phaseolus vulgaris L.) Varieties of Mesoamerican and Andean Origins Using New Developed Microsatellite Markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, p. 1747-1762, 2007.

BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Ann. Bot.**, v. 76, p. 113-176, 1995.

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

BLAIR, M.W.; PEDRAZA, F.; BUEDIA, H.F.; GAITÁN-SOLÍS, E.; BEEBE, S.E.; GEPTS, P.; TOHME, J. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (Phaseolus vulgaris L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, p. 1362-1374, 2003.

BLAIR, M.W.; GIRALDO, M.C.; BUENDÍA, H.F.; TOVAR, E.; DUQUE, M.C.; BEEBE, S.E. Microsatellite marker diversity in common bean (Phaseolus vulgaris L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 113, p. 100–109, 2006 a.

BLAIR, M.W.; MUÑOZ, C.; GARZA, R.; CARDONA, C. Molecular mapping of genes for resistance to the bean pod weevil (Apion godmani Wagner) in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, p. 913–923, 2006 b.

BLAIR, M.W.; DÍAZ, J.M.; HIDALGO, R.; DÍAZ, L.M.; DUQUE, M.C. Microsatellite characterization of Andean races of common bean (Phaseolus vulgaris L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 116, p. 29–43, 2007.

BORÉM, A. Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa, MG, 817p, 1999.

BORÉM, A.; MIRANDA,G.V. Melhoramento de plantas. Viçosa, MG, 525p, 2005.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. Marcadores Moleculares. Viçosa,MG, 374p, 2006.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in a man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.

BROWN, J.W.S.; MCFERSON, J.R.; BLISS, F.A.; HALL, T.C. Genetic divergence among commercial classes of Phaseolus vulgaris in relation to phaseolin pattern. **Horticulture Science**, v. 17, p. 752–754, 1982.

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

BRUSH, S.B.; CARNEY, H.J.; HUÁMAN, Z. Dynamics of Andean potato agriculture. **Economic Botany**, v.35, p.70-78, 1981.

BULISANI, E.A. Feijão Carioca – Uma História de sucesso. Documentos, IAC, Campinas, 85, 2008.

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

BUSSAB, W.O.; MIAZAKI, E.S.; ANDRADE, D.F. Introdução à análise de agrupamentos. Associação Brasileira de Estatística – ABE, 9º Simpósio Nacional de Probabilidade e Estatística, SP, 1990.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de Marcadores Moleculares. In: Borém, A., Caixeta, E.T. (eds.) Marcadores Moleculares. Viçosa, 374p, p. 9-78, 2006.

CAMPOS, T.; BENCHIMOL, L.L.; CARBONELL, S.A.M.; CHIORATTO, A.F.; FORMIGHIERI, E.F.; SOUZA A.P. Microssatélites para estudos genéticos e programas de melhoramento em feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 589-592, 2007.

CARBONELL, S.A.M.; CHIORATO, A.F.; ITO, M.F.; PERINA, E.F.; GONÇALVES, J.G.R.; SOUZA, P.S.; GALLO, P.B.; TICELLI, M.; COLOMBO, C.A.; FILHO, J.A. DE A. IAC-Alvorada and IAC-Diplomata:new common bean cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.8, p. 163-166, 2008.

CARDOSO, J.M.K.; OBLESSUC, P.R.; CAMPOS, T.; SFORÇA, D.A.; CARBONELL, S.A.M.; CHIORATTO, A.F.; FORMIGHIERI, E.F.; SOUZA, A.P.; BENCHIMOL, L.L. (2008) New microsatellite markers developed from an enriched microsatellite common bean library. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 07, p. 929-936.

CATTAN-TOUPANCE, L.; MICHALAKIS, Y.; NEEMA, C. Genetic structure of wild bean populations in their South-Andean centre of origin. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96, p. 844-851, 1998.

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

CHIORATO, A.F.; CARBONELL, S.A.M.; BENCHIMOL, L.L., CHIAVEGATO, M.B.; DIAS, L.A.S., COLOMBO, C.A. (2007). Genetic Diversity in common bean

accessions evaluated by means of morpho-agronomical and RAPD data. **Scientia Agrícola**, v.64, p.256-262.

CIAT. Bean production Systems. Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical, 2002.

CLEVELAND, D.A.; SOLERI, D.; SMITH, S.E. Do folk crop varieties have a role in sustainable agriculture?. **BioScience**, v. 44, p. 740-751, 1994.

COELHO, A.S.G. BooD: avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variado de marcadores (software). Goiânia: UFG, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Vegetal, 2002.

CONAB COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, http://www.conab.gov.br/conabweb, acessado em dezembro de 2008.

CONAF - IX Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão. http://www.conafe.com.br/, (março de 2008).

CORDEIRO, A.; MARCATTO,C. Milho: a volta das variedades crioulas.In: GAIFANI, A.;CORDEIRO, A. (Org). **Cultivando a diversidade**: recursos genéticos e segurança alimentar.Rio de Janeiro: Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 205 p., 1994.

CORRÊA, R.X.; PEDRO, I.V.; GOOD-GOD; OLIVEIRA, M.L.P.; NIETSCHE, S.; MOREIRA, M.; BARROS, E.G. (2001). Herança da Resistência a Mancha Angular do feijoeiro e Identificação de Marcadores Moleculares Flanqueando o Loco de Resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 27-32 , 2001.

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

DAVID, L.S.; SCOTT, L.S.; STEPHEN, C.R. An Alternate Universal Forward Primer for Improved Automated DNA Sequencing of M13. **BioTechniques**, v. 15, p. 580-582, 1993.

DEBOUKC, D.G.; TORO, O.; PAREDES, O.M.; JOHNSON, W.C.; GEPTS, P. Genetic diversity and ecological distribution of Phaseolus vulgaris in northwestren South América. **Economy Botanic**, v. 47, p. 408-423, 1993.

DÍAZ, L.M.; BLAIR, M.W. Race structure within the Mesoamerican gene pool of common bean (Phaseolus vulgaris L.) as determined by microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 114, p. 143–154, 2006.

DUARTE, J.M. Estudo da divergência entre raças de feijão por meio de marcadores RAPD. Dissertação (Mestrado),Universidade Federal de Lavras, Lavras, SP, p. 78, 1998.

EXCOFFIER, L.; SCHNEIDER, S. Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America. **Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America**, v. 96, p. 10597-10602.

FERREIRA, M.E.; GATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2 ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN, 220 p, 1995.

FERREIRA, L.G.; TELES, F.L.; DAVI, G.S.; KOZLOWSKI, A.L.R.; NUNES, R.C.; BUSO, G.S.G.; BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; MELO, L.C.; PELOSO, M.J.; BASSINELLO, P.Z.; SIBOV, S.T.; CARNEIRO, M.S. (2005). Utilização de Marcadores Microssatélites na Construção de Mapa Genético em feijoeiro comum, Visando a Identificação de QTL's Associados ao Teor de Proteínas em Grãos. CONAFE , p.579-581 , 2005.

FONSECA, J. R. Emprego da análise multivariada na caracterização de germoplasma de feijão (Phaseolus vulgaris L.). Tese (Doutorado), Universidade Federal de Lavras, Lavras, SP, p. 123, 1993.

FRANCO, M.C.; CASSINI, S.T.A.; OLIVEIRA, V.R.; TSAI, S.M. Characterization of the genetic diversity of common beans by RAPD markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 381–385, 2001.

FREYRE, R.; RÍOS, R.; GUZMÁN, L.; DEBOUCK, D.; GEPTS, P.(1996). Ecogeographic distribution of Phaseolus spp. (Fabaceae) in Bolivia. **Economy Botanic**, v. 50, p. 195–215, 1996.

FUSCALDI, K.C; PRADO G.R. Análise econômica da cultura do feijão. **Revista de Política Agrícola**. Ano XIV - Nº 1 - Jan./Fev./Mar. 2005.

GAITAN-SOLÍS, E.; DUQUE, M.C.; EDWARDS, K.J.; TOHME, J. Microsatellite in Common Bean (Phaseolus vulgaris): Isolation, characterization, and cross-Species amplification in- Phaseolus sp. **Crop Science**, v. 42, p. 2128-2136, 2002.

GALVÁN, M.Z.; AULICINO, M.B.; GARCIA-MEDINA, S.; BALATTI, P.A.Genetic diversity among Northwestern Argentinian cultivars of common bean (Phaseolus vulgaris L.) as revealed by RAPD markers. **Genetic Resource Crop Evolution**, v. 48, p. 251–260, 2001.

GALVÁN, M.Z.; BORNET, B.; BALATTI, P.A.; BRANCHARD, M. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity

and gene pool origin in common bean (Phaseolus vulgaris L.). **Euphytica**, v. 132, p. 297–301, 2003.

GALVÁN, M.Z.; MENENDEZ-SEVILLANO, M.C.; RON, A.M. DE; SANTALLA, M.; BALATTI, P.A. (2006). Genetic diversity among wild common beans from northwestern Argentina based on morpho-agronomic and RAPD data. **Genetic Resource Crop Evolution**, v. 53, p. 891–900, 2006.

GARCIA, A.A.F.; BENCHIMOL, L.L.; BARBOSA, A.M.M.; GERALDI, I.O.; SOUZA, J.R.; SOUZA, A.P. (2004) Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. **Genetics and Molecular Biology**, v. 4, p. 579-588, 2004.

GARRIS, A.J.;TAI, T.H.; COBURN, J.; KRESOVICH, S.; MCCOUCH, S. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. **Genetics**, v.169, p. 1631-1638, 2005.

GEPTS, P. (1984). Nutritional and evolutionary implications of phaseolin seed protein variability in common bean (Phaseolus vulgaris L.). Tese (Ph.D.), University of Wisconsin, Madison, p. 229, 1984.

GEPTS, P.; BLISS, F.A. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (Phaseolus vulgaris L.). In: Van Schoonhoven A., Voysest, O. Common bean: research for crop improvement. CIAT, Cali, Colombia ,v. 1, p. 7-53, 1985.

GEPTS, P.; BLISS, F.A. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (Phaseolus vulgaris) from Colombia. **Economy Botanic**, v. 40, p. 469-478, 1986.

GEPTS, P. Phaseolin as an evolutionary markers. In: Gepts, P. (ed). Genetics resources, domestication and evolution of Phaseolus beans. Kluwer, Dorrecht, p. 215-241,1988.

GÓMEZ, O.; BLAIR, M.W.; FRANKOW-LINDBERG, B.E.; GULBERG, U. Molecular and Phenotypic Diversity of Common Bean Landraces from Nicaragua. **Crop Science**, v. 44, p. 1412-1418, 2004.

GONZÁLEZ, A.; WONG, A.; DELGADO-SALINAS, A.; PAPA, R.; GEPTS, P. Assessment of inter simple sequence repeat markers to differentiate sympatric wild and domesticated populations of common bean (Phaseolus vulgaris L.). **Crop Science**, v. 35, p. 606–615, 2005.

GOODMAN, M.M.; STUBER, C.W. Races of maize VI. Isozyme variation among races of maize in Bolívia. Maydica, v. 28, p. 169-187, 1983.

GOWER, J.C. Some distant properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. **Biometrika**, v. 53, p. 325-338, 1966.

GRISI, M.C.M.; BLAIR, M.W.; GEPTS, P.; BRONDANI, C.; PEREIRA, P.A.A.; BRONDANI, R.P.V.; Genetic mapping of a new set of microsatellite markers in a reference common bean (Phaseolus vulgaris) population BAT93 x Jalo EEP558. **Genetic Molecular Resources**, v. 6, p. 691-706, 2007.

GUO, J.C.; HU, X.W.; YANAGIHARA, S.; YOSHINOBU, E. Isolation and characterization of microsatellites in snap bean. **Acta Botanica Sinica**, v. 42, p. 1179–1183, 2000.

HALEY, S.D.; MIKLAS, P.N.; AFANADOR, L.; KELLY, J.D. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker variability between and within gene pools of common bean. **Journal America Society for Horticulture Science**, v. 119, p. 122–125, 1994.

HAMON, P.; TOURE, B. Characterization of traditional yam varieties belonging to the Dioscorea cayenensis-rotundata complex by their isozymic patterns. **Euphytica**, v. 46, p. 101-107, 1990.

HANAI, L.L.; CAMPOS, T.; CAMARGO, L.E.A., BENCHIMOL, L.L.; SOUZA, A.P.; MELOTTO, M.; CARBONELL, S.A.M.; CHIORATTO, A.F.; CONSOLI, L.; FORMIGHIERI, E.F.; SIQUEIRA, M.V.B.M.; TSAI, T.M.; VIEIRA, M.L.C. Development, characterization and comparative analysis of polymorphism at common bean-SSR loci isolated from genic and genomic sources. **Genome**, v. 50, p. 266-277, 2007.

HAO, C.Y.; DONG, Y.C.; WANG, L.F; YOU, G.X.; ZHANG, H.N.; GE, H.M.; JIA, J.Z.; ZHANG, X.Y. Genetic diversity and construction of core collection in Chinese wheat genetic resources. **Chinese Science Bulletin**, v. 53, p. 1518-1526, 2008.

HERRERA, J.C.; COMBES, M.C.; CORTINA, H.; ALVARADO, G.; LASHERMES, P. Gene introgression into Coffea arabica by way of triploid hybrids (C. arabica X C. canephora). **Heredity**, v. 89, p. 488-494, 2002.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZALEZ-DE-LEON, D. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Mexico DF: CIMMYT, 1994.

INAZUKA, M.; TAHIRA, T.; HAYASHI, K. One-tube post-PCR fluorescent labeling of DNA fragments. **Genome Resources**, v. 6, p. 551-557, 1996.

JACCARD, P. Nouvelles rechearches sur la distribuition florale. **Bull. Soc. Vaudoice Sci. Nat.**, v. 44, p. 223-270, 1908.

JUN, T-H.; KAN, K.; KIM, M.Y.; LEE, S-H.; WALKER, D.R. Associations analysis using SSR markers to find QTL for seed protin content in soybean. **Euphytica**, v. 158, p. 87-94, 2007.

KHAIRALLAH, M.M.; ADAMS, M.W.; SEARS, B.B. Mitochondrial DNA polymorphisms of Malawian bean lines: Further evidence for two major gene pools. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 80, p. 753–761, 1990.

KHAIRALLAH, M.M.; SEARS, B.B.; ADAMS, M.W. Mitochondrial restriction fragment polymorphisms in wild Phaseolus vulgaris-Insights in the domestication of common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 84, p. 915–922, 1992.

KOINANGE, E.M.K.; SINGH, S.P.; GEPTS, P. Genetic control of the domestication syndrome in common bean. **Crop Science**, v. 36, p. 1037-1045, 1996.

KOEHLER-SANTOS; DORNELLES, P.; CUNHA, A.L.; FREITAS, L.B. DE. Caracterização do germoplasma de tangerineiras do Sul do Brasil mediante análises morfológicas e moleculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 797-806, 2003.

KOENIG, R.; GEPTS, P. Allozyme diversity in wild Phaseolus vulgaris: further evidence for two major centers of genetic diversity. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 78, p. 809-817, 1989.

KOENIG, R.; SINGH, S.P.; GEPTS, P. Novel phaseolin types in wild and cultivated common bean (Phaseolus vulgaris, Fabaceae). **Economy Botanic**, v. 44, p.50–60, 1990.

KRISHNA, G.K.K.; ZHANG, J.; BUROW, M.; PITTMAN, R.N.; DELIKOSTADINOV, S.G.; YINGZHI, L.; PUPPALA, N. Genetic Diversity Analysis in Valencia Peanut (*Arachis hypogaea* L.) using Microsatellite Marker. **Cellular & Molecular Biology letters**, v. 9, p. 685-697 , 2004.

KUMAR, V.; SHARMA, S.; KERO, S.; SHARMA, S.; SHARMA, A.K.; KUMAR, M.; BHAT, K.V. Assessment of genetic diversity in common bean (Phaseolus vulgaris L.) germplasm using amplified fragment length polymorphism (AFLP). **Scientia Horticulturae**, v. 116, p. 138-143, 2008.

LABORDA, P.R.; OLIVEIRA, K.M.; GARCIA, A.A.F.; PATERNIANI, M.E.A.G.Z.; SOUZA, A.P. Tropical maize germplasm: what can we say abouy, its genetic diversity in the light of molecular markers?. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 111, p. 1288–1299, 2005.

LEMOS, L.B.; OLIVEIRA, R.S. DE; PALOMINO, E.C.; SILVA, T.R.B. Características agronômicas e tecnológicas de genótipos de feijão do grupo comercial Carioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 319-326, 2004.

LIN, J.J.; KUO, J. AFLP: a novell PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. **Nucleic Acids Resources**, v. 18, p. 3649-3650, 1995.

LIU , S.; YU , K.; PARK, S.J. Development of STS markers and QTL validation for common bacterial blight resistance in common bean. **Plant Breeding**, v. 127, p. 62-68, 2008.

LYNCH, M.; WALSH, J.B. Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 980 p., 1998.

MACHADO, C. DE F. (1999). Procedimentos para a escolha de genitores de feijão. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 118p, 1999.

MACHADO, C.F.; SANTOS, J.B.; NUNES, G.H.S.; DUARTE, J.M. Efficiency of genetic distance base don RAPD markers for choosing parents of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal Genetics & Breeding**, v. 54, p. 251-258, 2000.

MACIEL, F.L.; GERALD, L.T.S.; ECHEVERRIGARAY, S. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers variability among cultivars and landraces of common beans (Phaseolus vulgaris L.) of south Brazil. **Euphytica**, v. 120, p. 257–263, 2001.

MANTEL, N.A. The detection of disease clustering and a generalizes regression approach. **Cancer Research**, v. 27, p. 209-220, 1967.

MARAS, M.; SUSTAR-VOZLIC, J.; JAVORNIK, B.; MEGLIC, V. (2008) The efficiency of AFLP and SSR markers in genetic diversity estimation and gene pool classification of common bean (Phaseolus vulgaris L.). **Acta agriculturae Slovenica**, v. 91. p. 87-96, 2008.

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

MASI, P.; SPA, P.L.; GNOLETTI ZEULI; DONINI, P. Development and analysis of multiplex microsatellite markers sets in common bean (Phaseolus vulgaris L.). **Molecular Breeding**, v. 11, p. 303–313, 2003.

MAPA MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, http://www.agricultura.gov.br, acessado em dezembro de 2008.

MENEZES, M.V.C. de O.; SANTOS, J.B.; MENEZES, M. Genetic diversity in Carioca and Pérola cultivars of common bean based on RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 178-182, 2004.

MÉTAIS, I.; HAMON, B.; JALOUZOT, R.; PELTIER, D. Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 1346-1352, 2002.

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

MILLER, M. TFPGA – Tools for population genetic analyses, version 1.3, Northern Arizona University, 1997.

MOURA, A.C.C. Análises físico-químicas e enzimáticas antes e após armazenamento em grãos de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) submetidos a diferentes tempos e tipos de secagem. 1998. 70p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MURRAY, J.; LARSEN, J.; MICHAELS, T.E.; SCHAAFSMA, A.; VALLEJOS, C.E.; PAULS, K.P. Identification of putative genes in bean (Phaseolus vulgaris) genomic (Bng) RFLP clones and their conversion to STSs. **Genome**, v. 45, p. 1013–1024, 2002.

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

O AGRONÔMICO. IAC-Carioca Eté, novo feijoeiro de alta produtividade. Campinas, v. 51, 1999.

O AGRONÔMICO. IAC-Carioca Tybatã: o feijoeiro da fartura. Campinas, v. 53, 2001.

PALLOTTINI, L.; GARICIA, E.; KAMI, J.; BARCACCIA, G.; GEPTS, P. The genetic anatomy of a patented yellow bean. **Crop Science**, v. 44, p. 968-977, 2004.

PALOMINO, E.C.; MORI, E.S.; ZIMBACK, L.; TAMBARUSSI, E.V.; MORAES, C.B. Genetic diversity of common bean genotypes of Carioca commercial group using RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 5, p. 80-85, 2005.

PAPA, R.; GEPTS, P. Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (Phaseolus vulgaris L.) from Mesoamerica**. Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 239-250, 2003.

PARK, S.O.; COYNE, D.P.; BOKONI, J.M.; STEADMAN, J. R. Molecular markers linked to genes for specific rust resistance and indeterminate growth habit in common bean. **Euphytica**, v. 105, p. 133-141, 1999.

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

POMPEU, A.S. IAC-Maravilha, IAC-UNA, IAC-Carioca Pyatã, IAC-Carioca Aruã, IAC-Carioca Akytã e IAC-Bico de Ouro: novas cultivares de feijoeiro. **Bragantia**, v. 56, 1997.

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

RIBEIRO, N.D. Escolha de gnitores de feijoeiro por meio da diversidade genética. Tese (PhD). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2001.

RHOLF, F.J. NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.0j, Exeter Publ., Setauket, NY, 1993.

RIBEIRO, N.D. Escolha de genitores de feijão pormeio da divergência genética. 2001, 80 p. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Federal de Santa Maria.

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

ROSALES-SERNA, R.; HERNANDEZ-DELGADO, S.; GONZALEZ-PAZ, M.; ACOSTA-GALLEGOS, J.A.; MAYEK-PEREZ, N. Genetic relationships and diversity revealed by AFLP markers in Mexican common bean bred cultivars. **Crop Science**, v. 45, p. 1951–1957, 2005.

SANTALLA, M.; RODINO, A.P.; RON. A.M. DE (2002). Allozyme evidence supporting southwestern Europe as a secondary center of genetic diversity for the common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 934–944, 2002.

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

SANTOS, P.S.J. DOS; ABREU, A. DE F.B.; RAMALHO, M.A.P. (2002). Seleção de linhas puras no feijão 'Carioca'. **Ciência e Agrotecnologia**, p. 1492-1498, 2002.

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

SAS Institute. SAS/STAt users guide. SAS Inst., Cary, NC, 1989.

SCHUSTER, I.; VIEIRA, S.N.V.; HAMILTON, S.; SINHORATI, D.; SILVA, R.B.; OLIVEIRA, M.A.R. Fluxo gêncico em soja na região oeste do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 515-520, 2007.

SIBOV, S.T.; SOUZA, J.R.; C.L.; GARCIA, A.A.F.; GARCIA, A.F.; SILVA, A.R.; MANGOLIN, C.A.; BENCHIMOL, L.L.; SOUZA, A.P. (2003). Molecular mapping in tropical maize (Zea mays L.) using microsatellite markers. I. Map construction and localization of loci showing distorted segregation. **Hereditas**, v. 199, p. 96-106, 2003.

SILVA, C.M.; KARASAWA, M.M.G.; VENCOVSKY, R.; VEASEY, E.A. Elevada diversidade genética interpopulacional em Oryza glumaepatula Steud. (Poaceae) avaliada com microssatélites. **Biota Neotropica**, v. 7, p. 165-171, 2007.

SICARD, D.; NANNI, L.; PORFIRI, O.; BULFON, D.; PAPA, R. Genetic diversity of Phaseolus vulgaris L.and P. coccineus L. landraces in central Italy. **Plant Breeding**, v. 124, p. 464-472, 2005.

SILVA, G.S. da. Controle genético do escurecimento precoce de grãos de feijão tipo carioca. 2007. 52p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SINGH, S.P.; GUTIÉRREZ, J.A. Geographical distribution of the DL1 and DL2 genes causing hybrid dwarfism in Phaseolus vulgaris L., their association with seed size, and their significance to breeding. **Euphytica**, v. 33, p. 337-345, 1984.

SINGH, S.P.; NODARI, R.; GEPTS,G. Genetic diversity in cultivated common bean. I. Allozymes. **Crop Science**, v. 31, p. 19–23, 1991 a.

SINGH, S.P.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D.G. Races of common bean (Phaseolus vulgaris, Fabriceae). **Economic Botany**, v. 45, p. 379-396, 1991 b.

SINGH, S.P. Breeding for seed yield. In: Shoonhoven, A. van; Voysest, O. (eds). Common beans – Research for crop improvement. Cali, CAB International, CIAT, p. 383-443, 1993.

SKROCH, P.; NIENHUIS, J. Qualitative and quantitative characterization of RAPD variation among snap bean (Phaseolus vulgaris) genotypes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, p. 1078–1085, 1995.

SNEATH, P.H. Basic program for a significance test for clusters in upgma dendrograms obtained from squared euclidean distances. **Computers & Geosciences**, v. 5**,** p. 127-137, 1979.

SOLÉ-CAVA, A.M. Biodiversidade molecular e conservação. In: Matioli, S. R. (ed) Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Holos, p. 172-192, 2001.

SPRECHER, S.L. Isozyme differences between the large seeded and small seeded gene pools in Phaseolus vulgaris L. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 31, p. 36-37, 1988.

STRUSS, D.; PLIESKE, J. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, p. 308-315, 1998.

SVETLEVA, D.; PEREIRA, G.; CARLIER, J.; CABRITA, L.; LEITÃO, J.; GENCHEV, D. Molecular characterization of Phaseolus vulgaris L. genotypes included in Bulgarian collection by ISSR and AFLP analyses. **Scientia Horticulturae**, v. 109, p. 198-206, 2006.

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

TAUTZ, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Resources**, v.17, p. 6463-6471, 1989.

TIVANG, J.G.; NIENHUIS, J.; SMITH, O.S. (1994). Estimation of sampling variance of molecular marker data using the bootstrap procedure. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, p. 259-264, 1994.

TOHME, J.; ORLANDO-GONZALEZ, D.; BEEBE, S.; DUQUE, M.C. (1996). AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. **Crop Science**, v. 36, p. 1375–1384, 1996.

VANDERBORGHT, T. A centralized database for the common bean and its use in diversity analysis. In: Gepts, P.L. (ed.) Genetic resources of Phaseolus beans: their maintance, domestication, evolution, and utilization. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.51-65, 1988.

VASCONCELOS, M.J.V. DE (1995). Avaliação da variabilidade genética de cultivares de feijão (Phaseolus vulgaris L.) pelo uso de marcadores moleculares RAPD. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 54 p, 1995.

VIEIRA, R.F.; CARDOSO, C.; MOSQUIM, E.J.B.N. Foliar application of Molybdenum in common bean: II. nitrogenase and nitrate reductase activities in a soil of low fertility. **Journal of Plant Nutrition**, v. 21, p. 2141-2151, 1998.

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

VIEIRA, E.A.; CASTRO, C.M.; OLIVEIRA, A.C. DE. Estrutura genética de populações de azevém anual (Lolium multiflorum) estimada por RAPD. **Scientia Agrícola**, v. 61, p. 407-413, 2004.

VIEIRA, C.; JÚNIOR, T.J.P.; BORÉM, A. Feijão. Viçosa, 600 p, 2006.

VILARINHOS, A.D.; VARROS, D.G. DE; PAIVA, D.; SEDIYAMA, C.S.; MOREIRA, M.A. Use of random amplified polymorphic DNA technique to characterize soybean (Glycine max L.) Merrill) genotypes. **Revista Brasileira de Genética**, v. 17, p. 287-290, 1994.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REJIANS, M.; LEE, T.; HORNEES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. (1995). AFLP a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Resources**, v. 21, p. 4407-4414, 1995.

WEBER, R.D.; MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal Human Genetics**, v. 44, p. 388-396, 1989.

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

YOUNG, R.A.; KELLY, J. D. RAPD markers linked to three major anthacnose resistance genes in common bean. **Crop Science**, v. 37, p. 940-946, 1997.

YU, K.; PARK, S.J.; POYSA, V. Abundance and variation of microssatellite DNA sequences in beans (Phaseolus and Vigna). **Genome**, v. 42, p. 27-34, 1999.

YU, K.; PARK, S.J.; POYSA, V.; GEPTS, P. Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (Phaseolus vulgaris L.). **The Journal of Heredity**, v. 91, p. 429-434, 2000.

ZABEAU, M.; VOS, P. Selective restriction fragment amplification: a general method for SNA fingerprinting. **European Patent Application**, v. 10, p. 29-42, 1993.

ZHANG, X.; BLAIR, M.W.; WANG, S. Genetic diversity of Chinise common bean (Phaseolus vulgaris L.) landreces assessed with sinple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, p. 629-640, 2008.

ZIMMERMAN, M.J.O.; TEIXEIRA, M.G. Bancos de germoplasma In: Araújo, R.S., Rava, C.A.; Stone, L.F. and Zimmerm, M.J.O. Cultura do Feijoeiro Comum no Brasil. Potafos, Piracicaba, p. 65-66, 1996.

ZUPPI, M., MENTEM, J.O.M., FERREIRA-LIMA, L.C.S., RABALHO, A.A., FRARE, V.C. Produtos fitossanitários utilizados no feijoeiro no Brasil: Evolução e situação atual. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 8, 2005, Goiânia: Embrapa Arroz e Feijão, p. 261-1269, 2005.