

MARIA JOSÉ VILAÇA DE VASCONCELOS

Avaliação da variabilidade

1995

TS - T.31/95

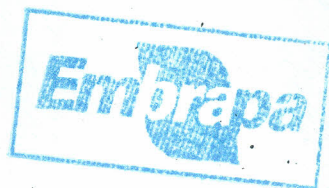


5655 - 1

AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE CULTIVARES DE
FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) PELO USO DE
MARCADORES MOLECULARES RAPD

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
JULHO 1995

MARIA JOSÉ VILAÇA DE VASCONCELOS



**AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE CULTIVARES DE
FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) PELO USO DE MARCADORES
MOLECULARES RAPD**

7
2705
Ao Edilson
agradecido o conselho
dado em minha proposta
M. J. Vasconcelos
10/04/95

Tese Apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como Parte das Exigências do Curso de Agroquímica, para Obtenção do Título de "Magister Scientiae".

VIÇOSA

MINAS GERAIS - BRASIL

JULHO - 1995

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

T

V331a
1995

Vasconcelos, Maria José Vilaça de, 1957-
Avaliação da variabilidade genética de cul-
tivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pe-
lo uso de marcadores moleculares RAPD / Maria
José Vilaça de Vasconcelos. - Viçosa : UFV,
1995.

54p. : il.

Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros
Dissertação (mestrado) - Universidade Fede-
ral de Viçosa

1. Feijão - Diversidade genética. 2. Fei-
jão - Marcador molecular. 3. *Phaseolus*
vulgaris L. 4. RAPD. I. Universidade Federal
de Viçosa. II. Título.

CDD 18.ed. 574.8732

CDD 19.ed. 574.873282

MARIA JOSÉ VILAÇA DE VASCONCELOS


AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE CULTIVARES DE
FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) PELO USO DE MARCADORES
MOLECULARES RAPD

Tese Apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como Parte das
Exigências do Curso de Agroquímica,
para Obtenção do Título de "Magister
Scientiae".

APROVADA: 26 de outubro de 1994.



Prof. Clibas Vieira
(Conselheiro)



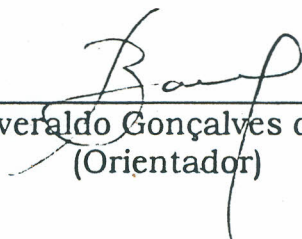
Prof. Maurílio Alves Moreira
(Conselheiro)



Prof. Aluizio Borém de Oliveira



Dr. Edilson Paiva



Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Orientador)

À minha mãe Maria José,
Ao meu pai Clébio (in memoriam),
A Maurílio,
Aos meus irmãos,
Aos meus sobrinhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me possibilitou alcançar este importante objetivo.

Às seguintes instituições, pela oportunidade de realizar este curso:

- Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo - CNPMS/EMBRAPA.

- Universidade Federal de Viçosa : Departamentos de Química e Fitotecnia e ao Núcleo de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária - BIOAGRO.

- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros, pela orientação sempre segura, pela confiança, pela amizade, pelas críticas e pela colaboração, indispensáveis à conclusão deste trabalho.

Aos professores conselheiros, Clibas Vieira e Maurílio Alves Moreira, pelas críticas e pelas sugestões, que muito contribuíram para o êxito deste trabalho.

Ao professor Cosme Damião Cruz, pela orientação na análise multivariada.

Ao professor Aluizio Borém de Oliveira, pelas críticas e pelas sugestões.

Às professoras Elza Fernandes de Araújo, Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Márcia Rogéria, pela amizade construída no decorrer do tempo.

Ao Dr. Edilson Paiva, pela confiança e pelo incentivo, tão importante nesta minha carreira.

A José Pinto Rosa (Pintinho), pela colaboração neste trabalho.

A Maria das Graças e Ana Lúcia, pela amizade.

Aos colegas do BIOAGRO, Geraldo, Ronan, Newton, Giovani, Marcelo, Gaston, Paula Cristina, Valéria, Inês, Marta, Lúcia Andréia, Ana Cristina e em especial aos amigos Alberto, Marco Antônio, Ricardo, Liene e Cláudia, pela agradável convivência.

A todos os meus amigos que, certamente, de alguma maneira, contribuíram para o êxito deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização e enriquecimento deste trabalho,

agradeço de coração.

BIOGRAFIA

MARIA JOSÉ VILAÇA DE VASCONCELOS, filha de Clébio Bahia de Vasconcelos e de Maria José Vilaça, nasceu em Papagaios, Estado de Minas Gerais.

Em março de 1980, ingressou no curso de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, em Belo Horizonte-MG, diplomando-se em dezembro de 1983.

Em julho de 1986, foi contratada pela Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Minas Gerais - EPAMIG, onde exerceu o cargo de pesquisador I até agosto de 1989.

Em setembro de 1989, foi contratada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, onde exerce a função de pesquisador I, no Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, Minas Gerais.

Em maio de 1992, iniciou o curso de Mestrado em Agroquímica, no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa - UFV, defendendo tese no dia 26 de outubro de 1994.

CONTEÚDO

	Página
EXTRATO	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Feijoeiro-Comum: Características, Origem, Importância e Variabilidade Genética	4
2.2. Faseolina e Centro de Domesticação	6
2.3. Variabilidade x Melhoramento.....	11
2.4. Marcadores Genéticos.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Fonte de Germoplasma	16
3.2. Análise de Faseolina por Eletroforese	19
3.3. Extração de DNA.....	19
3.4. Processo de Amplificação e Separação dos Fragmentos de DNA Amplificados por Eletroforese em Gel de Agarose.....	21
3.5. Análise dos Dados obtidos por RAPD	23

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1. Análise Eletroforética da Faseolina dos Cultivares de Feijão	24
4.2. Classificação e Identificação dos Marcadores Moleculares do Tipo RAPD.....	27
4.3. Avaliação da Diversidade Genética entre os Cultivares de Feijão	34
5. RESUMO E CONCLUSÕES	47
BIBLIOGRAFIA	49

EXTRATO

VASCONCELOS, Maria José Vilaça de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 1995. **Avaliação da Variabilidade Genética de Cultivares de Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) Pelo Uso de Marcadores Moleculares RAPD.** Professor Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Professores Conselheiros: Maurílio Alves Moreira e Clibas Vieira.

Nos programas de melhoramento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), além da análise fenotípica, têm-se utilizado marcadores moleculares (isoenzimas, proteínas de reserva, RFLP) para avaliar a variabilidade entre indivíduos. Os marcadores moleculares do tipo RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") constituem uma potente ferramenta na caracterização de progenitores potenciais em programas de melhoramento genético. A diversidade genética de 28 cultivares de feijão, abrangendo os mais interessantes de acordo com o programa de melhoramento da Universidade Federal de Viçosa-UFV, foi estudada por meio de marcadores moleculares do tipo RAPD. O DNA total de folhas de plantas dos 28 cultivares foi purificado e amplificado,

utilizando-se decanucleotídeos iniciadores de seqüência aleatória. Neste estudo, foram utilizados 45 iniciadores, obtendo-se 276 produtos de amplificação, sendo 144 deles polimórficos e 132 monomórficos. Obteve-se, portanto, uma média de 3,2 bandas polimórficas de DNA por iniciador, um alto grau de polimorfismo nos cultivares analisados. As distâncias genéticas entre os 28 cultivares, analisados dois a dois, variaram de 1 a 21%. Com base nas distâncias genéticas, foi construído um dendrograma que possibilitou a separação dos 28 cultivares em dois grandes grupos em nível de 30% de distância relativa: o grupo A, abrangendo cultivares do Centro de Domesticação Andino, e o grupo B, cultivares do Centro Mesoamericano. As informações aqui obtidas serão de utilidade em programas de melhoramento e mapeamento do genoma do feijoeiro.

1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de feijões é da ordem de 15 milhões de toneladas, concentrada em países que, além de serem os maiores produtores, são os maiores consumidores. A Índia e o Brasil são os maiores produtores mundiais, sendo responsáveis, em média, por 24 e 15% da produção mundial, respectivamente (FAO, 1991). Para o ano agrícola de 1993/1994, a safra brasileira foi estimada em 2,8 milhões de toneladas (TROVO, 1994).

No Brasil, as limitações tecnológicas, econômicas, sociais e políticas restringem o cultivo do feijão, em grande parte, a pequenos agricultores, em sua maioria desatualizados quanto às novas tecnologias, o que mantém a produtividade média nacional, em aproximadamente, 445 kg/ha (IBGE, 1991). No entanto, por meio da utilização de tecnologias existentes, a produtividade média nacional poderia ser elevada a níveis bem acima daqueles hoje alcançados.

Entre os pequenos produtores de feijão, dentre os vários fatores responsáveis pela baixa produtividade, a falta do uso de sementes geneticamente melhoradas destaca-se como um dos mais importantes.

Como o melhoramento de plantas baseia-se na habilidade de se poder selecionar indivíduos que manifestam determinadas características de interesse, a existência de variabilidade genética é condição essencial para o sucesso de qualquer programa. Geralmente, a determinação do grau de variabilidade entre os diferentes genótipos, bem como o monitoramento dos caracteres de interesse, têm sido feitos por meio de análise fenotípica. Mesmo considerando essa limitação, tem-se conseguido variedades melhoradas de alta qualidade.

O programa de melhoramento do feijoeiro-comum visa sobretudo à obtenção de novos cultivares que possuam alta capacidade produtiva, resistência a patógenos, porte adequado para colheita mecânica e boa aceitação comercial. Sendo o feijão de extrema importância na alimentação do brasileiro e fonte barata de proteína na dieta das classes menos privilegiadas, o sucesso de um programa de melhoramento visando ao aumento de produtividade é bastante desejável; entretanto os resultados obtidos têm sido desapontadores. Aparentemente, o feijoeiro possui um teto de produtividade que, nas condições de Minas Gerais, está em torno de 3.000 a 3.500 kg/ha, e ultrapassar esse limite tem sido extremamente difícil.

Melhoristas e geneticistas têm, por muito tempo, proposto o uso de marcadores genéticos como ferramenta na caracterização de diferentes genótipos ("fingerprint") e também na seleção indireta para o rastreamento de caracteres de interesse. Em várias espécies de plantas, têm-se utilizado isoenzimas e outras proteínas como marcadores de genes responsáveis por algumas características qualitativas e quantitativas. Embora de grande utilidade, proteínas e isoenzimas são limitadas em número, além de apresentarem, na maioria das vezes, expressão órgão-específica e serem grandemente afetadas pelo ambiente. Para superar essas limitações, foram utilizados neste

trabalho marcadores do tipo RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") na caracterização de 28 cultivares de feijão, potencialmente úteis no programa de melhoramento da Universidade Federal de Viçosa - UFV. O uso de RAPD tem aumentado grandemente o potencial para detecção de diversidade entre os indivíduos, pois essa metodologia baseia-se em variações existentes no DNA, apresentando-se em grande número e não sofrem influência do ambiente.

Este trabalho teve como objetivo principal estudar a variabilidade genética, determinada por meio de marcadores moleculares RAPD, de 28 cultivares de feijão, a maioria utilizada no programa de melhoramento da UFV, e assim fornecer subsídios para futuros trabalhos de melhoramento dessa cultura tão importante no Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Feijoeiro-Comum: Características, Origem, Importância e Variabilidade Genética

O feijoeiro-comum é planta herbácea, levemente pubescente, podendo apresentar hábito de crescimento determinado ou indeterminado. No primeiro caso, a planta é ereta, com eixos principal e secundário terminando em uma inflorescência (embora as flores sempre apareçam nas axilas das folhas) e haste principal com 5 a 8 nós. No segundo caso, o eixo principal nunca termina em inflorescência, estas vão aparecendo nas axilas das folhas à medida que o caule se alonga. A planta pode ser ereta, semitrepadora ou trepadora e o número de nós pode atingir até 28 a 30 (VIEIRA, 1978). De acordo com a classificação feita pelo CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), existem quatro tipos de plantas: I - de crescimento determinado; II - indeterminado com hastes curtas; III - indeterminado com hastes compridas; IV - indeterminado trepador (CIAT, 1975a).

O feijoeiro é espécie diplóide, com número de cromossomos igual a $2n = 22$. A maioria dos cultivares é insensível ao fotoperíodo, sendo a autofecundação o sistema predominante por causa da estrutura de sua flor, na qual os estames são bem protegidos pelas pétalas, e também porque os grãos de pólen começam a cair sobre o estigma por ocasião da abertura das flores, sendo portanto uma planta autógama. As flores do feijoeiro ocorrem geralmente em cachos, ocultos pelas folhas, cálices cobertos por bractéolas grandes, persistentes, com a corola constituída de cinco pétalas brancas, rosadas ou violáceas, dependendo do cultivar. Nem todas as flores levam à formação de vagem. Trabalho conduzido por RAMALHO e FERREIRA (1979), com cinco cultivares, mostrou que o vingamento floral era de 28%, em média. As suas folhas são trifolioladas, com estípulas e estipúlulas. Elas apresentam folíolos inteiros, cordiformes, deltóides ou lanceoladas, de ápice acuminado, sendo um terminal e os outros dois laterais e opostos. Seu sistema radicular é constituído pela raiz principal e ramificações laterais, sendo bastante superficial, com a maior parte das raízes se situando nos 10 cm superficiais do solo. Seu fruto é do tipo vagem, retos ou ligeiramente curvados, achatados ou arredondados, compridos (9 a 12 cm de comprimento). Na maioria das variedades, o ciclo vegetativo é de três meses, aproximadamente, com o surgimento das flores iniciando-se até 45 dias após a emergência, com floração durando de 12 a 20 dias (VIEIRA, 1967, 1978).

O conhecimento da origem geográfica da espécie *Phaseolus vulgaris* é de singular importância para os pesquisadores que trabalham com melhoramento genético dessa cultura, pelo fato de se encontrar, nessas áreas, maior diversidade genética. Como a tendência atual da agricultura é a eliminação de grande parte da diversidade pela utilização de poucos cultivares melhorados e uniformes, a coleta de

germoplasma em tais centros é prioritária para se continuar tendo sucesso com o melhoramento genético, além, também, de impedir que o crescimento demográfico extinga formas silvestres, apenas encontradas na América Latina, que no futuro poderão servir como fonte de germoplasma para pesquisa em torno de diversos problemas (COLÍN, 1967).

Trabalhos de investigação arqueológica têm permitido o encontro na América Latina de restos de feijões (sementes e vagens) muito antigos. Na Argentina já foram encontrados restos de até 9.600 anos de idade, no Peru restos de 8.000 anos e no México, restos de 7.000 anos de idade (GEPTS e DEBOUCK, 1991). Restos com milhares de anos já foram encontrados em outras partes da América Latina, mas nunca em outros continentes.

Evidências filológicas e históricas apresentadas por GEPTS (1984) vêm ajudar a confirmar a origem americana do feijão. Palavras específicas para designar feijão são encontradas nas diversas linguagens nativas da América e, também textos espanhóis do século XVI fazem menção à presença de feijão nas Américas e revelam que ele era desconhecido entre os europeus antes da descoberta do Novo Mundo.

2.2. Faseolina e Centro de Domesticação

A faseolina é a mais importante proteína de reserva do grão do feijoeiro (OSBORN, 1988). Essa proteína é uma globulina solúvel somente em altas concentrações salinas, correspondendo de 35 a 56% do nitrogênio total da semente (MA e BLISS, 1978). A faseolina é detectada nos cotilédones 14 dias após o florescimento, sendo seu armazenamento estendido por mais 12 a 14 dias (SUN et al., 1979).

Estudos eletroforéticos identificaram, inicialmente, três tipos de faseolina que receberam a designação de "S", "T" e "C", presentes nos cultivares Sanilac, Tendergreen e Contender, respectivamente (BROWN et al., 1981a; BLISS e BROWN, 1983).

A faseolina pertence à família "7S" ou vicilina, família das proteínas de reserva das sementes das leguminosas (DERBYSHIRE et al., 1976), sendo composta por três unidades polipeptídicas glicosiladas. BOLLINI e CHRISPEELS (1978) isolaram e caracterizaram as duas principais frações protéicas do grão de feijão, vicilinas e fitohemaglutininas (lectinas). A vicilina apresenta, em pH neutro, um coeficiente de sedimentação de 6,95 e três subunidades com massas moleculares de 46.000, 49.000 e 52.000 daltons. A fração fitohemaglutinina apresenta coeficiente de sedimentação de 6,45 e duas subunidades não idênticas de massas moleculares de 34.000 e 36.000 daltons.

Estudos genéticos feitos por BROWN et al. (1981b) determinaram que os alelos que codificam os polipeptídeos de cada tipo de faseolina são codominantes, ligados e herdados de modo semelhante à herança mendeliana simples, isto é, os genes são fortemente ligados e herdados como um bloco semelhante a um gene simples.

A faseolina é codificada por uma família multigênica constituída por, aproximadamente, sete genes para a faseolina do tipo "T", oito genes para a faseolina do tipo "S" e nove genes para o tipo "C" (TALBOT et al., 1984). As seqüências primárias de vários clones de cDNA mostraram que a família multigênica da faseolina é constituída por duas subfamílias distintas (alfa e beta) com 98% de homologia entre elas. As duas subfamílias de genes diferenciam em suas regiões codificadoras pela presença (subfamília alfa) e ausência (subfamília beta) de duas repetições de 15 e 27 pares de nucleotídeos. Esses dois

grupos de genes podem ser distinguidos em nível de estrutura primária dos polipeptídeos correspondentes pela substituição de poucos aminoácidos na subfamília alfa, substituição esta ausente na subfamília beta (SLIGHTOM et al., 1983).

GEPTS (1984 e 1988), por meio de análises eletroforéticas em gel de poliacrilamida, determinou os tipos de faseolina, principal fração protéica das sementes de feijão, que ocorrem nas formas silvestres e cultivadas. Descobriu que, no México e América Central, as formas silvestres exibiam os tipos "S" e "M", enquanto na Colômbia apresentavam os tipos "B" e "CH" e nos Andes do sul somente a faseolina do tipo "T" (Quadro 1). Verificou, ainda, que há uma correspondência na distribuição geográfica dos tipos de faseolina entre os feijões silvestres e cultivados. Os feijões com o tipo "S" predominam no México e América Central (92%), ao passo que os com o tipo "T" predominam no sul dos Andes (50%). O tipo "B" somente foi encontrado em feijões silvestres e cultivados da Colômbia. Por outro lado, os tipos "C", "H" e "A" foram encontrados apenas em formas cultivadas nos Andes.

Existe uma correlação entre o tipo de faseolina e o tamanho da semente. Cultivares com tipo "T", "C", "H" e "A" têm sementes maiores que os cultivares com os tipos "S" e "B" da faseolina.

Novos tipos de faseolina foram identificados por KOENIG et al. (1990): "J" em formas silvestres na Argentina, e "I" num acesso silvestre do norte do Peru. Formas variantes da faseolina "S" também foram encontradas em feijões cultivados: "Sb", foram encontradas em alguns cultivares de sementes do Brasil, como Rio Tibagi e Mulatinho Vagem Roxa, e "Sd", predominando nos cultivares do altiplano Central do México. Esses mesmos autores verificaram também que a distribuição

da faseolina "B" é mais ampla do que se supunha, abrangendo, além da Colômbia, também a América Central.

QUADRO 1 - Distribuição Geográfica dos Tipos de Faseolina em Feijões Silvestres e Cultivados (GEPTS, 1984, 1988)

Regiões	Silvestres	Cultivado
México e América Central	"S", "M"	"S" (92%) "T" (8%)
Colômbia	"B", "CH"	"S" (64%) "T" (26%) "C" (7%) "B" (3%)
Andes (exceto Colômbia)	"T"	"S" (17%) "T" (50%) "C" (23%) "H" (8%) "A" (2%)

GEPTS et al. (1986) e GEPTS e BLISS (1986), combinando informações do tipo de faseolina e tamanho da semente, concluíram que houve três centros de domesticação do feijoeiro: um no México e América Central, a domesticação deu origem a cultivares de sementes pequenas com faseolina do tipo "S"; um segundo na Colômbia, a cultivares com sementes pequenas e faseolina do tipo "B" e um terceiro no sul dos Andes, a sementes grandes e faseolina do tipo "T" (e possivelmente "A", "C" e "H"). O primeiro e o terceiro centros de domesticação são considerados primários e o da Colômbia, de menor

importância. Os dois centros principais de domesticação têm relação com dois grupos de germoplasma, conforme demonstra o chamado ananismo ou fraqueza do híbrido F1, observada por diversos autores. Essa anormalidade resulta do cruzamento entre determinados genótipos, que faz com que as plantas F1 morram ou tenham 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 do tipo "T" ou "C" (SINGH e GUTIÉRREZ, 1984; GEPTS, 1988). Portanto, ela somente pode acontecer quando se cruzam cultivares originários do México e América Central com cultivares dos Andes. Isso é um indicativo de que houve um longo isolamento geográfico entre os germoplasmas das duas regiões.

PEREIRA e SOUZA (1992), trabalhando com 192 "raças crioulas" coletadas no Brasil, encontraram, por meio de eletroforese unidimensional, somente dois tipos de faseolina: "S" e "T". Apesar de ter sido observado variabilidade nas características morfológicas das sementes de algumas dessas raças, não foi observada heterogeneidade no tipo de faseolina, com predominância da faseolina "S" em todos os estados brasileiros estudados (80,6% do tipo "S" e 19,4% do tipo "T"). O tamanho das sementes com faseolina do tipo "T" (centro primário de domesticação andina) foi superior ao do tipo "S" (centro primário de domesticação mesoamericana). Esta pesquisa confirma a predominância de materiais de origem mesoamericana no Brasil, sendo sua distribuição uniforme nas diversas regiões. Como a maioria das variedades brasileiras apresenta apenas dois tipos principais de faseolina, o uso dessa proteína como ferramenta na identificação de diferentes genótipos do feijoeiro é restrito.

No Brasil, são comuns 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. O primeiro grupo foi introduzido do México e América Central seguindo, provavelmente, a rota norte da América do Sul e Brasil, talvez passando pelas Antilhas, pois nessas áreas predominam os feijões com faseolina "S", como os feijões pretos Rico 23 e Rio Tibagi. Os feijões graúdos, com faseolina do tipo "T", podem ter sido introduzidos diretamente dos Andes, mas podem também, pelo menos parcialmente, ter sido trazidos ao Brasil pelos imigrantes europeus.

2.3. Variabilidade x Melhoramento

Ao se iniciar um programa de melhoramento de plantas, um dos pontos fundamentais é a escolha dos progenitores que participarão dos cruzamentos, para que se obtenha uma população de base genética ampla em que a seleção atuará. Isso é conseguido quando se alia alta média com ampla variabilidade genética do caráter a ser selecionado. A divergência genética, ou seja, a diferença nas frequências alélicas das populações (FALCONER, 1981) tem uma importância fundamental na escolha de variedades utilizadas como progenitores, visando à obtenção de novas variedades, geneticamente superiores.

Os critérios para a escolha dos progenitores normalmente se restringem à análise de seu comportamento "per se" e nos resultados de cruzamentos dialélicos, nos quais pode-se estimar a capacidade específica de combinação e a heterose, com os quais pode-se tirar inferências sobre a divergência genética das variedades. No entanto, essas alternativas apresentam dificuldades de ordem prática na

realização dos cruzamentos, que aumentam quando um grande número de progenitores é envolvido. Uma medida da divergência genética, antes da realização de cruzamento, poderá auxiliar os melhoristas a concentrar seus esforços somente nas combinações mais contrastantes, já que esta divergência genética está relacionada à heterose manifestada nos cruzamentos (FALCONER, 1981). Vários modelos foram propostos para se estimar tais parâmetros (GARDNER e EBERHART, 1966; GRIFFING, 1956), mas todos possuem o inconveniente de requerer um grande número de cruzamentos que, em certas situações, são onerosos e de difícil realização.

Outra forma de se estimar a divergência genética é por meio da associação de técnicas multivariadas: componentes principais e distâncias multivariadas (CRUZ, 1990; MIRANDA et al., 1988), ou variáveis canônicas e distâncias multivariadas (CRUZ, 1990). Essas alternativas têm como finalidade básica a redução do número de variáveis e, conseqüentemente, a simplificação na obtenção das distâncias multivariadas. Sua eficiência depende da quantidade de variação que essas novas variáveis explicam, em relação às variações existentes nos caracteres originais.

Vários melhoristas têm utilizado as técnicas multivariadas para estimar a divergência genética, com a finalidade de reduzir os esforços na obtenção dos híbridos e concentrá-los somente nas combinações possivelmente promissoras para o programa de melhoramento.

A estimativa da distância genética entre genótipos pode também ser feita a partir de marcadores moleculares. A vantagem, nesse caso, é a possibilidade de se obter um grande número de dados, o que permite amostrar a variabilidade genética de modo mais eficiente e, conseqüentemente, estimar a distância genética de modo mais preciso. Isso é verdadeiro principalmente quando se considera uma população

de genótipos já melhorados, da qual se pretende escolher progenitores. Neste caso, tais genótipos já possuem uma freqüência elevada de alelos favoráveis para caracteres de interesse como, por exemplo, produção de grãos. Assim, as distâncias genéticas irão indicar os genótipos que, teoricamente, fornecerão as melhores complementações genotípicas a partir do cruzamento e, conseqüentemente, as populações com maior taxa de segregação, a partir da qual há maiores chances de sucesso com a seleção.

2.4. Marcadores Genéticos

Em várias espécies de plantas, têm-se usado quatro tipos de marcadores: citológicos, morfológicos, bioquímicos e moleculares. Os primeiros marcadores utilizados em plantas foram os marcadores morfológicos (SAX, 1923, citado por KEIM et al., 1990). Embora de fácil monitoramento, sua obtenção é um processo demorado, pois depende do desenvolvimento da planta e podem ser afetados pelo ambiente (HU e QUIROS, 1991). Além disso, o número de marcadores é bastante limitado. Quanto aos marcadores citológicos, seu uso pode alterar seriamente o fenótipo da planta, produzindo indivíduos que não podem ser utilizados e também são muito difíceis de serem monitorados em cruzamentos. Nos últimos anos, marcadores bioquímicos como isoenzimas e proteínas de reserva, têm sido utilizados em muitas espécies e têm ajudado a desenvolver, em grande parte, a seleção assistida por marcadores. No entanto, devido ao seu número limitado e baixo nível de polimorfismo mostrado em algumas espécies, as isoenzimas não têm sido usadas extensivamente como metodologia de seleção indireta (HU e QUIROS, 1991). Os marcadores moleculares surgiram mais recentemente, com o advento da biologia molecular. São

marcadores genéticos baseados no DNA, apresentando várias vantagens sobre os outros tipos de marcadores. Dentre essas vantagens estão: o número elevado de marcadores, o alto grau de polimorfismo, a não influência do meio ambiente e a não apresentação de efeito pleiotrópico. Dentre esses marcadores destacam-se os RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") e o RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"), que ocorrem devido a variações naturais nas seqüências de bases do DNA.

Uma das maneiras de se observar a variabilidade intra-específica do genoma de plantas é por meio do grau de polimorfismo nas seqüências de DNA. Estas podem ser seqüências altamente repetitivas, genes de cópia única ou pequenas famílias de genes. Essas diferenças podem ser detectadas quando amostras de DNA genômico de plantas geneticamente distintas são submetidas a uma das técnicas de biologia molecular, como a da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR).

O PCR é um processo simples, mediante o qual um fragmento específico de DNA é sintetizado repetidamente e o resultado é a produção de grande quantidade deste fragmento a partir de pequeníssimas quantidades dele (SAIKI et al., 1985). O procedimento é dependente da seqüência primária (iniciadores) que se paream com as seqüências que flanqueiam o fragmento de DNA que se quer amplificar. Por meio de passos repetidos de desnaturação, pareamento e polimerização, a seqüência alvo é amplificada. A técnica do RAPD desenvolvido recentemente por dois grupos independentes (WELSH e McCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990) utiliza o PCR. Diferentemente do PCR, o RAPD é baseado na utilização de oligonucleotídeos sintéticos como iniciadores aleatórios, podendo ser

aplicado a qualquer organismo, sem a necessidade de conhecimento prévio da seqüência do DNA a ser analisado.

Essa técnica fornece um novo tipo de polimorfismo de DNA detectado na forma de presença ou ausência de bandas discretas de DNA. O RAPD tem a desvantagem de ser um marcador dominante, não detectando os indivíduos heterozigóticos, ao contrário de que acontece com o marcador molecular RFLP, que tem herança codominante.

Dentre as várias aplicações da técnica de RAPD, podem-se citar a construção de mapas genéticos detalhados, de alta densidade, elaborados para vários organismos diferentes, usando o mesmo conjunto de iniciadores aleatórios (TINGEY et al., 1991). Possibilita também acelerar programas de retrocruzamentos, pois permite selecionar, por meio do DNA, nas populações segregantes, os indivíduos que mais se assemelham ao progenitor recorrente, podendo desta forma diminuir o número de retrocruzamentos a serem realizados (TANKSLEY et al., 1989). Permite, ainda, estudar a variabilidade genética entre vários organismos, como demonstram GRAJAL-MARTIN et al. (1993) caracterizando a raça 2 do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. GURTHRIE et al. (1992) utilizaram marcadores RAPD na identificação e diferenciação de isolados de *Colletotrichum graminicola*. Com o objetivo de identificar grupos distintos para utilização em cruzamentos e mapeamento genético, ABDELNOOR (1994) utilizou marcadores RAPD na avaliação da diversidade genética entre 38 cultivares de soja. HU e QUIROS (1991) utilizaram RAPD na identificação de cultivares de brócolos e couve-flor. E ainda podem ser citados COBB e CLARKSON (1993) que utilizaram marcadores RAPD para calcular similaridade genética relativa entre isolados de *Metarhizium*, dentre vários outros trabalhos já conhecidos na literatura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Fonte de Germoplasma

Os 28 cultivares de feijão utilizados neste trabalho foram obtidos junto ao banco ativo de germoplasma do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

No Quadro 2, estão listados os cultivares e algumas de suas características. A Figura 1 mostra características fenotípicas das sementes de cada cultivar estudado.

Uma parte das sementes dos cultivares mencionados foi utilizada na análise eletroforética da proteína de reserva, a faseolina. A outra parte foi tratada com fungicida e semeada em casa de vegetação. Folhas das plantas adultas foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas à temperatura de -80°C , para posterior extração de DNA.

QUADRO 2 - Relação dos Cultivares de Feijão Utilizados

Cultivar	Origem	Cor do Tegumento	Tamanho da Semente
01. Ouro Negro	Honduras	Preto	Pequena
02. Ouro	CIAT*	Creme	Pequena
03. Milionário 1732	CIAT	Preto	Pequena
04. Manteigão Fosco 11	Brasil	Bege	Grande
05. Carioca	Brasil	Bege/marrom	Pequena
06. Diacol Calima	Colômbia	Bege/vermelho	Grande
07. Ouro Branco	CIAT	Branco	Grande
08. CNF 5547	CNPAF**	Bege/Roxo	Pequena
09. Caraota 260	Venezuela	Preto	Pequena
10. Jalo EEP 558	Brasil	Amarelo	Grande
11. Negrito 897	Costa Rica	Preto	Pequeno
12. Ricopardo 896	Costa Rica	Pardo	Pequeno
13. Cornell 49-242	Venezuela	Preto	Pequeno
14. Diacol Andino	Colômbia	Rosa/Vermelho	Média
15. ICA Tundama	Colômbia	Branco/vermelho	Grande
16. Antioquia 8	Colômbia	Branco/vermelho	Grande
17. Dark Red Kidney	EUA	Vermelho	Grande
18. ESAL 633	Brasil	Bege/Marrom	Pequena
19. US Pinto 111	EUA	Bege/Marrom	Média
20. RAB 94	***	Vermelho	Pequena
21. Costa Rica 1031	Costa Rica	Preto	Pequena
22. Venezuela 350	Venezuela	Preto	Pequena
23. Seleção Cuva	***	Preto	Pequena
24. ESAL 648	Brasil	Bege/Marrom	Pequena
25. 2172	***	Vinho	Pequena
26. Rio Tibagi	Brasil	Preto	Pequena
27. Mineiro Precoce	Brasil	Bege	Grande
28. Preto 60 Dias	Brasil	Preto	Média

*Centro Internacional de Agricultura Tropical.

**Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão.

***Origem desconhecida.

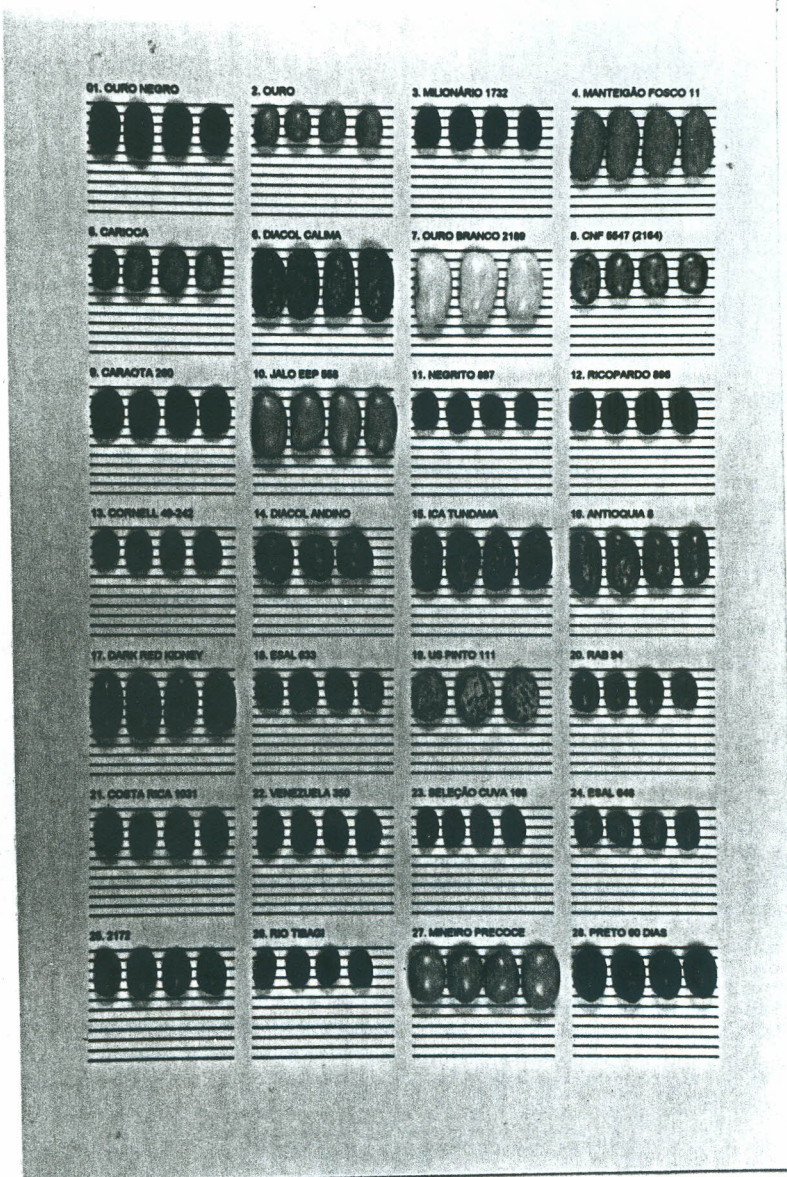


FIGURA 1 - Características Fenotípicas dos 28 Cultivares de Feijoeiro-Comum.

3.2. Análise de Faseolina por Eletroforese

Sementes de todos os 28 cultivares foram caracterizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Para isso, uma pequena porção do cotilédone de uma semente de cada cultivar foi homogeneizada em gral, juntamente com 1000 ul de tampão de extração (Tris-HCl 0,05M, pH 6,8). Em seguida, o homogenato foi centrifugado em microcentrífuga "EPPENDORF", a 13.000 rpm, à temperatura ambiente. Uma alíquota do sobrenadante foi misturada com igual volume de tampão de amostra (0,05M de Tris-HCl, pH 8,0, 0,2% de SDS; 5M de uréia e 0,05% de azul de bromofenol) 20 ul de 2-mercaptoetanol. Uma alíquota de 10 ul deste extrato foi aplicada em gel **gradiente de acrilamida (7,5% - 15%)**. O gel de separação era composto de 0,375 M de Tris-HCl pH 8,5, 7,5 - 15% de acrilamida, 0,1% de SDS, 0,06% de persulfato de amônio e 0,05% de TEMED. O gel empilhador era composto de 0,14 M de Tris-HCl pH 6,8 , 0,1% de SDS , 4,5% de acrilamida , 0,1% de persulfato de amônio e 0,05% de TEMED. O tampão de corrida utilizado era constituído de 0,576 M de glicina, 0,072 M Tris-HCl pH 8,5 e 0,24% de SDS. A corrida foi efetuada durante sete horas, a 100 volts. Após a corrida, o gel foi corado durante a noite em solução contendo 45% de metanol, 9% de ácido acético e 0,1% de Coomassie Brilliant blue R 250. Após a coloração, o gel foi transferido para uma solução descorante (7,5% de ácido acético e 25% de metanol) até que as bandas protéicas se tornassem nítidas.

3.3. Extração de DNA

A extração do DNA de folhas do feijoeiro foi feita, com base no protocolo descrito por KEIM et al. (1988), com algumas modificações.

Basicamente, 1-2 g de folhas novas de cada cultivar foram trituradas em gral de porcelana, em presença de nitrogênio líquido, até formar um pó bem fino. Este pó foi transferido para um tubo de polipropileno onde foram adicionados 15 ml de tampão de extração, constituído de Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 50 mM pH 8,0, NaCl 0,7 M e 1% de CTAB (brometo de hexadeciltrimetil amônio), pré-aquecido a 65°C. As amostras foram incubadas a 65°C por 60 a 90 minutos, sendo levemente agitadas a cada 15 minutos. Após a incubação, as proteínas foram extraídas pela adição de um volume (1:1) de clorofórmio: álcool isoamílico numa proporção de 24:1, agitação suave dos tubos, por inversão, durante 5 minutos, e posterior centrifugação das amostras por 15 minutos, a 3500 rpm, em centrífuga EXCELSA BABY II modelo 206-R FANEM. O sobrenadante foi então submetido a nova etapa de desproteinização e o sobrenadante final foi transferido para um terceiro tubo, onde foi adicionado 2/3 do volume de isopropanol gelado para promover a precipitação dos ácidos nucléicos. Esse precipitado foi transferido para um tubo de ensaio contendo etanol 80% com auxílio de pipetas de Pasteur com as extremidades invertidas em forma de anzol. Os ácidos nucléicos foram incubados por 20 minutos e transferidos para tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, secados a vácuo e ressuspensos em 750 ul de tampão TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1,0 mM, pH 8,0). Após completa ressuspensão dos ácidos nucléicos, adicionou-se RNase A numa concentração final de 40 mg/ml. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos e, em seguida, o DNA foi precipitado pela adição de dois volumes de etanol 95% em presença de 1/10 volume de acetato de sódio 3M. O DNA foi recuperado por centrifugação a 13.500 rpm por 10 minutos, em microcentrífuga "EPPENDORF", lavado com etanol 70%, secado a vácuo, e finalmente ressuspensão em 750 ul TE. A quantificação do DNA

foi feita em espectrofotômetro UV/VIS a 260 nm e a sua pureza foi estimada pela razão A_{260}/A_{280} (SAMBROOK et al., 1989). A qualidade do DNA extraído foi também analisada eletroforeticamente em gel de agarose a 0,8%.

3.4. Processo de Amplificação e Separação dos Fragmentos de DNA Amplificados por Eletroforese em Gel de Agarose

As reações de amplificação foram feitas em um volume final de 25 μ l, cada reação contendo 10 mM de Tris-HCl pH8,0, 50 mM de KCl, 2 mM de $MgCl_2$, 100 μ M de cada um dos deoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,4 μ M de um oligonucleotídeo iniciador ("primer"), 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase e 25 ng de DNA. As reações foram efetuadas em um termociclador Perkin-Elmer Cetus, modelo 9600, utilizando um programa com 40 ciclos sucessivos. Cada ciclo compreendia uma etapa de desnaturação do DNA (15 segundos a 94^o C), uma etapa para o pareamento do iniciador (30 segundos a 35^o C) e uma etapa de alongamento (1 minuto a 72^o C). Após os 40 ciclos, era efetuada uma etapa de 7 minutos para o alongamento final. Os iniciadores utilizados foram decanucleotídeos adquiridos junto à "Operon Technologies" (Califórnia, EUA) e estão descritos no Quadro 3, com as respectivas seqüências de bases.

Após a amplificação, os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TBE (Tris-Borato 0,09 M e EDTA 2 mM) a 100 volts, por 4 horas. Foi utilizado como padrão de tamanho o DNA do bacteriófago λ , clivado com as enzimas de restrição *Bam* HI, *Eco* RI e *Hind* III. Os tamanhos dos fragmentos, em pares de bases (pb), são os seguintes: 15.721, 9.035, 5.505, 3.775, 3.535, 2.752, 2.564, 2.396, 2.027, 1.584, 1.375, 1.120,

QUADRO 3 - Relação dos Oligonucleotídeos Iniciadores Utilizados e suas Respectivas Seqüências de Bases

Iniciadores	Seqüência 5' - 3'	Iniciadores	Seqüências 5' - 3'
OPA05	AGGGGTCTTG	OPH10	CTCCGCAGT
OPA07	GAAACGGGTG	OPH11	GACGCCACAC
OPA08	GTGACGTAGG	OPH14	ACCAGGTTGG
OPB0	GTTTCGCTCC	OPH15	AATGGCGGAG
OPB03	CATCCCCCTG	OPH16	TCTCAGCTGG
OPC01	TTCGAGCCAG	OPI01	ACCTGGACAC
OPC04	CCGCATCTAC	OPI03	CAGAAGCCCA
OPC06	GAACGGACTC	OPI06	AAGGCGGCAG
OPC07	GTCCCGACGA	OPI07	CAGCGACAAG
OPD12	CACCGTATCC	OPI15	TCATCCGAGG
OPE03	CCAGATGCAC	OPI16	TCTCCGCCCT
OPE07	AGATGCAGCC	OPJ05	CTCCATGGGG
OPE09	CTTCACCCGA	OPJ12	GTCCCGTGGT
OPF04	GGTGATCAGG	OPK01	CATTCGAGCC
OPF07	CCGATATCCC	OPK02	GTCTCCGCAA
OPG03	GAGCCCTCCA	OPK03	CCAGCTTAGG
OPG19	GTCAGGGCAA	OPL02	TGGGCGTCAA
OPH02	TCGGACGTGA	OPM02	ACAACCGCCTC
OPH03	AGACGTCCAC	OPM04	GGCGGTTGTC
OPH04	GGAAGTCGCC	OPN03	GGTACTCCCC
OPH07	CTGCATCGTG	OPX01	CTGGGCACGA
OPH08	GAAACACCCC	OPW02	ACCCCGCCAA
OPH09	TGTAGCTGGG		

947, 831, 784, 564 e 493. Para visualização das bandas de DNA, os géis eram corados com brometo de etídio 10 ug por 50 ml de gel. Após a separação eletroforética, os géis eram fotografados sob luz ultravioleta, com câmera polaróide.

3.5. Análise dos Dados Obtidos por RAPD

Os produtos de amplificação (bandas de DNA) de maior intensidade, e cuja amplificação pôde ser reproduzida, foram tabulados como 1 (presença) e 0 (ausência). A distância genética entre os pares de cultivares foi calculada com base no complemento do coeficiente de similaridade definido por NEI e LI (1979), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Distância genética} = 1 - \frac{2N_{AB}}{N_A + N_B}$$

em que

N_{AB} - número de fragmentos de DNA comuns aos cultivares A e B;

N_A - número de fragmentos de DNA do cultivar A, e

N_B - número de fragmentos de DNA do cultivar B.

Esses dados foram então utilizados para agrupar os cultivares estudados pelo método das ligações simples, usando o programa estatístico SAEG, desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa.

A matriz de distâncias foi usada para a análise multivariada (variáveis canônicas), utilizando o programa genético-estatístico Genes I, desenvolvido pelo Departamento de Biologia Geral da UFV.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise Eletroforética da Faseolina dos Cultivares de Feijão

Os tipos principais de faseolina presentes nos grãos dos cultivares estão arrolados no Quadro 4. Na Figura 2, estão representados os padrões de bandas relativos à faseolina dos 28 cultivares, juntamente com três genótipos padrão, representativos dos principais tipos de faseolina: "C" do cultivar Contender, "S" do cultivar Sanilac e "T" do cultivar Tendergreen. Dos 28 materiais em estudo, 18 apresentaram faseolina do tipo "S" (64,29%) e os outros 10 materiais apresentaram faseolina do tipo "T" (35,71%). A predominância de faseolina do tipo "S" em relação ao tipo "T" confirma estudos anteriores feitos por GEPTS et al. (1986) e PEREIRA e SOUZA (1992), que observaram que cultivares com sementes menores e de origem mesoamericana apresentam, principalmente, a faseolina do tipo "S" e que, nos cultivares com sementes maiores e do centro de domesticação andina, prevalece a faseolina do tipo "T". Em ambas as regiões,

QUADRO 4 - Tipos de Faseolina e Peso Médio de 100 Sementes de 28 Cultivares de Feijão

Cultivar	Tipo de Faseolina	Peso de 100 Sementes (g)*	Coefficiente de Variação (%)
01. Ouro Negro	"S"	19,79	8,91
02. Ouro	"S"	18,24	0,76
03. Milionário 1732	"S"	16,51	0,96
04. Manteigão Fosco	"T"	44,36	0,88
05. Carioca	"S"	17,38	6,63
06. Diacol Calima	"T"	61,47	0,82
07. Ouro Branco	"T"	45,76	1,23
08. CNF 5547	"S"	22,67	0,77
09. Caraota 260	"S"	16,97	2,08
10. Jalo EEP 558	"T"	42,55	2,26
11. Negrito 897	"S"	15,26	3,03
12. Ricopardo 896	"S"	21,21	0,87
13. Cornell 49-242	"S"	14,30	6,99
14. Diacol Andino	"T"	32,81	5,79
15. Ica Tundama	"T"	38,87	2,48
16. Antioquia 8	"T"	34,79	1,36
17. Dark Red Kidney	"T"	40,10	2,31
18. ESAL 633	"S"	15,89	0,31
19. US Pinto 111	"S"	25,04	1,03
20. RAB 94	"S"	16,67	1,99
21. Costa Rica 1031	"S"	18,14	6,36
22. Venezuela 350	"S"	20,31	1,09
23. Seleção Cuva	"S"	19,99	1,32
24. ESAL 648	"S"	14,48	2,02
25. 2172	"S"	19,04	4,47
26. Rio Tibagi	"S"	11,73	1,43
27. Mineiro Precoce	"T"	45,37	2,20
28. Preto 60 Dias	"T"	32,53	1,26

* Os dados correspondem à média de três determinações independentes.

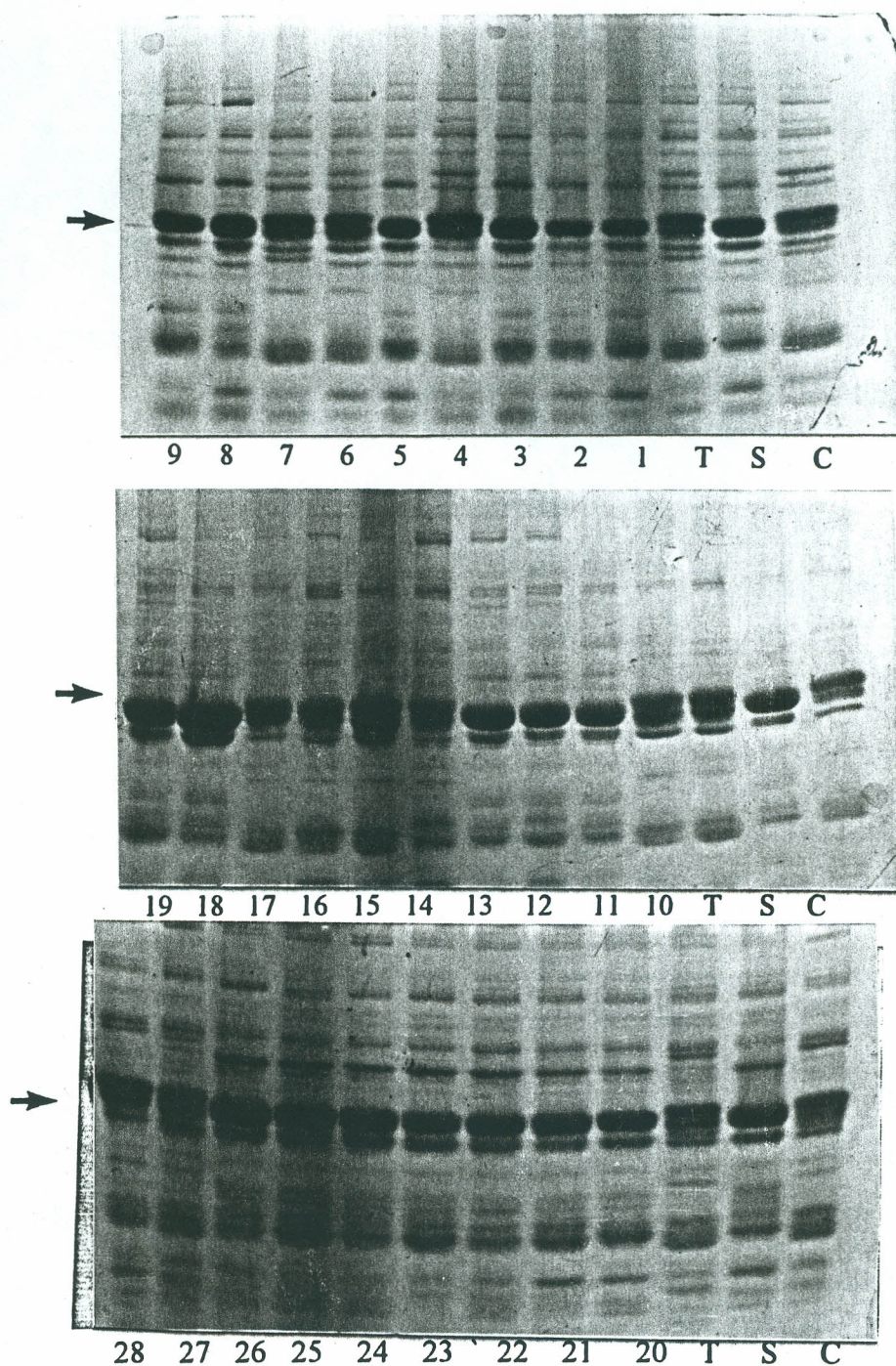


FIGURA 2 - Análise Eletroforética da Proteína de Reserva dos 28 Cultivares Estudados. As Proteínas de Cada Cultivar Foram Extraídas e Aplicadas em Gel Gradiente de Poliacrilamida (7,5 a 15%). A Identificação de Cada Cultivar está de Acordo com o Quadro 2. As Três Últimas Canaletas de Cada Gel Correspondem à Proteína de Reserva dos Cultivares Tendergreen ("T"), Sanilac ("S") e Contender ("C"). As Setas Indicam as Posições da Faseolina.

sementes de cultivares com faseolina "T" são maiores que as sementes com faseolinas do tipo "S" (GEPTS et al., 1986). O Quadro 4 mostra também o tamanho das sementes dos 28 cultivares, representado pelo peso de 100 sementes.

4.2. Classificação e Identificação dos Marcadores Moleculares do Tipo RAPD

Como esperado, os dados relativos aos padrões de faseolina e dos tamanhos de sementes permitiram separar os genótipos estudados em dois grandes grupos. A fim de se estudar a variabilidade entre os cultivares de modo mais detalhado, foi utilizada a técnica de RAPD. Um dos requisitos básicos do RAPD refere-se à qualidade do DNA genômico que será utilizado como molde nas reações. O método de extração de DNA, em que se utilizou o CTAB, mostrou-se bastante eficiente, possibilitando a obtenção de grande quantidade e boa qualidade de DNA.

A quantidade de DNA obtida variou de 7,5 a 356,0 ug. A pureza das amostras foi estimada pela razão entre as leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm (Quadro 5). Esses valores variaram de 1,6 (Ouro, Carioca, ICA Tundama, Seleção Cuva e Rio Tibagi) a 2,0 (Antioquia 8, Manteigão Fosco e ESAL 633), mostrando que o DNA obtido estava com elevado grau de pureza, livre de contaminação por clorofórmio e proteínas (SAMBROOK et al., 1989). A integridade do DNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8%. As amostras de DNA não se apresentaram degradadas, como demonstra a Figura 3, e também não apresentaram problemas nas reações de amplificação.

QUADRO 5 - Leituras Espectrofotométricas a 260 e 280 nm, Razão 260/280 e Concentrações de Cada Cultivar Estudado

Cultivar	Absorbância a 260 nm	Absorbância a 280 nm	Razão 260/280	Concentração (ug/ul)
01. Ouro Negro	0,76	0,41	1,8	0,38
02. Ouro	0,43	0,26	1,6	0,22
03. Milionário 1732	0,60	0,33	1,8	0,30
04. Manteigão Fosco 11	0,18	0,09	2,0	0,09
05. Carioca	0,23	0,14	1,6	0,11
06. Diacol Calima	0,63	0,35	1,8	0,32
07. Ouro Branco	1,60	0,91	1,7	0,80
08. CNF 5547	0,17	0,10	1,7	0,08
09. Caraota 260	0,26	0,15	1,7	0,13
10. Jalo EEP 558	0,28	0,15	1,9	0,14
11. Negrito 897	0,37	0,20	1,8	0,19
12. Ricopardo 896	0,14	0,08	1,7	0,07
13. Cornell 49-242	0,74	0,43	1,7	0,37
14. Diacol Andino	0,41	0,23	1,8	0,21
15. ICA Tundama	1,90	1,18	1,6	0,95
16. Antioquia 8	0,04	0,02	2,0	0,02
17. Dark Red Kidney	0,52	0,30	1,7	0,26
18. ESAL 633	0,04	0,02	2,0	0,02
19. US Pinto 111	0,71	0,40	1,8	0,36
20. RAB 94	0,96	0,52	1,8	0,48
21. Costa Rica 1031	0,26	0,15	1,7	0,13
22. Venezuela 350	0,11	0,06	1,8	0,05
23. Seleção Cuva	1,87	1,17	1,6	0,94
24. ESAL 648	1,10	0,59	1,8	0,55
25. 2172	0,49	0,27	1,8	0,25
26. Rio Tibagi	0,43	0,26	1,6	0,23
27. Mineiro Precoce	0,59	0,32	1,8	0,30
28. Preto 60 Dias	0,91	0,49	1,8	0,45

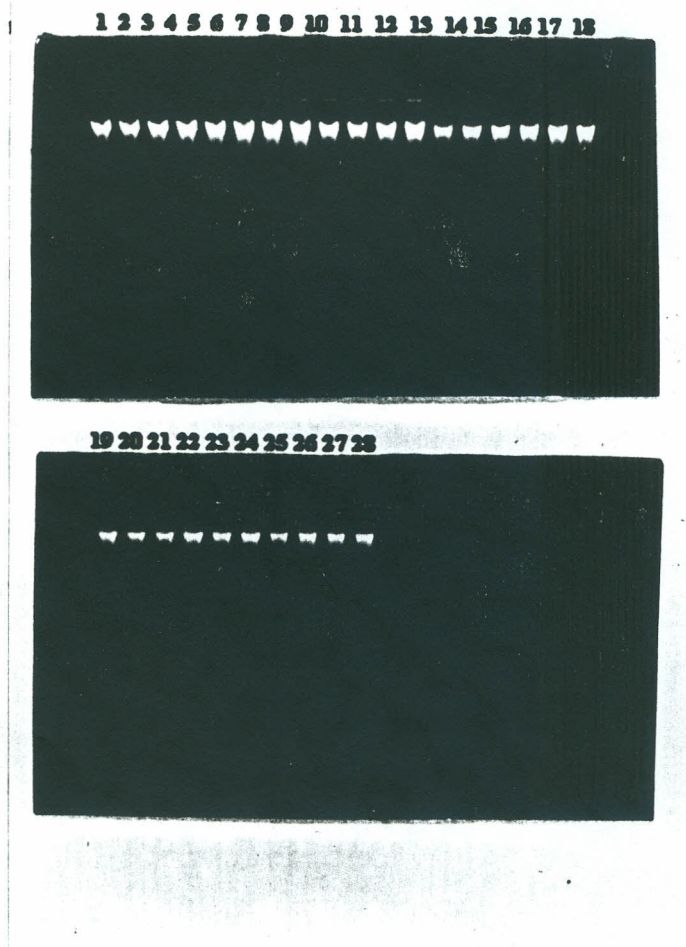


FIGURA 3 - Análise Eletroforética de Amostra de DNA de 28 Cultivares de *Phaseolus vulgaris*. Amostras de DNA Purificadas a Partir de Folhas dos Cultivares Foram Aplicadas em Gel de Agarose a 0,8% e Submetidas à Eletroforese. Cada Amostra Continha 3 ug de DNA. O Número Acima de Cada Canaleta Corresponde à Identificação do Cultivar, de Acordo com o Quadro 2.

Neste estudo de avaliação da diversidade genética, foram utilizados quarenta e cinco iniciadores que geraram pelo menos uma banda polimórfica entre os cultivares analisados. Esses quarenta e cinco iniciadores geraram 276 produtos de amplificação (bandas), com uma média de 6,13 bandas por iniciador. Destas, 144 bandas foram classificadas como polimórficas (3,2 banda por iniciador), ou seja, apresentaram polimorfismo para pelo menos um dos cultivares estudados, e 132 bandas foram monomórficas (2,9 bandas por iniciador). Esses iniciadores apresentaram ampliações de 1 (uma) a 15 (quinze) bandas, com tamanhos variando entre 230 e 4.070 pares de base (pb) (Quadro 6), sendo que 59,0% destas bandas estavam na faixa de 400 a 1100 pb e 58,0% das bandas polimórficas, na faixa de 500 a 1100 pb (Figura 4). Resultados bem parecidos a estes foram encontrados por SKROCH et al. (1992) em genótipos de *Phaseolus vulgaris*. Nesse trabalho foram usados 142 iniciadores que geraram 717 bandas discretas de DNA, com uma média de amplificação de cinco locos por iniciador. Das bandas amplificadas, 359 eram polimórficas e 358, monomórficas.

Das 144 bandas polimórficas, 140 apresentaram padrão tipicamente dominante e quatro apresentaram padrão aparentemente codominante, estas últimas geradas a partir dos iniciadores OPG-03 e OPG-19. A Figura 5 mostra o padrão de amplificação obtido com o iniciador OPG-19. Para confirmar se, de fato, as duas bandas obtidas apresentam herança codominante, seria necessária a análise de uma população segregante advinda de progenitores contrastantes para esse loco. Para o iniciador OPG-03, os possíveis alelos diferenciam-se em 130 pares de bases (pb), com as bandas apresentando tamanhos de 1250 e 1380 pb. E para o iniciador OPG-19 as bandas apresentavam

QUADRO 6 - Lista dos Oligonucleotídeos Utilizados como Iniciadores, suas Respectivas Seqüências de Base, Número e Tamanho dos Fragmentos a Estes Associados

Iniciadores	Seqüência (5' - 3')	Nº Fragmentos Polimórficos	Nº Fragmentos Monomórficos	Faixa de Tamanho dos Fragmentos (pb)
OPA-05	AGGGGTCTTG	02	02	892 a 1573
OPA-07	GAAACGGGTG	02	04	456 a 1112
OPA-08	GTGACGTAGG	02	02	958 a 2257
OPB-01	GTTTCGCTCC	06	02	493 a 2054
OPB-03	CATCCCCCTG	01	01	1886 a 3152
OPC-01	TTCGAGCCAG	03	04	234 a 963
OPC-04	CCGCATCTAC	03	03	236 a 1210
OPC-06	GAACGGACTC	04	02	890 a 2470
OPC-07	GTCCCGACGA	01	01	900 a 1000
OPD-12	CACCGTATCC	03	02	490 a 1310
OPE-03	CCAGATGCAC	01	10	360 a 1870
OPE-07	AGATGCAGCC	03	05	500 a 1920
OPE-09	CTTCACCCGA	03	00	1320 a 3670
OPF-04	GGTGATCAGG	03	02	620 a 1570
OPF-07	CCGATATCCC	07	01	550 a 1600
OPG-03	GAGCCCTCCA	03	09	440 a 3230
OPG-19	GTCAGGGCAA	05	03	380 a 1190
OPH-02	TCGGACGTGA	07	01	310 a 2770
OPH-03	AGACGTCCAC	06	04	500 a 3371
OPH-04	GGAAGTCGCC	05	02	970 a 3230
OPH-07	CTGCATCGTG	07	08	500 a 4070
OPH-08	GAAACACCCC	03	06	570 a 2770
OPH-09	TGTAGCTGGG	04	03	360 a 2270
OPH-11	CTTCCGCAGT	07	00	530 a 2150
OPH-13	GACGCCACAC	01	06	530 a 3850
OPH-14	ACCAGGTTGG	03	05	600 a 1800
OPH-15	AATGGCGGAG	02	06	330 a 1280
OPH-16	TCTCAGCTGG	01	01	650 a 730
OPI-01	ACCTGGACAC	02	03	550 a 960
OPI-03	CAGAAGCCCA	05	01	490 a 1400
OPI-06	AAGGCGGCAG	03	02	470 a 1700
OPI-07	CAGCGACAAG	05	04	550 a 2880
OPI-15	TCATCCGAGG	02	02	580 a 860
OPI-16	TCTCCGCCCT	04	02	490 a 1520
OPJ-05	CTCCATGGGG	03	02	390 a 1330
OPJ-12	GTCCCGTGGT	02	01	1120 a 3350
OPK-01	CATTCGAGCC	02	01	550 a 890
OPK-02	GTCTCCGCAA	02	02	1220 a 1772
OPK-03	CCAGCTTAGG	01	02	320 a 400
OPL-02	TGGGCGTCAA	02	02	400 a 2100
OPM-02	ACAACCGCCTC	03	03	740 a 1730
OPM-04	GGCGGTTGTC	03	01	540 a 1890
OPN-03	GGTACTCCCC	02	03	590 a 2480
OPX-01	CTGGGCACGA	02	02	600 a 1110
OPW-02	ACCCCGCCAA	03	04	620 a 3380
TOTAL		144	132	230 a 4.070

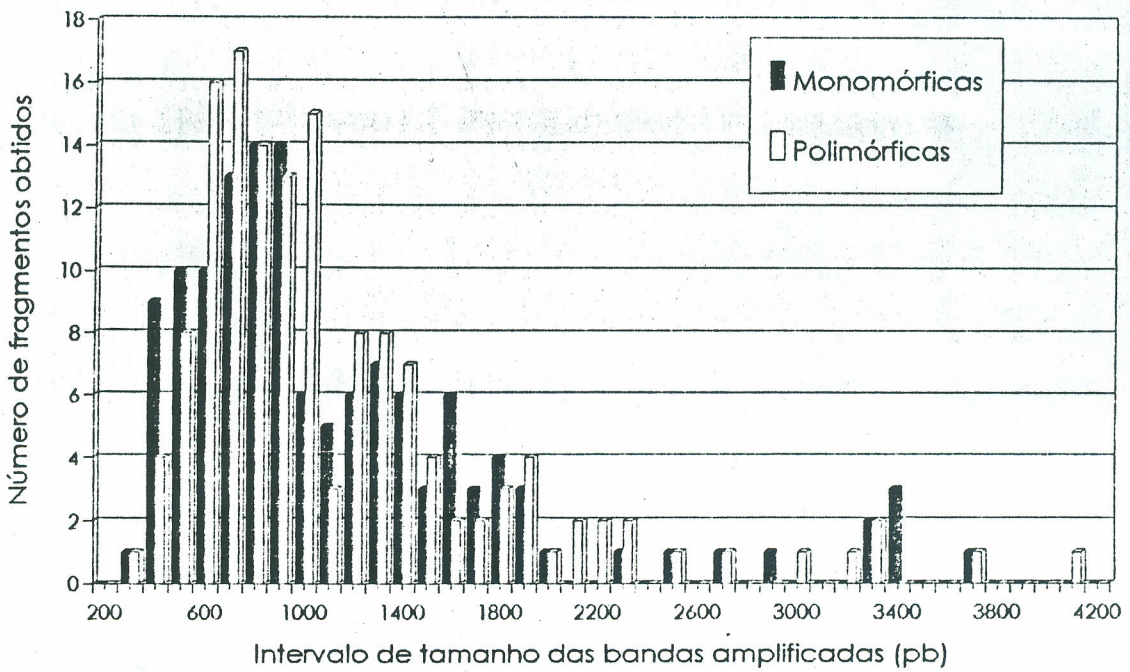


FIGURA 4 - Distribuição de Tamanhos dos 276 Produtos de Amplificação, 132 Monomórficos e 144 Polimórficos.

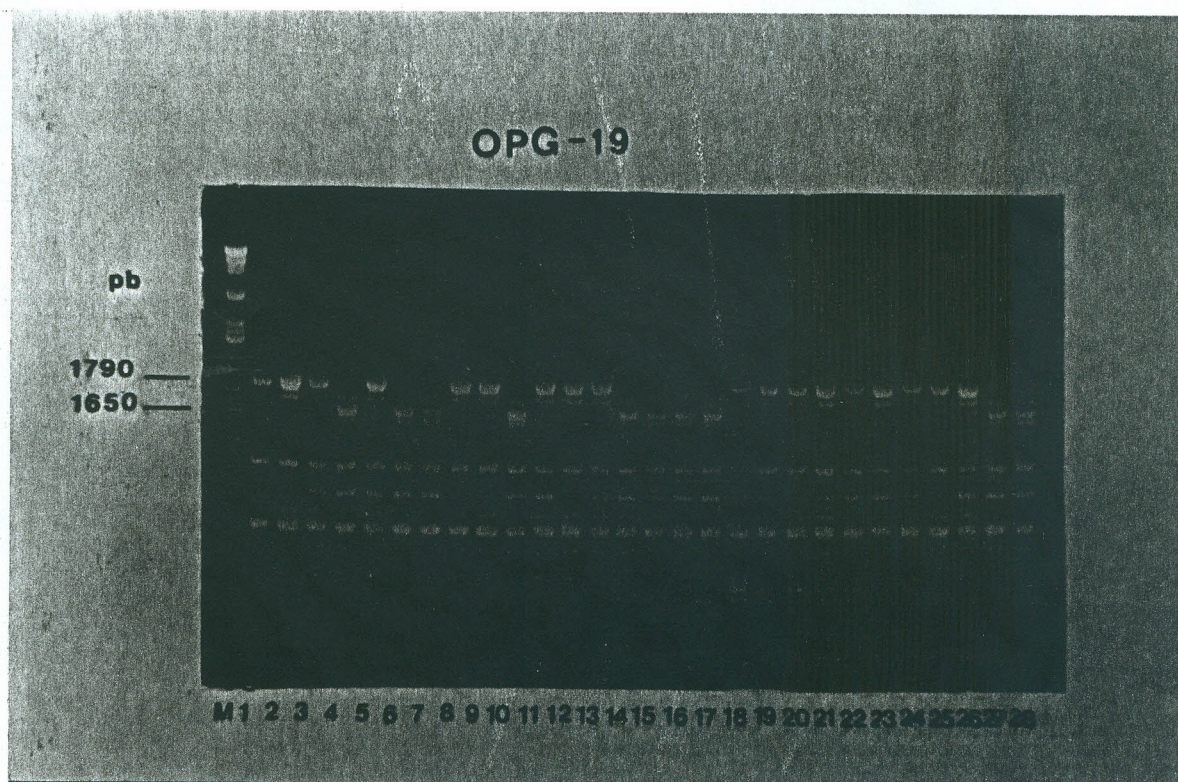


FIGURA 5 - Análise Eletroforética dos Produtos de Amplificação do DNA Genômico de 28 Cultivares de Feijão com o Iniciador OPG-19. As Bandas de DNA de 1780 e 1650 pb Parecem Constituir um Marcador Codominante. As Amostras Estão Ordenadas da Esquerda para Direita, Conforme Estabelecido no Quadro 2. A Canaleta "M" Corresponde ao DNA do Bacteriófago Lambda Digerido com as Enzimas de Restrição *Eco* RI, *Bam* HI e *Hind* III.

tamanhos de 1790 e 1650 pb, com uma diferença de 140 pb entre elas. Os marcadores RAPD são, na sua maioria, dominantes. Esse fato é justificado pelos tipos de variações que ocorrem entre os indivíduos polimórficos em nível de DNA. Na maioria das vezes, essas variações ocorrem de tal forma a impedir o processo de amplificação nos locos polimórficos. Por exemplo, mutações que impedem o pareamento adequado entre o iniciador e o DNA molde, ou inserção nas regiões flanqueadas pelos iniciadores que impedem a amplificação (WILLIAMS et al., 1990). Uma fração dos marcadores RAPD tem herança codominante. Neste caso, o polimorfismo é gerado por pequenas inserções ou deleções na região flanqueada pelos iniciadores. Tais modificações não impedem a amplificação, no entanto levam ao aparecimento de produtos de amplificação com tamanhos diferentes (WILLIAMS et al., 1990). A codominância obtida com os iniciadores OPG-03 e OPG-19, se confirmada, será de grande utilidade, pois uma das maiores desvantagens dos marcadores RAPD é justamente o seu caráter dominante, que não possibilita a identificação de indivíduos heterozigóticos. A Figura 6 mostra um exemplo de um padrão de amplificação com bandas de herança tipicamente dominantes, obtidas com a utilização do iniciador OPI-03.

4.3. Avaliação da Diversidade Genética Entre os Cultivares de Feijão

Há inúmeras vantagens no uso de marcadores moleculares, principalmente daqueles baseados no DNA, para estimar a distância genética entre indivíduos. Dentre elas, a disponibilidade de um grande número de marcadores, o que permite uma medida mais precisa da

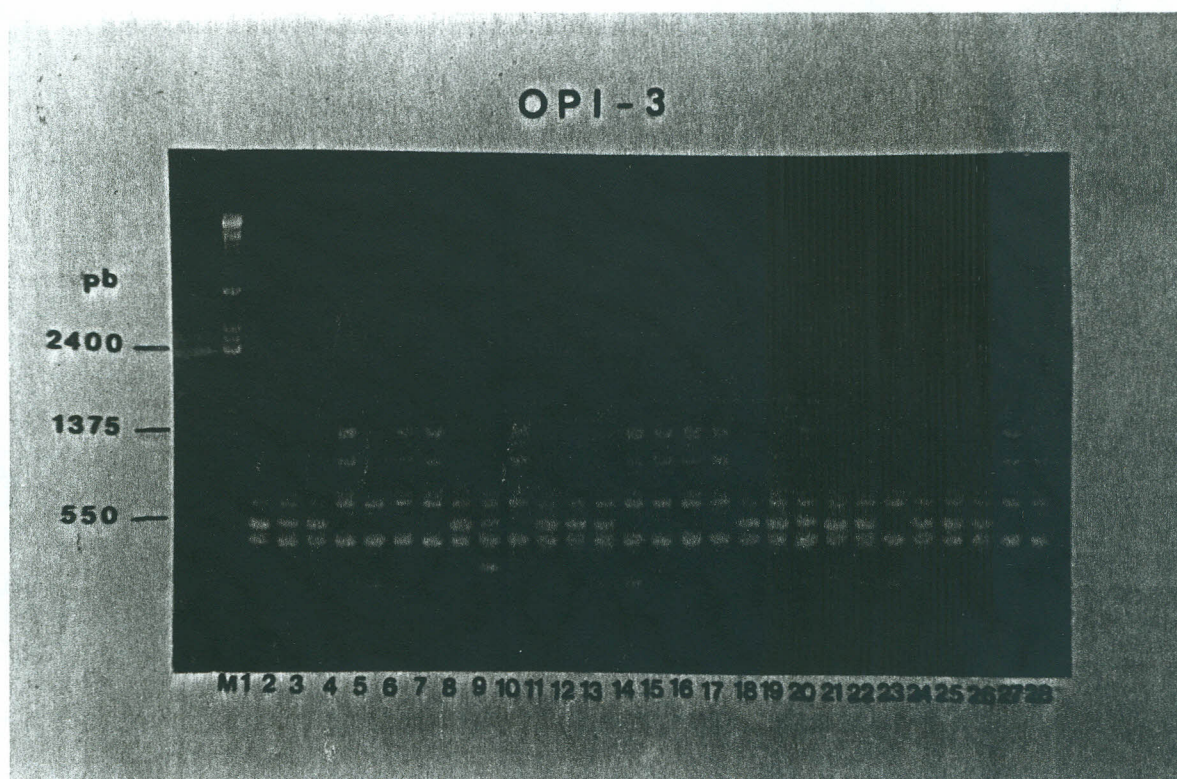


FIGURA 6 - Análise Eletroforética dos Produtos de Amplificação do DNA Genômico de 28 Cultivares de Feijão com o Iniciador OPI-03. As Bandas de DNA Típicas de um Marcador Dominante. As Amostras Estão Ordenadas da Esquerda para Direita, Conforme Estabelecido no Quadro 2. A Canaleta "M" Corresponde ao DNA do Bacteriófago Lambda Digerido com as Enzimas de Restrição *Eco* RI, *Bam* HI e *Hind* III.

variabilidade. Isso é extremamente importante quando se pretende selecionar progenitores em populações de cultivares já melhoradas. Nesse caso, a frequência de alelos favoráveis governando caracteres de interesse é grande; assim a distância genética vai indicar os genótipos que, teoricamente, fornecem as melhores complementações genotípicas em cruzamentos.

Com base nos resultados obtidos nas análises de RAPD, relativos à presença e ausência das 276 bandas de DNA (fenótipos) nos 28 cultivares, foram determinadas as distâncias genéticas entre eles. No Quadro 7, encontram-se as distâncias, em porcentagem, entre os 28 cultivares analisados. Para os cálculos das distâncias contidas nesse quadro, foram utilizados todos os quarenta e cinco iniciadores, visto que todos eles geraram bandas polimórficas. As distâncias genéticas entre os cultivares situaram-se entre 1 e 21%.

A maior distância genética foi de 21%, obtida entre pares de cultivares de regiões andinas e mesoamericanas. Esta distância foi observada entre o cultivar Dark Red Kidney e os cultivares Caraota 260 (9), Negrito 897 (11), RAB 94 (20), CNF 5547 (8) e também entre os pares de cultivares Preto 60 Dias (28) e Caraota 260 (9), Manteigão Fosco 11 (4) e CNF 5547 (8) (Quadro 8). As maiores distâncias foram obtidas entre os pares de cultivares que possuem sementes grandes e médias e faseolina do tipo "T" (Dark Red Kidney, Manteigão Fosco 11 e Preto 60 Dias) e os cultivares que possuem sementes pequenas e faseolina do tipo "S" (Caraota 260, Negrito 897, RAB 94 e CNF 5547).

As menores distâncias genéticas, na sua maioria, foram obtidas entre pares de cultivares contidas dentro dos grupos de sementes pequenas, médias ou grandes (Quadros 9 e 10). As distâncias genéticas observadas no grupo de cultivares do Centro de Domesticação Mesoamericano (sementes pequenas) variaram de 1 a 13% (Quadro 9).

QUADRO 7 - Matriz de Distâncias Genéticas (%) Entre os Cultivares de Feijoeiro, analisados dois a dois. Os Cultivares são Indicados Pelo Número Dispostos de 1 a 28 na Parte Superior e no Lado Esquerdo da Matriz, Codificados Conforme o Quadro 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1																												
2	7																											
3	7	3																										
4	18	19	19																									
5	9	2	3	18																								
6	17	18	18	3	18																							
7	16	17	17	4	17	3																						
8	9	4	6	21	6	19	19																					
9	12	6	6	19	6	19	18	6																				
10	18	19	19	3	19	3	3	20	20																			
11	9	4	4	20	5	19	19	3	5	20																		
12	10	7	7	19	6	16	16	6	9	17	5																	
13	7	2	4	18	3	17	17	2	5	18	1	5																
14	18	18	18	4	18	3	4	19	19	2	19	16	17															
15	18	18	18	2	17	2	4	20	4	19	19	17	17	5														
16	16	17	17	3	17	1	4	18	18	4	18	16	16	3	3													
17	20	20	20	3	19	3	4	21	21	2	21	17	19	3	4	4												
18	11	5	4	20	6	19	19	5	6	19	3	6	3	18	19	19	20											
19	13	11	10	17	10	18	18	9	11	18	10	12	9	17	18	17	19	7										
20	12	5	7	19	6	20	20	4	6	20	6	9	9	19	20	19	21	5	6									
21	8	5	6	19	6	18	18	3	7	18	4	6	6	17	19	17	19	5	10	6								
22	7	5	4	20	6	19	19	4	7	19	3	7	2	18	20	18	20	4	10	7	2							
23	8	5	3	18	4	18	18	6	7	18	5	7	2	17	18	17	19	5	9	7	4	3						
24	7	6	5	19	6	19	19	7	9	19	4	7	3	18	19	18	20	6	11	9	6	5	4					
25	9	6	5	20	7	19	19	5	7	19	3	5	4	18	20	18	20	3	9	6	5	3	5	5				
26	8	5	4	19	6	19	19	3	6	19	2	6	4	18	19	18	20	3	9	6	3	1	3	4	2			
27	18	19	19	2	19	3	3	21	20	2	19	17	18	3	3	4	3	19	18	20	19	20	19	18	19	19		
28	20	20	20	4	19	4	4	21	21	2	20	16	19	3	5	5	1	20	19	21	19	20	19	19	19	20	2	

QUADRO 8 - Matriz de Distâncias Genéticas (%) Entre os Cultivares de Feijoeiro Comum do Centro de Domesticação Mesoamericano (lado esquerdo) vs. Centro de Domesticação Andino (parte superior), Analisados Dois a Dois. Os Cultivares são Identificados Pelos Números Dispostos na Parte Superior e no Lado Esquerdo da Matriz, Codificados Conforme o Quadro 2

	4	6	7	10	14	15	16	17	27	28
1	18	17	16	18	18	18	16	20	18	20
2	19	18	17	19	18	18	17	20	19	20
3	19	18	17	19	18	18	17	20	19	20
5	18	18	17	19	18	17	17	19	19	19
8	21	19	19	20	19	20	18	21	21	21
9	19	19	18	20	19	18	18	21	20	21
11	20	19	19	20	19	19	18	21	19	20
12	19	16	16	17	16	17	16	17	17	16
13	18	17	17	18	17	17	16	19	18	19
18	20	19	19	19	18	19	19	20	19	20
19	17	18	18	18	17	18	17	19	18	19
20	19	20	20	20	19	20	19	21	20	21
21	19	18	18	18	17	19	17	19	19	19
22	20	19	19	19	18	20	18	20	20	20
23	18	18	18	18	17	18	17	19	19	19
24	19	19	19	19	18	19	18	20	18	19
25	20	19	19	19	18	20	18	20	19	19
26	19	19	19	19	18	19	18	20	19	20

QUADRO 9 - Matriz de Distâncias Genéticas (%) Entre os Cultivares de Feijoeiro Comum do Centro de Domesticação Mesoamericano, Analisados Dois a Dois. Os cultivares são Identificados Pelos Números Dispostos na Parte Superior e no Lado Esquerdo da Matriz, Codificados Conforme o Quadro 2

	1	2	3	5	8	9	11	12	13	18	19	20	21	22	23	24	25	26
1																		
2	7																	
3	7	3																
5	9	2	3															
8	9	4	6	6														
9	12	6	6	6	6													
11	9	4	4	5	3	5												
12	10	7	7	6	6	9	5											
13	7	2	4	3	2	5	1	5										
18	11	5	4	6	5	6	3	6	3									
19	13	11	10	10	9	11	10	12	9	7								
20	12	5	7	6	4	6	6	9	9	5	6							
21	8	5	6	6	3	7	4	6	6	5	10	6						
22	7	5	4	6	4	7	3	7	2	4	10	7	2					
23	8	5	3	4	6	7	5	7	2	5	9	7	4	3				
24	7	6	5	6	7	9	4	7	3	6	11	9	6	5	4			
25	9	6	5	7	5	7	3	5	4	3	9	6	5	3	5	5		
26	8	5	4	6	3	6	2	6	4	3	9	6	3	1	3	4	2	

QUADRO 10 - Matriz de Distâncias Genéticas (%) Entre os Cultivares de Feijoeiro Comum do Centro de Domesticação Andino, Analisados Dois a Dois. Os Cultivares são Identificados Pelos Números Dispostos na Parte Superior e no Lado Esquerdo da Matriz, Codificados Conforme o Quadro 2

	4	6	7	10	14	15	16	17	27	28
4										
6	3									
7	4	3								
10	3	3	3							
14	4	3	4	2						
15	2	2	4	4	5					
16	3	1	4	4	3	3				
17	3	3	4	2	3	4	4			
27	2	3	3	2	3	3	4	3		
28	4	4	4	2	3	5	5	1	2	

As distâncias genéticas entre os cultivares do Centro de Domesticação Andino (sementes médias e grandes) variaram de 1 a 5% (Quadro 10). No Quadro 11 estão listados os pares de cultivares menos distantes.

Os dados obtidos pela técnica de RAPD confirmam a baixa variabilidade dentro dos dois grandes grupos gênicos (mesoamericano e andino) e a existência de uma maior distância entre cultivares dos dois grupos. No entanto, devido ao alto poder de resolução dessa metodologia, foi possível determinar, de modo mais preciso, a variabilidade dentro de cada grupo de cultivares.

Para melhor visualização dos grupos obtidos pela técnica de RAPD, foi feita uma análise de agrupamento pelo método das ligações simples, com base nos dados da matriz de distâncias genéticas (Quadro 7). Tal análise permitiu a construção de um dendrograma que separou os cultivares estudados em dois grandes grupos: o grupo A com 18 cultivares e o grupo B com 10 cultivares (Figura 7). Considerando o limite de 30% distância relativa, o grupo A pôde ser subdividido em seis grupos (Quadro 12).

O grupo A engloba 18 cultivares divididos em seis subgrupos. Todos os indivíduos do grupo A possuem sementes pequenas e apresentam faseolina do tipo "S" e são do Centro de Domesticação Mesoamericano. Os cultivares do grupo "B" têm origem andina, sementes grandes e médias, com faseolina do tipo "T". Certamente esse tipo de agrupamento reflete as diferenças dos cultivares em função dos centros primários de domesticação, como já havia sido verificado anteriormente.

Análise multivariada tem sido sugerida para determinação mais precisa das distâncias genéticas entre indivíduos (MALUF e FERREIRA (1983), CRUZ e VIANA (1994)). Neste trabalho, os dados de

QUADRO 11 - Menores Distâncias Genéticas Verificadas Entre os Cultivares

Cultivares		Distância Genética
Preto 60 Dias	e	Dark Red Kidney 1%
Negrito 897	e	Cornell 49-242 1%
Venezuela 350	e	Rio Tibagi 1%
Antioquia 8	e	Diacol Calima 1%
Preto 60 Dias	e	Mineiro Precoce 2%
Preto 60 Dias	e	Negrito 897 2%
Cornell 49-242	e	Ouro 2%
Cornell 49-242	e	CNF 5547 2%
Cornell 49-242	e	Dark Red Kidney 2%
Cornell 49-242	e	Venezuela 350 2%
Cornell 49-242	e	Rio Tibagi 2%
Cornell 49-242	e	Costa Rica 1031 2%
Rio Tibagi	e	2172 2%
Rio Tibagi	e	Negrito 897 2%
Jalo EEP 558	e	Mineiro Precoce 2%
Jalo EEP 558	e	Dark Red Kidney 2%
ICA Tundama	e	Manteigão Fosco 11 2%
ICA Tundama	e	Diacol Calima 2%
Ouro	e	Carioca 2%

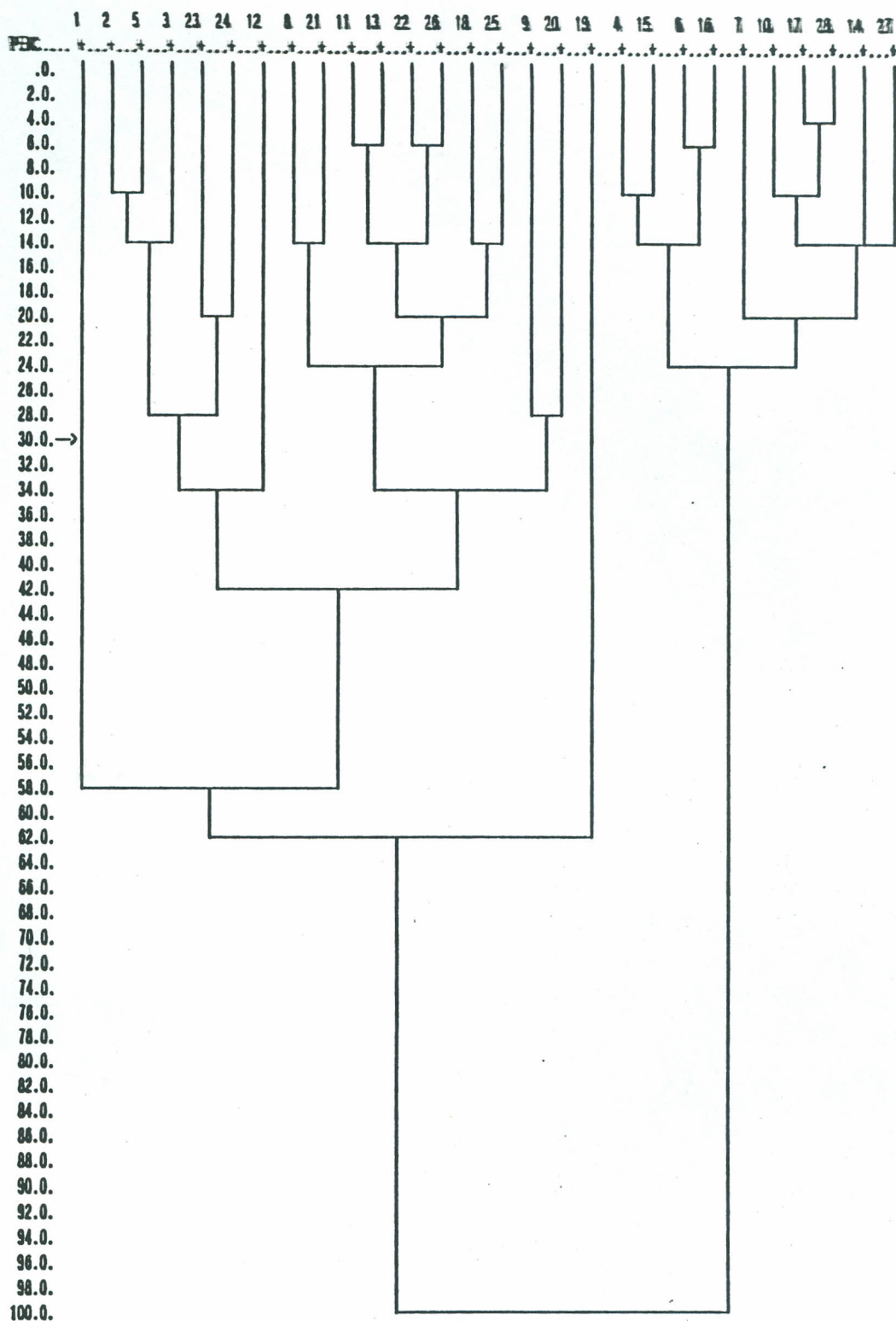


FIGURA 7 - Dendrograma Obtido com Base nas Distâncias Genéticas Entre os Cultivares (Quadro 7). A Numeração das Amostras estão Conforme Quadro 2.

QUADRO 12 - Grupos e Subgrupos de Cultivares, Formados com Base no Dendrograma da Figura 6. Os Subgrupos Foram Obtidos Tomando-se a Distância Relativa de 30% como Nível de Corte

Grupos	Subgrupos	Cultivares
A	A ₁	1 - Ouro Negro
	A ₂	2 - Ouro
		3 - Milionário 1732
		5 - Carioca
		23 - Seleção Cuva
		24 - ESAL 648
A ₃	12 - Ricopardo 896	
A ₄	8 - CNF 5547 (2164)	
	11 - Negrito 897	
	13 - Cornell 49-242	
	18 - ESAL 633	
	21 - Costa Rica 1031	
	22 - Venezuela 350	
	25 - 2172	
26 - Rio Tibagi		
A ₅	9 - Caraota 260	
	20 - RAB 94	
A ₆	19 - US Pinto 111	
B ₋	4 - Manteigão Fosco 11	
	6 - Diacol Calima	
	7 - Ouro Branco	
	10 - Jalo EEP 558	
	15 - ICA Tundama	
	16 - Antioquia 8	
	17 - Dark Red Kidney	
	27 - Mineiro Precoce	
	28 - Preto 60 Dias	

dissimilaridade obtidos por RAPD foram analisados pela técnica multivariada das variáveis canônicas (RAO, 1952). Obteve-se uma distorção de 12,36% na eficiência de projeção das 4.390 distâncias originais e um total de 3.847 distâncias estimadas, com uma correlação entre elas de 0,9744. A Figura 8 mostra a dispersão gráfica dos 28 cultivares analisados. Pode-se observar que os dois grandes grupos de cultivares estabelecidos pelas análises anteriores foram também obtidos por esse tipo de análise. No entanto, deve-se ressaltar que o cultivar Ouro Negro, que é mesoamericano, possui semente pequena e faseolina do tipo "S", ficou bem distante dos outros cultivares que apresentam essas características (Figura 8). Assim, também, o cultivar Preto 60 Dias, que é andino, possui semente média e faseolina do tipo "T", distanciou-se bastante dos outros nove cultivares do grupo andino (Figura 8). Esse tipo de análise permite uma melhor visualização das distâncias entre os indivíduos pertencentes ao mesmo grupo. Essas informações podem ser valiosas para o melhorista quando da escolha de progenitores mais adequados para iniciar um programa de melhoramento.

O presente trabalho confirma os dados já apresentados na literatura que demonstram a existência de dois centros primários de domesticação do feijão (GEPTS et al., 1986, SINGH et al., 1991). Confirma também a baixa variabilidade genética dentro desses dois grupos gênicos. E sugere, como outros autores, a busca de variabilidade genética por meio de cruzamentos entre cultivares de centros de domesticação distintos, bem como em materiais selvagens.

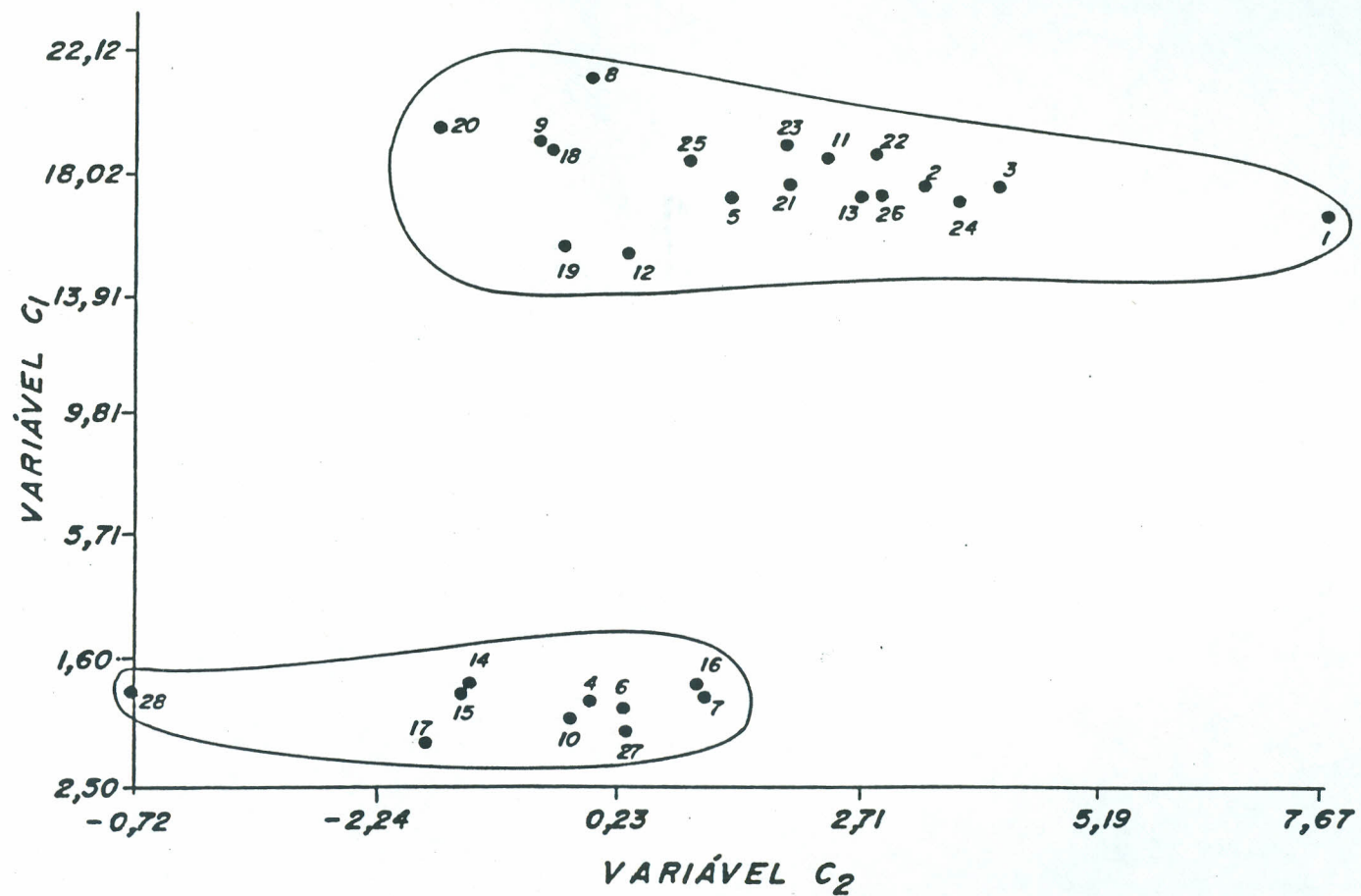


FIGURA 8 - Dispersão Gráfica dos Escores em Relação aos Eixos Representativos das Duas Primeira Variáveis Canônicas (VC1 e VC2), Avaliados em 28 Cultivares de Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). A Numeração das Amostras Está de Acordo com o Quadro 2.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Com o objetivo de avaliar a diversidade genética de 28 cultivares de feijão, empregou-se a técnica de RAPD. Essa metodologia possibilita a identificação de diferenças entre cultivares por meio da amplificação diferencial de fragmentos de DNA, o que permite estimar a distância genética entre eles.

Inicialmente foram feitas análises eletroforéticas das proteínas de reserva dos grãos de cada cultivar. Dez cultivares apresentaram faseolina do tipo "T" (35,71%) e os 18 restantes, do tipo "S" (64,29%). Os cultivares com sementes pequenas apresentaram faseolina do tipo "S", enquanto que cultivares com sementes médias ou grandes apresentaram faseolina do tipo "T".

Para a análise por RAPD, amostras de DNA dos cultivares foram amplificadas utilizando-se oligonucleotídeos decâmeros de sequência aleatória como iniciadores. Os produtos de amplificação foram separados eletroforicamente em gel de agarose, corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta. Foram testados, neste estudo, 45 iniciadores, tendo todos eles demonstrado

polimorfismo entre os cultivares analisados. Foram obtidos 276 produtos de amplificação, sendo 144 polimórficos e 132 monomórficos. O número de produtos de amplificação por iniciador variou entre 1 e 15, com tamanhos variando entre 230 e 4.070 pares de bases. Com base na presença e ausência dos produtos de amplificação nos 28 cultivares, foram determinadas as distâncias genéticas entre eles. Esses dados permitiram a construção de um dendrograma e também a dispersão gráfica dos cultivares no espaço bidimensional, por meio de análise multivariada. A menor distância obtida entre os cultivares foi de 1% e a maior, de 21%. As menores distâncias foram encontradas entre cultivares do mesmo centro de domesticação, mesoamericano ou andino, enquanto que as maiores ocorreram entre cultivares de diferentes centros de domesticação.

O dendrograma permitiu a separação dos cultivares em dois grandes grupos (A e B), que coincidem com os grupos estabelecidos pelo tipo de faseolina, tamanho de semente e centros primários de domesticação.

A análise multivariada também permitiu o estabelecimento de dois grandes grupos que coincidem com os obtidos pela análise de agrupamento. No entanto, a análise multivariada possibilitou uma melhor visualização das distâncias intra-grupos. Os dados aqui obtidos podem ser de grande utilidade em programas de melhoramento no que diz respeito à escolha adequada de progenitores.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- ABDELNOOR, R. V. **Uso de marcadores moleculares na avaliação da diversidade genética em cultivares de soja (*Glycine max* (L) Merrill)**. Viçosa, UFV, Impr. Univ., 1994. 53p. (Tese-M.S).
- BLISS, F. A. & BLOWN, J. W. S. Breeding common bean for improved quantity and quality of seed protein. **Plant Breeding Reviews**, 1: 59-102, 1983.
- BOLLINI, R. & CHRISPEELS, M. J. Characterization and subcellular localization of vicilin and phytohemagglutinin, the two major reserve protein of *Phaseolus vulgaris* L.. **Planta**, 142: 291- 8, 1978.
- BROWN, H. W. S.; MA, Y.; BLISS, F. A.; HALL, T. C. Genetic variation in the subunits of globulin-I storage protein of French bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 59: 83-92, 1981a.
- BROWN, H. W. S.; BLISS, F. A.; HALL, T. C. Linkage relationships between genes controlling seed protein in French bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 60: 251-259, 1981b.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICA-CIAT. **Programa de sistemas de producción de frijol**. Cali, Colombia, 1975a. 40 p.
- COBB, D. B. & CLARKSON, J. M. Detection of molecular variation in the insect pathogenic *Metahizium* using RAPD-PCR. **FEMS Microbiology Letters**, 112: 319- 24, 1993.

- COLÍN, S. M. Origen de *Phaseolus vulgaris* L. (Frijol comum). **Agrociencia**, 1(2): 99-109, 1967.
- CRUZ, C. D. **Aplicações de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**. Piracicaba, ESALQ/USP, 1990. 188p. (Tese- D.S.).
- CRUZ, C. D. & VIANA, J. M. S. A methodology of genetic divergence analysis based on sample unit projection on two-dimensional space. **Revista Brasileira de Genética**, 17:69-73, 1994.
- DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D. J.; BOULTER, D. Legumin and vicilin. storage proteins of legumes seeds. **Phytochemistry**, 15: 3-24, 1976.
- FALCONER, D. S. **Introduction to quantitative genetics**. 2.ed. London, Longman, 1981. 340p.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Production Yearbook**, 45: 100-1, 1991.
- GARDNER, C. O. & EBERHART, S. A. Analysis and interpretation of variety cross diallel and related populations. **Biometrics**, 22: 439-52, 1966.
- GEPTS, P. **Nutritional and evolutionary implications of phaseolin seed protein variability in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Madison, University of Wisconsin, 1984. 229p. (Tese-Ph.D).
- GEPTS, P. Phaseolin as an evolutionary markers In: GEPTS, P. (ed.) **Genetics resources, domestication and evolution of *Phaseolus* beans**. Kluwer, Dordrecht, 1988. p.215-41.
- GEPTS, P. & DEBOUCK, D. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: VAN SCHOONHOVEN, A. & VOYSET, O. (eds.) **Common Bean: Research for Crop Improvement**. Cali, CIAT, 1991. v.1 7:53
- GEPTS, P. & BLISS, F. A. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. **Economic Botany**, 40:469-78, 1986.
- GEPTS, P.; OSBORN, T. C.; RASHKA, K.; BLISS, F. A. Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*); evidence for multiple centers of domestication. **Economic Botany**, 40(4): 451-68, 1986.

- GRAJAL-MARTIN, M.J.; SIMON, C. J.; MUEHLBAUER, F. J. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize races 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp pisi. **Phytopathology**, **83**(6): 612-14, 1993.
- GRIFFING, B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. **Australian Journal of Biological Sciences**, **9**: 463-93, 1956.
- GURTHRIE, P. A.; MAGILL, C. W.; FREDERIKSEN, R. A.; ODUODY, G. N. Random amplified polymorphic DNA markers: A system for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, **82**(8): 832-5, 1992.
- HU, J. & QUIROS, C. F. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. **Plant Cell Report**, **10**: 505-11, 1991.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Anuário Estatístico do Brasil**. Rio de Janeiro, 1991. v. 51. 1024p.
- KEIM, P.; OLSON, T. C.; SHOEMAKER, R. C. A rapid protocol for isolating soybean DNA. **Soybean Genetetics Newsletter**, **15**: 150-2, 1988.
- KEIM, P.; DIERS, B. W.; OLSON, T. C.; SHOEMAKER, R. C. RFLP mapping in soybean: Association between marker loci and variation in quantitative traits. **Genetics**, **126**: 735-42, 1990.
- KOENIG, R. L.; SINGH, S. P.; GEPTS, P. Novel phaseolin types in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**. **44**:50-60, 1990.
- MA, Y. & BLISS, F. A. Seed protein of common bean. **Crop Science**, **18**: 431-7, 1978.
- MALUF, W. R. & FERREIRA, P. E. Análise multivariada da divergência genética em feijão-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.). **Horticultura Brasileira**, **1**: 31-4, 1983.
- MIRANDA, J. E. C.; CRUZ, C. D.; COSTA, C. P. Predição do comportamento de híbridos de pimentão (*Capsicum annuum* L.) pela divergência genética dos progenitores. **Revista Brasileira de Genética**, **11**(4): 929-37, 1988.
- NEI, M. & LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy Sciences of the Unitates States of America** , **76**: 5269-73, 1979.

- OSBORN, T. C. Genetic control of bean seed protein. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 7:93-115, 1988.
- PEREIRA, P. A. A. & SOUZA, C. R. B. Tipos de faseolina em raças "crioulas" de feijão no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 27(8): 1219-21, 1992.
- RAMALHO, M. A. P. & FERREIRA, M. M. Comportamento de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em relação ao florescimento e vingamento das vagens. **Ciência e Prática**, 3(1): 80-3, 1979.
- RAO, A. V. **Advanced statistical methods in biometrical research**. New York, John Wiley & Sons, 1952. 390p.
- SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, J. G. K.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N.. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, 230: 1350-54, 1985.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T.. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v.3
- SCARBIEIRI, V. C. Composição e valor nutritivo do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) In: BULISANI, E. A. **Feijão: fatores de produção e qualidade**. Campinas, Fundação Cargill, 1987. p. 257-326.
- SINGH, S. P. & GUTIÉRREZ, J. A. Geographical distribution of the DL1 and DL2 genes causing hybrid dwarfism in *Phaseolus vulgaris* L., their association and with seed size, and their significance to breeding. **Euphytica**, 33:337-45, 1984.
- SINGH, S. P; GEPTS, P.; DEBOUCK, D. G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, 45: 379- 96, 1991.
- SLIGHTOM, J. L.; SUN, S. N.; HALL, T. C.. Complete nucleotide sequence of a French bean storage protein gene: phaseolin. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, 80: 1897, 1983.
- SKROCH, P.; TIVANG, J.; NIENHUIS, J. Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. In: SYMPOSIUM [OF THE] APPLICATIONS OF RAPD TECHNOLOGY TO PLANT BREEDING, Minneapolis, 1992. **Proceedings...** Minneapolis, CSSA, ASHS, AGA, 1992. p. 26-30 (Joint Plant Breeding Symposia Series).

- SUN, S. N.; MUTSCHLER, M. A.; BLISS, F. A.; HALL, T. C.. Protein synthesis and accumulation in bean cotyledons during growth. **Plant Physiology**, **61**: 918-23, 1979.
- 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**, **198**: 42-56, 1984.
- TANKSLEY, S. D.; YOUNG, N. D.; PATERSON, A. H.; BONIERBALE, M. W. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Bio/technology**. **7**: 257-64, 1989.
- TINGEY, S. V.; RAFALSKI, J. A.; WILLIAMS, G. K.. Soybean genome analysis: DNA polymorphisms are identified by oligonucleotide primer of arbitrary sequence. In: HERMANN, R. G. & LARKINS, B. A. eds. **Plant Molecular Biology 2**. New York, Plenum Press, 1991. p. 263-8.
- TROVO, L. H. Mercado está em alta e preço vai superar média de 1993. Folha de São Paulo. São Paulo, 31 de março de 1994. Caderno Especial, Guia de Safra 94 p.A-14.
- VIEIRA, C. **O feijoeiro comum**: cultura, doenças e melhoramento. Viçosa, UREMG, Imprensa Universitária, 1967. 220p.
- VIEIRA, C. **Cultura do feijão**. Viçosa, UFV, Imprensa Universitária, 1978. 146p.
- WELSH, J. & McCLELLAND, M.. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, **18**(24) : 7213-8, 1990.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V.. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, **18**(22) : 6531-5, 1990.