

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ENÉAS RICARDO KONZEN

Análise morfológica, bioquímica e genética do brilho do tegumento em variedades de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)

Piracicaba

2011

ENÉAS RICARDO KONZEN

Análise morfológica, bioquímica e genética do brilho do tegumento em variedades de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Siu Mui Tsai

Piracicaba

2011

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Konzen, Enéas Ricardo

Análise morfológica, bioquímica e genética do brilho do tegumento em variedades de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) / Enéas Ricardo Konzen; orientadora Siu Mui Tsai. - - Piracicaba, 2011.

136 p.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Componentes principais 2. Controle genético 3. Fenótipos
4. Flavonóides 5. Marcador molecular 6. Melhoramento genético vegetal
7. Microscopia eletrônica de varredura 8. Reação em cadeia por polimerase
I. Título

CDU 633.35:575.21/22

Dedico o presente trabalho aos meus pais, João e Elaine, e também a minha querida e estimada avó Erica, que me educaram com todo amor e carinho e forneceram subsídios imensuráveis a minha formação moral, pessoal e profissional.

Também dedico a todas as pessoas que fazem parte de minha vida e me fazem crescer cada vez mais.

Vocês são os pilares que sustentam minha jornada.

"O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece."

Benjamin Disraeli

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver..."

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Siu Mui Tsai pela orientação, profissionalismo e especialmente por seu caráter íntegro, sua grande amizade e humildade e por todas as oportunidades concedidas para minha formação.

Ao CENA/USP e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da unidade, pelas oportunidades concedidas durante este mestrado.

À CAPES pela concessão de bolsa nos primeiros dois meses e ao CNPq pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa de mestrado no período posterior.

À Dra. Danielle Caldas pelo apoio, orientação, amizade e pelas dicas durante o trabalho.

À Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli e à Mônica Lanzoni pelas análises de microscopia.

Ao laboratório NAP/MEPA e ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima, por oportunizar e colaborar nas análises de microscopia de sementes.

Ao Prof. Dr. Luiz Adibe Abdalla e à Regina Peçanha pelas análises de fenois e taninos, no Laboratório de Nutrição Animal do CENA.

Ao Laboratório de Fisiologia Vegetal Pós-Colheita, sob responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo Kluge, por oportunizar as análises do colorímetro.

Ao Prof. Dr. Mark J. Bassett (University of Florida, Gainesville) e à Dra. Molly Welsh (USDA) por terem cedido os genótipos de referência para os genes estudados no trabalho.

Ao Prof. Dr. Paul Gepts (University of California, EUA) e à Profa. Dra. Kirstin Bett (University of Saskatchewan, Canadá) pelas dicas e sugestões para a conclusão deste trabalho.

A todos os professores do CENA e da ESALQ, que passaram ensinamentos valiosos em suas disciplinas.

Aos técnicos do laboratório de Biologia Celular e Molecular: Fábio, Elias, Wagner e Chiquinho, pelo apoio inestimável nos trabalhos de laboratório e campo.

À fabulosa e descontraída Ludmila, por sempre sorrir e fazer sorrir, mostrando como é possível viver com muita adrenalina e emoção.

À secretaria da pós-graduação do CENA - Sônia, Neuda, Cláudia e Fábio. Também à Marília, da seção de biblioteca, por toda orientação e presteza.

Aos meus pais por todo o amor, carinho, paciência e, sobretudo, por todos os ensinamentos valiosos que guiaram minha formação.

A minha avó Erica pelo carinho e apoio, pelas valiosas conversas e por seu estilo particular de mostrar como algumas coisas na vida podem ser encaradas.

Aos colegas do laboratório Acacio, Aline, Amanda, Beatriz, Caio, Clóvis, Fabiana, Janne, Lina, Lucas, Marcela, Maria Júlia, Mariana Germano, Mariana Redondo, Milena, Rafael e outros que fizeram parte dessa história.

Em especial, aos colegas e amigos Ana Beraldo e Gustavo, cúmplices deste trabalho e de minha trajetória neste período, e que sempre me apoiaram incondicionalmente. Também à Raquel Perón, colega e amiga, por todo o apoio nas atividades de laboratório, dia e noite e inclusive nos finais de semana.

Aos grandes amigos Wellington, Ezio, Nuñes e Dennis, colegas de república e verdadeiros irmãos, que mostraram outros modos de encarar as situações da vida, de maneira divertida e espontânea, sempre procurando um jeito de dar muitas gargalhadas.

Aos amigos Ivan e Graciele, pela acolhida e apoio nos momentos que precisei. Também aos amigos Viviane, Micheline, Gilvano, Carol e Evelise.

A Deus pela dádiva de viver e por ser meu guia e me reerguer nos momentos de fraqueza.

RESUMO

KONZEN, E. R. **Análise morfológica, bioquímica e genética do brilho do tegumento em variedades de feijoeiro** (*Phaseolus vulgaris* L.). 2011. 136 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

Diversas características interferem na aceitabilidade de variedades de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no mercado consumidor, como o brilho do tegumento. Geralmente, o feijão com brilho é rejeitado para consumo, pois apresenta difícil cozimento. No entanto, o brilho pode conferir resistência ao ataque de insetos e patógenos à semente, podendo constituir uma vantagem para o melhoramento do feijão. A presença de brilho é devida à expressão do gene *Asp* (*Asper*) na forma alélica dominante. Genótipos *aspasp*, portanto, apresentam tegumento opaco. Outro gene, *J* (*Joker*), interfere na expressão da característica, de modo que o alelo recessivo *j* diminui a intensidade do brilho e altera a coloração do tegumento. *J* é considerado o precursor de polifenóis denominados pró-antocianidinas. Na presença *j* estes compostos não são sintetizados. No presente trabalho foram genotipadas variedades de feijoeiro crioulas [Serro Azul Brilhante (SAB - tegumento brilhante) e Fosco (SAF - tegumento opaco) e Puebla-152 (P-152 - brilhante)] e a cultivar Diamante Negro (DN - opaco), contrastantes para o brilho do tegumento. Análises fenotípicas, morfológicas e bioquímicas permitiram inferir os genótipos das variedades e avaliar a segregação do brilho em populações derivadas de cruzamentos entre contrastantes: SAF x SAB e P-152 x DN. Os resultados mostraram que as variedades não variam para *J*, apenas para *Asp*, sendo que SAB e P-152 carregam *Asp* e SAF e DN o alelo *asp*. Em todos os cruzamentos a segregação foi de três brilhantes (*Asp*) para um opaco (*asp*) na geração F₂ e de cinco brilhantes para três opacos em F₃. A partir dos resultados, as variedades foram contrastadas por meio de marcadores de AFLP, analisando-se a similaridade genética e identificando-se bandas diferenciadoras entre as mesmas. A partir disso, foi empregada a metodologia de *Bulk Segregant Analysis* na população F₂ de P-152 x DN, para encontrar marcadores AFLP candidatos ao mapeamento do brilho. Foram encontrados marcadores associados que, no entanto, revelaram serem falsos positivos. Análises utilizando marcadores microsatélites ou análises bioinformáticas de sintenia com a soja poderiam ser realizadas, visando detectar marcadores precisamente ligados à característica.

Palavras-chave: Brilho do tegumento. Pró-antocianidinas. AFLP. Segregação.

ABSTRACT

KONZEN, E. R. **Morphological, biochemical and genetic analysis of seed coat shininess in common bean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2011. 136 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Several characteristics interfere in acceptability of common bean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.) by consumers, like seed coat shininess. Generally, varieties with shiny seed coat are rejected by consumers due to their difficult cooking. However, shininess could confer resistance to insects attack and also pathogens to the seed, giving an advantage for this trait in common bean breeding. The presence of shininess is due the expression of the *Asp* (*Asper*) gene in the dominant allelic form. Other gene, *J* (*Joker*), interferes on the expression of this characteristic, with *j* conditioning a less shiny seed coat and changing seed coat color. *J* is considered the precursor of a class of polyphenols called pro-anthocyanidins. In the presence of *j* these compounds are not synthesized. In the present work we genotyped common bean landraces [Shiny Serro Azul (SAB – shiny seed coat) and Dull Serro Azul (SAF – dull seed coat) and Puebla-152 (P-152 – shiny)] and the cultivar Diamante Negro (DN – dull), contrasting for seed coat shininess. Phenotypic, morphological and biochemical analyses allowed to genotype all varieties and evaluate the segregation of shininess in populations derived from crosses between contrasting genotypes: SAF x SAB and P-152 x DN. Results showed that varieties do not vary for *J*, only for *Asp*. SAB and P-152 carry *Asp* and SAF and DN carry *asp*. In all crosses segregation was of three shiny (*Asp*) for one opaque (*asp*) in F₂ and of five shiny for three dull in F₃. Based on the results, all varieties were contrasted by AFLP markers, analyzing genetic similarity and identifying differential bands among all of them. Further it was used the Bulk Segregant Analysis method in population F₂ of the cross P-152 x DN, aiming to find candidate AFLP markers for shininess mapping. We found markers associated but they revealed to be false positives. Further analyses using microsatellite markers or synteny comparisons with soybean genome could be done, aiming to find specific markers linked to this trait.

Key-words: Seed coat shininess. Pro-anthocyanidins. AFLP. Segregation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Diversidade genética do feijoeiro	19
2.2 Panorama econômico atual do feijoeiro no Brasil.....	20
2.3 Características do tegumento do feijoeiro	22
2.4 Característica do brilho do tegumento no feijoeiro	24
2.5 Genética do tegumento do feijoeiro e genes relacionados ao brilho	27
2.6 Genes <i>Joker</i> e <i>Asper</i>	30
2.6.1 Loco <i>Joker</i>	30
2.6.2 Loco <i>Asper</i>	33
2.7 Flavonoides, antocianinas e pró-antocianidinas	34
2.7.1 Flavonoides.....	34
2.7.2 Antocianinas	36
2.7.3 Pró-antocianidinas	37
2.8 Técnicas para estudar o brilho do tegumento	38
2.8.1 Análises de cores e de luminosidade (L*) pelo sistema de cores L*a*b*	38
2.8.2 Microscopia eletrônica de varredura	40
2.8.3 Determinações de fenois totais, taninos totais e taninos condensados	41
2.8.4 Análise de similaridade genética e mapeamento molecular AFLP	42
REFERÊNCIAS	44
3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, BIOQUÍMICA E MORFOLÓGICA DE VARIEDADES DE FEJJOEIRO (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) CONTRASTANTES PARA BRILHO DO TEGUMENTO.....	53
RESUMO	53
ABSTRACT	54
3.1 Introdução.....	55
3.2 Material e métodos	58
3.2.1 Variedades analisadas.....	58
3.2.2 Multiplicação dos cruzamentos	59
3.2.3 Análise genotípica das variedades para os genes <i>Asper</i> e <i>Joker</i>	60
3.2.4 Análise visual da intensidade de brilho do tegumento	61

3.2.5 Método espectrofotométrico (colorímetro) para análise do brilho do tegumento	62
3.2.6 Análise de tegumentos por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	63
3.2.7 Descritores do tamanho das sementes e absorção de água	64
3.2.8 Caracterização de compostos fenólicos dos tegumentos das variedades	64
3.2.8.1 Extração de tegumentos e compostos fenólicos	65
3.2.8.2 Extração de compostos fenólicos	65
3.2.8.3 Determinação de fenois totais e taninos totais	66
3.2.8.4 Determinação de taninos condensados	67
3.2.8.5 Teste histoquímico para taninos condensados	67
3.2.9 Análises estatísticas	68
3.3 Resultados	69
3.3.1 Genotipagem das variedades	69
3.3.2 Análise visual e quantitativa do brilho do tegumento	69
3.3.3 Análise da superfície do tegumento	76
3.3.4 Comprimento do parênquima paliçádico	78
3.3.5 Parâmetros qualitativos e absorção de água das variedades	79
3.3.6 Determinações de compostos fenólicos	81
3.4 Discussão	83
3.4.1 Análise do brilho	83
3.4.2 Genotipagem dos parentais	87
3.4.3 Análises de microscopia eletrônica de varredura	87
3.4.4 Absorção de água	89
3.4.5 Fenois totais, taninos totais e taninos condensados	91
3.4.6 Implicações dos resultados	93
3.5 Conclusões	95
REFERÊNCIAS	97
4. ANÁLISE GENÉTICA E DETECÇÃO DE MARCADORES AFLP ASSOCIADOS AO BRILHO DO TEGUMENTO EM FEIJOEIRO (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	101
RESUMO	101
ABSTRACT	102
4.1 Introdução	103
4.2 Material e métodos	105
4.2.1 Variedades analisadas	105
4.2.2 Análise da segregação do brilho do tegumento	105

4.2.3 Análise de similaridade genética entre as variedades.....	107
4.2.4 Detecção de bandas diferenciadoras entre as variedades	107
4.2.5 População de mapeamento e <i>Bulk Segregant Analysis</i> (BSA).....	108
4.2.6 Extração de DNA e técnica de AFLP	108
4.2.7 Análises estatísticas	111
4.3 Resultados.....	112
4.3.1 Análises de segregação.....	112
4.3.2 Similaridade genética entre as variedades	113
4.3.3 Análise molecular das progênies F2:3 para validação das classes fenotípicas.....	114
4.3.4 Detecção de bandas únicas	116
4.3.5 Marcadores AFLP associados ao brilho	117
4.4 Discussão	118
4.5 Conclusões.....	121
REFERÊNCIAS	123
ANEXOS	125

1 INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus* spp.) constitui um dos grãos de maior importância para o consumo humano em escala global. Os grãos constituem fonte de proteínas, vitaminas e minerais que apresentam papel essencial na nutrição. A produção de feijão na América Latina é uma das mais elevadas mundialmente (BROUGHTON et al., 2003). No Brasil, destaca-se o feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), sendo cultivado em vários estados. Além disso, o país é considerado o maior consumidor mundial. A preferência do consumidor é regionalizada e difere principalmente quanto à cor e ao tipo de grão (EMBRAPA, 2010).

A colheita de grãos de feijão de alta qualidade depende de cuidados que vão desde a pré-produção até a comercialização. As condições de armazenamento dos grãos são críticas para sua posterior distribuição no mercado. Um dos aspectos essenciais para a venda do produto é a manutenção da cor específica de cultivares de feijoeiro (BUSHEY; OWENS; HOSFIELD, 2001; BASSETT, 2007), o que mobiliza grandes esforços dos melhoristas e tecnólogos de sementes.

Além da cor, o brilho do tegumento é uma característica avaliada na seleção e no lançamento de cultivares. A presença de brilho no tegumento afeta sua aceitação no mercado. No Brasil, geralmente, cultivares com tegumento brilhante são pouco aceitas para consumo. A justificativa é de que o cozimento de sementes brilhantes é mais lento e também irregular, aspectos indesejáveis para o consumidor. Dessa maneira, os programas de melhoramento genético do feijoeiro no Brasil priorizam variedades e linhagens com tegumento opaco.

Outro motivo para a rejeição de sementes brilhantes é a presença de fatores antinutricionais, que reduzem a digestibilidade e absorção de nutrientes pelo organismo humano (LEAKEY, 1988). Entre as substâncias associadas a isso estão as pró-antocianidinas, ou taninos condensados, polifenóis sintetizados ao longo da via metabólica dos flavonoides. Sementes brilhantes podem conter essas substâncias no tegumento (LEAKEY, 1988).

Apesar disso, a preferência por sementes de tegumento opaco não pode ser generalizada. Alguns produtores rurais valorizam sementes de tegumento brilhante porque observam que estas apresentam maior resistência ao ataque de insetos. Além disso, a presença

de brilho no tegumento pode também contribuir para diminuir a incidência de doenças. Os compostos fenólicos presentes no tegumento podem constituir uma barreira física natural à penetração de agentes patogênicos (ISLAM et al., 2003). Compostos associados ao brilho do tegumento possivelmente aumentam essa proteção.

Sob o enfoque nutricional, embora sementes brilhantes possam apresentar substâncias antidigestivas, estudos têm mostrado que os compostos fenólicos presentes no tegumento constituem também importantes fatores antioxidantes e anticarcinogênicos (BENINGER; HOSFIELD, 1999; 2003).

Desse modo, o brilho do tegumento pode apresentar importantes implicações para a produção, o armazenamento e o consumo do feijoeiro. Além disso, sob o ponto de vista estético, sementes brilhantes são mais atraentes, o que poderia ser refletido no seu valor comercial.

Até hoje foram descritos dois genes associados ao brilho no tegumento: Joker (*J*) (LAMPRECHT, 1932; 1940) e Asper (*Asp*) (LAMPRECHT, 1940). Bassett (1996) delimitou as características condicionadas pelos genes. *J* afeta o brilho do tegumento, no entanto, também altera a coloração. Na forma recessiva (*jj*) o tegumento apresenta brilho reduzido e coloração típica de sementes imaturas. No entanto, o gene determinante para presença do brilho é *Asp*. Genótipos *AspAsp* apresentam tegumento brilhante, enquanto os recessivos (*aspasp*), tegumento opaco. Os alelos de *J* indicam apenas alterar a intensidade do brilho (BASSETT, 1996). *J* é considerado o precursor das pró-antocianidinas (LEAKEY, 1988).

Dada a complexidade genética e bioquímica do brilho do tegumento e considerando os benefícios potenciais dessa característica, torna-se importante o seu estudo. No Brasil, são extremamente escassos os trabalhos que se dirigiram à análise do brilho, avaliando variedades de importância nacional ou local. Desse modo, no presente estudo, foram analisadas variedades de feijoeiro e populações derivadas de cruzamentos entre parentais contrastantes para brilho do tegumento, sob os enfoques fenotípico, morfológico, bioquímico e genético.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- estudar o controle genético do brilho do tegumento em cada uma das variedades, genotipando-as para os genes *J* e *Asp*;
- diferenciar quantitativamente a intensidade do brilho do sementes de feijão, utilizando um método espectrofotométrico – medidas obtidas através de um colorímetro;
- caracterizar qualitativa e quantitativamente diferenças morfológicas da superfície do tegumento e do parênquima paliádico entre as variedades contrastantes através de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- avaliar a absorção diferencial de água entre sementes brilhantes e opacas;
- determinar compostos fenólicos nas variedades, enfocando taninos condensados, utilizando métodos analíticos (butanol-HCl) e microscopia ótica (teste histoquímico com Vanilina-HCl), verificando se o método viabiliza diferenciar os genótipos contrastantes para o brilho;
- analisar a segregação do brilho do tegumento em populações derivadas dos cruzamentos P-152 x DN e SAB x SAF, com os parentais contrastantes para a característica;
- identificar marcadores AFLP candidatos para o mapeamento do brilho do tegumento.

O trabalho baseou-se na hipótese de que *Asp* controla o brilho do tegumento nestas variedades, sendo que as variedades de tegumento brilhante apresentam genótipo *Asp Asp* e as de tegumento opaco, genótipo *asp asp*. Desse modo, *J* estaria presente na forma dominante em todas as variedades, contribuindo para realçar a intensidade do brilho e não segregando nas populações analisadas. Por isso, todas as variedades provavelmente produzem pró-antocianidinas.

Considerando a abordagem do trabalho, as análises realizadas visaram apenas caracterizar as variedades sob todos os aspectos considerados. Análises em escalas temporal (diferentes épocas) ou espacial (ambientes diversos), requeridas para fins de melhoramento genético, não foram o foco do presente estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diversidade genética do feijoeiro

O feijoeiro (*Phaseolus spp.*) é uma das culturas mais antigas da América. Juntamente com o milho e a mandioca, constitui um alimento básico das populações que habitam as baixas e médias latitudes do continente há milênios. As espécies de feijoeiro apresentam características bem divergentes no que concerne a formas de cultivo, usos e aplicações, amplitude ambiental em que se adaptaram e variabilidade morfológica (BROUGHTON et al., 2003).

O feijoeiro é integrante da família Fabaceae (Leguminosae, Papilionoidae) e gênero *Phaseolus*. Cerca de 55 espécies de *Phaseolus* são descritas, mas apenas cinco são cultivadas: *P. vulgaris*, *P. acutifolius*, *P. lunatus*, *P. coccineus* e *P. polyanthus* (VIEIRA et al., 2005).

P. vulgaris é uma espécie diploide com $2n = 22$. A espécie é autógama, no entanto, tem sido observada uma taxa de fecundação cruzada natural (no geral até cerca de 4%), que pode trazer consequências para os trabalhos de melhoramento e para a manutenção da pureza das cultivares (VIEIRA et al., 2005).

Naturalmente, a espécie apresenta elevada amplitude de distribuição geográfica, ocorrendo desde o norte do México até o Nordeste da Argentina. No Brasil, *P. vulgaris* foi introduzida, segundo evidências arqueológicas e genéticas, a partir do norte da América do Sul ou da América Central, com pouca influência da Região dos Andes Centrais e Meridionais (FREITAS, 2006).

Elevada diversidade morfológica e isoenzimática foi encontrada entre populações selvagens de *P. vulgaris* dos dois extremos de sua distribuição geográfica (KOENIG; GEPTS, 1989; SINGH; GEPTS; DEBOUCK, 1991). Isso reflete nas diversas formas de folhas, hábitos de crescimento, cores de flores e, principalmente, uma grande variabilidade de cores, formas e tamanhos de sementes de feijoeiro.

Além das técnicas convencionais, recentes trabalhos com marcadores moleculares confirmaram a alta diversidade genética desta espécie, dentre eles: RAPD (FRANCO et al., 2001; CARVALHO et al., 2008), microssatélites (BLAIR et al., 2006; BENCHIMOL et al., 2007; BURLE et al., 2010), AFLP (MACIEL et al., 2003) e ISSR (GONZÁLEZ et al., 2005).

As diversas análises de diversidade do feijoeiro mostraram a existência de dois grandes centros de domesticação: Mesoamericano e Andino, sendo subdivididos em seis raças (SINGH; GEPTS; DEBOUCK, 1991). O grupo Mesoamericano se estende desde o México e demais países da América Central até a Colômbia e Venezuela. Os representantes do *pool* Andino são encontrados no Peru, Chile, Bolívia e Argentina (SINGH; GEPTS; DEBOUCK, 1991). Aparentemente, os dois *pools* indicam convergir na Colômbia (GEPTS; BLISS, 1986). Os recentes trabalhos envolvendo marcadores moleculares mostraram resultados semelhantes, com maior detalhamento.

2.2 Panorama econômico atual do feijoeiro no Brasil

Atualmente, o feijão é um dos mais importantes alimentos da dieta do brasileiro, pois é uma excelente fonte de proteínas. O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão. O consumo médio *per capita* no país, embora em declínio, é de 12,7 kg/ano (EMBRAPA, 2010). Na Figura 2.1 é apresentando o consumo *per capita* de feijão e arroz, produto frequentemente associado ao consumo, entre 1981 e 2010. O gráfico mostra as oscilações e o recente declínio do consumo do feijão.

Além da sua importância na dieta, é um dos produtos agrícolas de maior importância econômico-social. A partir da década de 1980, o cultivo do feijoeiro deixou de ser somente uma cultura de subsistência, entrando em uma fase de maior tecnificação (VIEIRA et al., 2005) que, no entanto, não evoluiu significativamente.

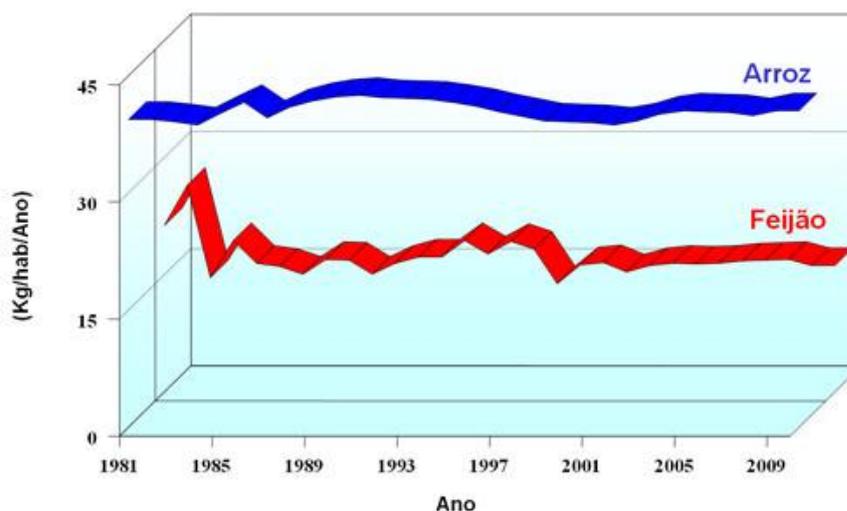


Figura 2.1 - Consumo *per capita* de arroz e feijão no Brasil (1981-2010). Fonte: Embrapa (2010)

A produção de feijoeiro na Safra 2009/2010 foi estimada em aproximadamente 3,27 milhões de toneladas, em uma área de 3,6 milhões de hectares. A produtividade média estimada no período foi de 913 kg.ha^{-1} (CONAB, 2010), valor considerado reduzido, muito aquém do potencial produtivo da cultura.

A reduzida produtividade média do feijoeiro no Brasil pode ser associada a problemas como ataques de pragas, doenças, estresse hídrico e outros, decorrentes das condições tecnológicas de cultivo. Atualmente, o feijoeiro ainda é cultivado em sistemas de subsistência, embora seja também produzido em locais com maiores condições tecnológicas (irrigação, mecanização) (BORÉM; CARNEIRO, 2006; EMBRAPA, 2010). Dados da estrutura produtiva da safra 2002/2003 mostraram que 75% das lavouras nacionais de feijão apresentavam área inferior a 10 ha. Contrariamente, apenas 2% da área cultivada de feijão correspondiam a lavouras com mais de 500 ha, situação pouco modificada até os dias atuais. Isso mostra que a produção de feijoeiro está concentrada em atividades de pequenos e médios produtores rurais, os quais não apresentam condições para grandes investimentos tecnológicos em suas áreas de produção.

Desse modo, os programas de melhoramento genético do feijoeiro do Brasil apresentam grandes desafios para aumentar a produção. Além disso, é fundamental manter as propriedades e características das cultivares lançadas. A principal característica observada pelo consumidor é a coloração do tegumento da semente. Bassett (2007) descreve que a manutenção da coloração e de sua uniformidade são necessários para o produto ser bem aceito no mercado.

A presença de brilho no tegumento é outra característica bastante considerada pelo consumidor no momento da compra e, por isso, também pelos melhoristas, pois interfere nas propriedades culinárias (cocção) do feijão.

2.3 Características do tegumento do feijoeiro

O tegumento é a estrutura de proteção externa das sementes. Entre suas diversas funções estão: preservação da integridade das partes das sementes, proteção do embrião contra injúrias mecânicas e do ataque de pragas e patógenos, regulação das trocas gasosas entre o embrião e o ambiente externo e, em muitas espécies, participação no processo de dispersão de sementes (SOUZA; MARCOS-FILHO, 2001).

A formação do tegumento dá-se a partir da diferenciação do integumento do óvulo que circunda o saco embrionário. Portanto, os genes expressos no tegumento apresentam herança materna (SCHUURMANS et al., 2003). Na maturidade, o tegumento é composto principalmente por células mortas. Mesmo assim, essas células desempenham importantes papéis na proteção e germinação das sementes (HAUGHN; CHAUDHRY, 2005).

O tegumento da semente de *P. vulgaris* é basicamente composto por uma fina cutícula que reveste uma camada de células alongadas de parênquima paliçádico ou epiderme. Logo abaixo, encontra-se uma camada de células em forma de ampulheta (*hourglass cells* ou osteoesclereídeos), a hipoderme. Estas células apresentam paredes celulares com espessura irregular. A espessura é menor nas extremidades e bem maior na parte central, constituindo uma camada bem resistente e com considerável espaço intercelular (THORNE, 1981; LEAKEY, 1988). Esta camada de células reflete luz e pode contribuir para aumentar a intensidade do brilho do tegumento, dependendo dos compostos químicos constituintes. Abaixo desta, encontram-se distribuídas várias camadas de células de tecido parenquimático, que acumulam compostos fenólicos (LEAKEY, 1988). Esse tecido é o parênquima lacunoso, composto por grandes células alongadas tangencialmente, na parte externa, e células menores e muito ramificadas na interna (ESAU, 1974). Na Figura 2.2 é mostrado o perfil transversal do tegumento de *P. vulgaris* e as camadas de células constituintes.

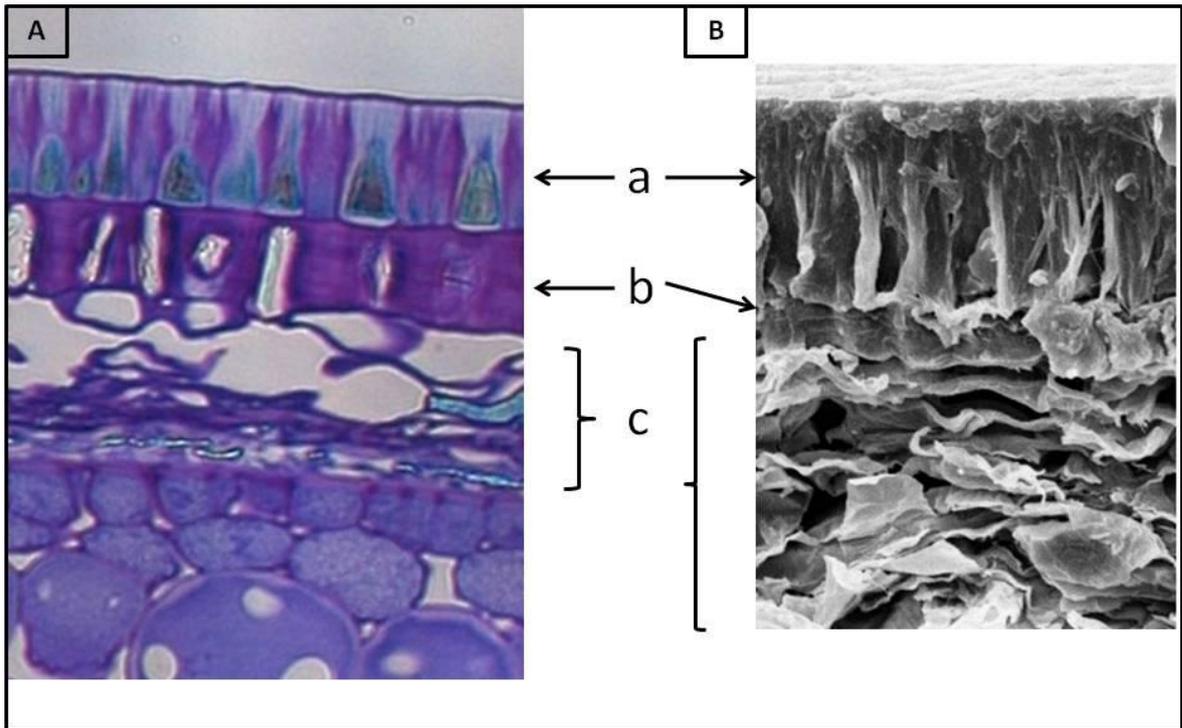


Figura 2.2 – (A) Perfil transversal do tegumento de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), analisado por Microscopia de Luz: a) Parênquima paliçádico; b) Camada de células da hipoderme (*hourglass layer*); c) Tecido parenquimático. (B) Perfil transversal do tegumento da linhagem 5-593, analisado por microscopia eletrônica de varredura

A epiderme paliçádica despertou muita atenção pela sua estrutura e por em certas leguminosas ser associada a alto grau de impermeabilidade. Isso afeta a capacidade de germinação, podendo retardá-la. Nesse sentido, a ocorrência de camadas cuticulares reveste-se de interesse. Essas camadas originam-se nas cutículas do óvulo. O óvulo jovem é inteiramente revestido por uma cutícula (ESAU, 1974). No feijão, alguns trabalhos relataram a importância da cutícula na impermeabilidade e na organização estrutural da superfície do tegumento (BUSHEY; HOSFIELD; BENINGER, 2000; BUSHEY; OWENS; HOSFIELD, 2001; 2002).

2.4 Característica do brilho do tegumento em feijoeiro

A elevada diversidade genética do feijoeiro reflete-se nas diversas formas, tamanhos, cores e intensidades de brilho do tegumento das sementes da cultura. O brilho do tegumento de *P. vulgaris* é uma característica incluída na caracterização de uma cultivar. O CIAT (1976) apresentou a classificação das sementes quanto ao brilho do tegumento, podendo ser brilhante, intermediário ou opaco. A análise visual de sementes permite facilmente distinguir brilhantes de opacas, no entanto, entre sementes brilhantes e intermediárias há maior dificuldade de delimitação. Essa classificação depende da variedade, da cor do tegumento, da interação entre genótipo e ambiente, o que influencia a intensidade com que o brilho aparece.

O aspecto brilhante do tegumento de feijão pode ser devido à presença de compostos fenólicos dos grupos das antocianinas e pró-antocianidinas. Leakey (1988) sugere que são acumuladas pró-antocianidinas na camada de parênquima lacunoso da semente e esta reflete luz através da hipoderme do tegumento.

A presença de brilho no tegumento apresenta vantagens para a semente. O tegumento é a estrutura de proteção da semente e a presença de substâncias que conferem brilho indicam reforçar essa proteção. Embora não completamente esclarecido, é provável que o brilho do tegumento seja um dos principais fatores que dificultam a absorção de água pela semente de feijão (BUSHEY; HOSFIELD; BENINGER, 2000), que poderia ser explicado pela organização estrutural da cutícula (BUSHEY; OWENS; HOSFIELD, 2001; 2002).

A dificuldade de absorver água pode também limitar a capacidade de penetração de patógenos na semente, aumentando a resistência a doenças. Pró-antocianidinas do tipo pró-delfinidinas podem conferir maior resistência contra o fungo *Mycosphaerella pinodes* (LEAKEY, 1988). Estudo mais recente também mostrou associação, embora não muito clara, entre polifenóis (incluindo taninos condensados) do tegumento de feijão e aumento na resistência a doenças (ISLAM, 2003). Taninos condensados também podem atuar na proteção contra infecções fúngicas em folhas, como sugerido por Winkel-Shirley (2001) e Kantar et al. (1996). A elucidação dessa associação, no entanto, ainda carece de resultados mais precisos.

No Brasil e outros países, vários pequenos produtores cultivam diversas variedades crioulas de feijoeiro que apresentam sementes com tegumento brilhante. Sementes brilhantes indicam apresentar maior resistência ao ataque de insetos, como carunchos (Bruchidae). Contrariamente, em sementes de tegumento opaco, a incidência de ataque desses insetos é mais elevada. Desse modo, o período de armazenamento de sementes com tegumento brilhante pode ser mais prolongado do que o de sementes opacas.

Esses aspectos mostram a importância do brilho na proteção da semente. Por isso, essa característica poderia ser valorizada por programas de melhoramento genético do feijoeiro. No entanto, algumas propriedades relacionadas ao brilho levam a sua rejeição pelo consumidor e, portanto, os melhoristas geralmente não selecionam sementes com tegumento brilhante em seus trabalhos.

Primeiramente, grãos com tegumento brilhante apresentam tempo de cozimento mais elevado. Isso pode ser atribuído a maior impermeabilidade e dificuldade de embebição das sementes brilhantes (BUSHEY; HOSFIELD; BENINGER, 2000).

O cozimento do feijão tem sido associado a dois fenômenos principais: *hard to cook* e *hard shell*. Por esse último fenômeno, os grãos não apresentam amolecimento suficiente devido a uma falha na embebição durante o cozimento. Os dois fenômenos têm sido associados à presença de taninos condensados no tegumento (STANLEY, 1992). Sementes brilhantes, por provavelmente apresentarem taninos condensados, sofrem gradativo endurecimento durante seu armazenamento, devido à oxidação destes compostos (LEAKEY, 1988).

Outra desvantagem conferida ao brilho é o escurecimento do tegumento (LEAKEY, 1988). Sementes com tegumento brilhante tendem a passar por processo mais acelerado de escurecimento do que sementes opacas, aspecto indesejável para o melhorista, dada a necessidade de manter as características da cor de cada variedade comercial de feijão. No entanto, em classes comerciais de feijão como cranberry, pinto e carioca, há cultivares passíveis de rápido escurecimento (BETT; ELSADR, 2010), incluindo algumas de tegumento opaco. Estudos mais recentes indicam que genes provavelmente não ligados ao brilho podem estar associados à característica do escurecimento (JUNK-KNIEVELL; VANDENBERG; BETT, 2008; BETT; ELSADR, 2010). Isso sugere cautela ao associar esse fenômeno com o brilho.

A presença de pró-antocianidinas em sementes brilhantes tem sido apontada também como problema para a nutrição humana. Alguns trabalhos sugeriram que taninos condensados dificultam a absorção de nutrientes pelo organismo humano. Portanto, pró-antocianidinas apresentam propriedades antidigestivas (BARAHONA et al., 1997; LI et al., 1996; TERRILL et al., 1992). No entanto, estudos mais recentes reportaram propriedades antioxidantes e anticarcinogênicas de taninos condensados em feijoeiro (BENINGER; HOSFIELD, 1999), sugerindo a necessidade de rever a importância dessas substâncias para a saúde humana.

Além disso, estudos têm mostrado que nem sempre sementes brilhantes apresentam pró-antocianidinas (BENINGER; HOSFIELD; NAIR, 1998). Outros compostos fenólicos como as antocianinas podem estar relacionadas à expressão do brilho (BENINGER et al., 2000). Desse modo, o cozimento dificultado e o escurecimento do tegumento podem estar relacionados também a outros compostos químicos.

O nível de aceitação do brilho do tegumento pelo consumidor reflete-se no cultivo do feijoeiro em diversos locais do Brasil e outros países. Estudos feitos por Diamant et al. (1989) na Guatemala revelaram que a coloração escura e o brilho estão entre as principais características usadas na seleção de feijão para consumo. No estudo desses autores, foram entrevistados 600 consumidores de feijão e os resultados mostraram que 32% dos consumidores preferiam sementes com tegumento opaco, em função do cozimento. No entanto, a aparência também foi um dos principais critérios julgados pelos consumidores na preferência pelo feijão e, neste caso, 18% preferiram feijão com tegumento brilhante.

Trabalhos recentes, através de levantamentos dos tipos de sementes mais cultivadas em algumas regiões do Brasil, indicaram predominância das sementes opacas em relação às brilhantes (FONSECA, 1998; FONSECA et al., 2003; 2007; CHIORATO, 2004; BARELLI et al., 2009).

Fonseca (1998) caracterizou germoplasma de feijão coletado no sul de Minas Gerais, avaliando 119 variedades de feijoeiro. Desse total, 65 apresentavam tegumento opaco e apenas 13 possuíam tegumento brilhante, enquanto as demais eram de brilho intermediário. Fonseca et al. (2003) avaliaram germoplasma de feijão da região do Alto do São Francisco, em Minas Gerais, constatando que 34% dos acessos apresentavam tegumento opaco e apenas

18% tegumento brilhante, sendo os demais intermediários. De maneira similar, Fonseca et al. (2007) avaliaram germoplasma de feijão do Espírito Santo, observando 122 variedades. Dentre as variedades, 59 possuíam tegumento opaco e apenas 11 tegumento brilhante. No estudo de Barelli et al. (2009), dentre 35 cultivares tradicionalmente cultivadas no estado do Mato Grosso, apenas sete apresentavam tegumento brilhante.

Chiorato (2004), em estudo para caracterização de acessos de feijoeiro do Banco de Germoplasma do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), São Paulo, revelou que a porcentagem de acessos com tegumento brilhante também foi bastante reduzida. Dentre 933 acessos avaliados, incluindo andinos e mesoamericanos de diversos locais, apenas 14% apresentaram tegumento brilhante, enquanto que 52% apresentavam tegumento opaco e 34% brilho intermediário.

2.5 Genética do tegumento do feijoeiro e genes relacionados ao brilho

O brilho do tegumento, a cor e seu padrão de distribuição e as cores das flores de feijoeiro constituem caracteres básicos para diferenciar genótipos, sendo bons marcadores genéticos. No feijoeiro, a cor é controlada por um grupo bem definido de genes que regulam a via de biossíntese dos flavonóis e antocianinas (McCLEAN et al., 2002). Em uma perspectiva histórica, diversas análises genéticas do tegumento têm sido realizadas, elucidando os genes que se expressam, suas interações e seus efeitos.

Em 1985 foi iniciado um programa para desenvolver genótipos (*testers*), cada um com um ou mais marcadores genéticos recessivos para cor e padrão do tegumento de feijoeiro. Fundamentalmente, os trabalhos foram desenvolvidos pelo pesquisador Mark J. Bassett e colaboradores. Como base para esse programa, foi adotado como parental recorrente a linhagem 5-593, utilizada em pesquisas nas áreas experimentais de Gainesville, na Flórida. Esta linhagem tem hábito de crescimento determinado, flores roxas e tegumento preto brilhante. Nesta linhagem, a maioria dos genes expressos no tegumento se apresentam na forma homozigota dominante, justificando sua escolha para os cruzamentos. O genótipo do tegumento desta linhagem é *Stp T Z l⁺ Bip P [C r] D J G B V Rk*, que inclui genes para padrão e cor de tegumento (BASSETT, 1998b; 1998e; 1998c; 2003).

Um exemplo de *tester* desenvolvido a partir de uma série de retrocruzamentos com 5-593 é $j BC_3$ 5-593. Essa simbologia indica o loco em que houve substituição alélica (forma dominante pela recessiva) e a geração de retrocruzamento (BASSET, 1992; BASSETT, 1998a). Portanto, nesse *tester*, o único loco em que houve substituição alélica a partir de 5-593 foi J . 5-593 apresentava a forma dominante do loco (J), enquanto que o *tester* apresenta o alelo recessivo (j).

No presente trabalho, o padrão do tegumento refere-se às diferentes formas como as cores são distribuídas em sua superfície. Algumas variedades apresentam tegumento totalmente colorido e outras, padrões parcialmente coloridos (manchas ou pontos coloridos, listras) dependendo dos alelos presentes.

A expressão da cor é completamente dependente dos alelos múltiplos do loco P . A presença do alelo dominante P permite a formação de flores ou tegumentos com coloração, enquanto que indivíduos com genótipo pp apresentam esses tecidos brancos ou sem pigmentação (BASSETT, 1994b) (Figura 2.3).



Figura 2.3 – Expressão fenotípica de genótipos PP e pp . A presença do alelo dominante P é essencial para a expressão de outros genes de coloração do tegumento

Outro gene básico na determinação da cor é V . Em indivíduos P_- , uma série multialélica em V_- controla a cor das flores. No tegumento, genótipos V_- contêm antocianinas enquanto que em genótipos vv estão presentes os flavonóis (BENINGER; HOSFIELD; BASSETT, 1999; BENINGER et al., 2000).

A outros genes do tegumento cabe uma breve descrição, baseada em Porch (2010):

- *T* – responsável pela coloração completa do tegumento. Em plantas *tt*, o tegumento é parcialmente colorido (padrão de tegumento);
- *cl* – *circumlineatus* – com *t*, *v*, *clcl* expressa um sulco na superfície do tegumento, no limite entre áreas brancas e coloridas de tegumentos parcialmente coloridos;
- *Z* – conhecido com fator zonal para tegumentos parcialmente coloridos. Com *t*, *Z* interage para formar uma série de padrões de tegumentos parcialmente coloridos. Com *T*, *Z* não expressa padrões parcialmente coloridos;
- *Bip* – *bipunctata* – *Bip* e *bip*, combinados com *Arc* e *arc*, formam padrões de tegumento específicos próximos ao hilo. Esse gene relaciona-se à extensão de cores em sementes parcialmente coloridas. Este gene está ligado a *J* e ambos estão localizados no grupo de ligação 10 (B10) no feijoeiro (FREYRE et al., 1998);
- *Fib* – exibe também padrões específicos de tegumento, dependendo dos genes com que interage. Foi assim designado pelo fator *fibula*;
- [*Cr*] – *C* não expressa padrão de tegumento; *r* não expressa a cor vermelho-amarronzado enquanto que *R* a expressa;
- *D* – está relacionado fundamentalmente à formação de anel pardo ao redor do hilo;
- *Gy* – na forma recessiva, *gygy*, é expressada coloração amarelo-esverdeada;
- *B* – com *P C J B v* se expressa um tom marrom mineral, enquanto que com *P C J g B v* é expressa cor marrom acinzentada;
- *Rk* – não expressa cores vermelhas na presença de *Rk*. Dependendo das interações da forma recessiva com os demais genes, determina diversas cores diferentes.

No presente trabalho, no entanto, é necessário discorrer detalhadamente sobre dois genes que são associados ao brilho do tegumento em feijoeiro. São os genes *Asper* (*Asp*) e *Joker* (*J*). Os dois genes apresentam diferentes papéis na expressão do brilho no tegumento.

2.6 Genes *Joker* e *Asper*

Os estudos abordando o brilho do tegumento e seus efeitos são escassos e relativamente confusos. A maioria dos trabalhos enfoca outras características conjuntamente, não permitindo avaliações muito acuradas sobre os efeitos do brilho. Na literatura, são apresentados trabalhos que estudaram os genes que controlam o brilho e seu modo de herança (LAMPRECHT, 1940; PRAKKEN, 1972; BASSETT, 1996; BASSETT et al., 2002; CALDAS; BLAIR, 2009; BETT; ELSADR, 2010), os efeitos morfológicos (BASSETT, 1996; 1998; BUSHEY; HOSFIELD; BENINGER, 2000; BUSHEY; OWENS; HOSFIELD, 2001; 2002) e bioquímicos destes genes (BENINGER et al., 1999; 2000; 2005).

O brilho apresentado pelo tegumento de feijão pode ser devido a dois genes, *Asper* (*Asp*) e *Joker* (*J*). Os trabalhos iniciais consideravam *J* como o principal gene responsável pela característica (LAMPRECHT, 1940; PRAKKEN, 1972). No entanto, Bassett (1996) descreve os principais efeitos de cada um dos genes e deixa clara a diferença entre os mesmos.

2.6.1 Loco *Joker*

Para melhor entendimento deste loco, é necessária uma breve descrição da terminologia usada para algumas partes da superfície do tegumento de feijão, especialmente próximo à região do hilo, ilustradas na Figura 2.4. O hilo é circundado pelo anel do hilo, que varia na sua coloração entre as variedades de feijão. Ao redor do hilo está a corona, que pode ser colorida ou esbranquiçada. Na região entre corona e anel do hilo encontra-se a carúncula, excrescência de pequenas dimensões. Também é encontrada a micrópila, pequeno orifício na base do hilo. Além destas, é notada a região margo em algumas sementes, que pode apresentar coloração diferente em relação ao restante do tegumento.

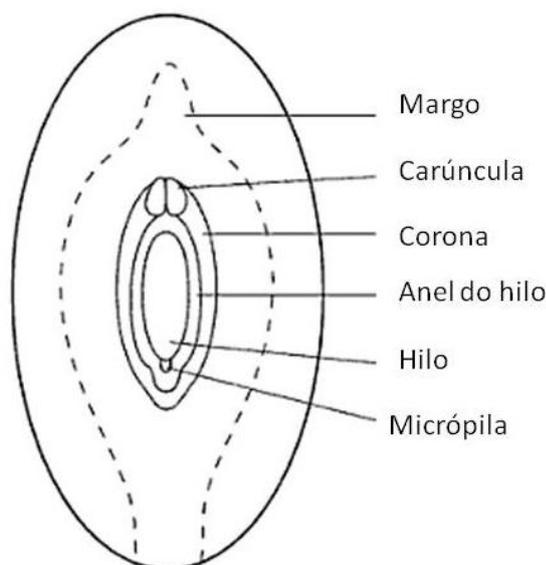


Figura 2.4 – Terminologia das partes constituintes do hilo e entorno, na superfície do tegumento de *Phaseolus vulgaris* L. Fonte: Bassett, 2007

O gene *J* foi descrito na primeira metade do século XX nos trabalhos de Lamprecht (1932, 1940). No mesmo período Schreiber (1934) descreveu outro gene, *Sh* (do inglês, *shininess*), que atualmente é considerado equivalente a *J*. No entanto, foi através dos trabalhos de Bassett (1992, 1996, 1998), Bassett et al. (2002) e McClean et al. (2002), que o modo de herança e os alelos desse gene foram melhor elucidados.

J apresenta efeitos sobre a cor e também sobre o brilho do tegumento (BASSETT, 2007).

O gene *J* na forma recessiva *jj* condiciona três principais características fenotípicas. Primeiramente, a cor da região margo é a mesma apresentada pelo tegumento, no entanto, a cor distal à região do hilo é altamente variável e característica de tegumentos com coloração imatura para esse genótipo (BASSETT, 1996). Ao citar coloração imatura, no presente trabalho, se designa coloração irregular ou desuniforme pelo tegumento, pois o alelo *j* interfere na formação da cor final. É como se fosse a cor apresentada por sementes que ainda estão em processo de amadurecimento.

O segundo efeito desse gene pode ser observado na região da coroa. Usualmente esta área apresenta-se descolorida ou esbranquiçada, algumas vezes perdendo totalmente a coloração (BASSETT, 1996).

Por consequência, o terceiro efeito do gene se dá no brilho do tegumento. Em genótipos *jj* a intensidade visual do brilho é reduzida, conferindo aspecto levemente opaco à semente, em relação ao que seria esperado com *J* (BASSETT, 1996). Para analisar este aspecto, portanto, é requerido um padrão (controle) para o alelo dominante *J*. A linhagem 5-593 (BASSETT, 1998b, 1998e, 1998c; 2003) constitui o melhor padrão.

Leakey (1988) apontou outra característica para diferenciar o genótipo *JJ* do recessivo. Segundo o autor, genótipos *JJ* sempre expressam anel do hilo escuro. No entanto, *testers* para *j* também apresentam anel do hilo escurecido. Desse modo, Bassett (1996) reforça que a principal característica a ser levada em conta é a uniformidade de coloração no tegumento em *J*, sendo que em *jj* é observado o contrário, com coloração ‘pálida’ e de tegumento imaturo.

Além dos aspectos fenotípicos, substancial progresso tem sido obtido com estudos bioquímicos relacionados a *J*. Feenstra (1960) mostrou que os genótipos dominantes (*JJ*) produzem pró-antocianidinas (leucobases) enquanto os recessivos não produzem. Leakey (1988) descreveu que o aspecto brilhante das sementes se deve à acumulação de leucocompostos na camada de parênquima da semente, que refletem luz através da hipoderme.

Estudos mais recentes mostraram resultados semelhantes. Beninger et al. (1998), estudando uma variedade comercial de feijão chileno conhecida com “Prim”, previamente genotipada como *jj* (BASSETT, 1999), não encontrou pró-antocianidinas nas amostras (BENINGER; HOSFIELD, 1999). Por isso, sugeriu-se que a formação de pró-antocianidinas depende essencialmente do alelo dominante *J* (LEAKEY, 1988; BENINGER; HOSFIELD, 1999).

Leakey (1988) descreveu que um efeito fenotípico provavelmente relacionado às pró-antocianidinas (em genótipos *J*) é o gradativo escurecimento do tegumento ao longo do tempo, o que dificulta o cozimento e a digestibilidade. Genótipos *jj* não apresentam escurecimento com o tempo de armazenamento, pois não produzem pró-antocianidinas.

O fenômeno de escurecimento, no entanto, não se encontra completamente elucidado. Alguns estudos têm mostrado que o processo pode estar relacionado a outros genes, além de *J*. A Dra. Kirstin Bett, da Universidade de Saskatchewan, Canadá, em comunicação pessoal, informou que *J* indica ser epistático a outro loco, o *SD* (escurecimento lento – *slow darkening*), desse modo interferindo no escurecimento, como sendo um pré-requisito, mas não o determinando inteiramente. Junk-Knievel, Vandenberg e Bett (2008) caracterizaram o loco *SD*. Algumas classes de sementes apresentam escurecimento mais acelerado ao longo do tempo, sendo consideradas *RD* (escurecimento regular – *regular darkening*), enquanto outras apresentam escurecimento mais lento (*SD*). Trabalho recente mostrou que genótipos *jj* não escurecem, como esperado, e que genótipos com escurecimento lento são controlados pelo gene *SD*, embora também carreguem o alelo dominante *J* (BETT; ELSDAR, 2010).

2.6.2 Loco Asper

Até recentemente, a perda de brilho ou a sua ausência no tegumento era associada principalmente ao genótipo *jj*. No entanto, o alelo *asp* do gene *Asper* é amplamente distribuído e constitui o alelo mais comumente encontrado, produzindo tegumentos opacos. A diferença mais saliente entre *aspasp* e *jj* é que o primeiro nunca afeta a cor da semente, enquanto que o último sempre produz uma coloração mais imatura do que seria esperado com *J* (BASSETT, 1996).

A primeira descrição do gene *Asp* foi realizada por Lamprecht (1940). O loco não apresenta efeito bioquímico conhecido. Desde sua caracterização, o gene é conhecido por ter um efeito estrutural sobre o tegumento. Em genótipos *aspasp*, a superfície do tegumento apresenta maior rugosidade (LAMPRECHT, 1940). Contrariamente, genótipos *AspAsp* apresentam tegumento com superfície ligeiramente uniforme.

A rugosidade do tegumento pode ser observada em cortes de microscopia eletrônica de varredura, na extremidade superior do parênquima paliçádico (BENINGER et al., 2000). Além disso, Beninger et al. (2000), estudando a expressão morfológica e bioquímica do gene *Asp*, verificaram que os *testers* 5-593 (*AspAsp*) e DBV (*Dark Brown Violet – AspAsp*)

apresentaram parênquima paliçádico mais espesso do que o *tester* MTB (*Mattle Black - aspasp*). Desse modo, os autores sugeriram que genótipos de tegumento opaco (*aspasp*) apresentam menor espessura do parênquima paliçádico. No mesmo trabalho, os autores verificaram que esses genótipos também apresentaram menor quantidade de antocianinas (delfinidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo) em relação aos genótipos de tegumento brilhante. Portanto, é provável que, devido à limitação da espessura do parênquima paliçádico, seja reduzido o acúmulo de antocianinas no tegumento do feijoeiro (BENINGER et al., 2000).

Apesar dessas considerações, não se conhece o efeito bioquímico a que o gene *Asp* está relacionado. Ou seja, é desconhecida a proteína(s) e/ou outra(s) substância(s) que leva(m) as sementes a apresentarem o aspecto brilhante.

2.7 Flavonoides, antocianinas e pró-antocianidinas

2.7.1 Flavonoides

Os flavonoides constituem um dos maiores grupos de metabólitos secundários de plantas e estão distribuídos por todas as suas partes (CUYCKENS; CLAEYS, 2004). Assim como outros metabólitos, os flavonoides desempenham importantes papéis nas interações das plantas com o ambiente: (i) proteção contra diversos estresses bióticos e abióticos; (ii) participação em vários estádios de desenvolvimento, como no de sementes (desenvolvimento, dormência, viabilidade); (iii) qualidade de produtos agrônômicos e industriais de interesse para o homem (LEPINIEC et al., 2006). Além disso, vários trabalhos vêm apontando benefícios desses compostos para a saúde humana, pois apresentam propriedades antioxidantes, antivirais, antibacterianas, anticarcinogênicas, dentre outras (FOWLER; KOFFAS, 2009).

Os flavonoides são formados através de uma série de reações de condensação entre o ácido hidrocínâmico e resíduos de malonil (anel A), dando origem à estrutura básica C6 – C3 – C6 (Figura 2.5). Nas plantas, os flavonoides podem ocorrer em diferentes formas, devido a eventos como hidroxilação, metilação e glicosilação (CUYCKENS; CLAEYS, 2004; FOWLER; KOFFAS, 2009).

Muitos flavonoides são pigmentos diretamente detectáveis que não são essenciais para funções celulares básicas. No entanto, devido aos atributos positivos conferidos a estes compostos, os estudos do metabolismo dos flavonoides têm merecido crescente interesse (LEPINIEC et al., 2006).

Mais de 6000 flavonoides foram reportados e subdivididos em pelo menos seis grandes classes: isoflavonas, flavononas, flavonas, flavonois, catequinas e antocianinas, de acordo com o nível de oxidação do anel de carbono. Adicionalmente, a estereoquímica, posição e a natureza das substituições (hidroxil, metil, galoil, glicosil), a combinação, o grau de polimerização, e a ligação entre as unidades básicas são aspectos que levam à classificação desses compostos nas plantas (LEPINIEC et al., 2006; FOWLER; KOFFAS, 2009).

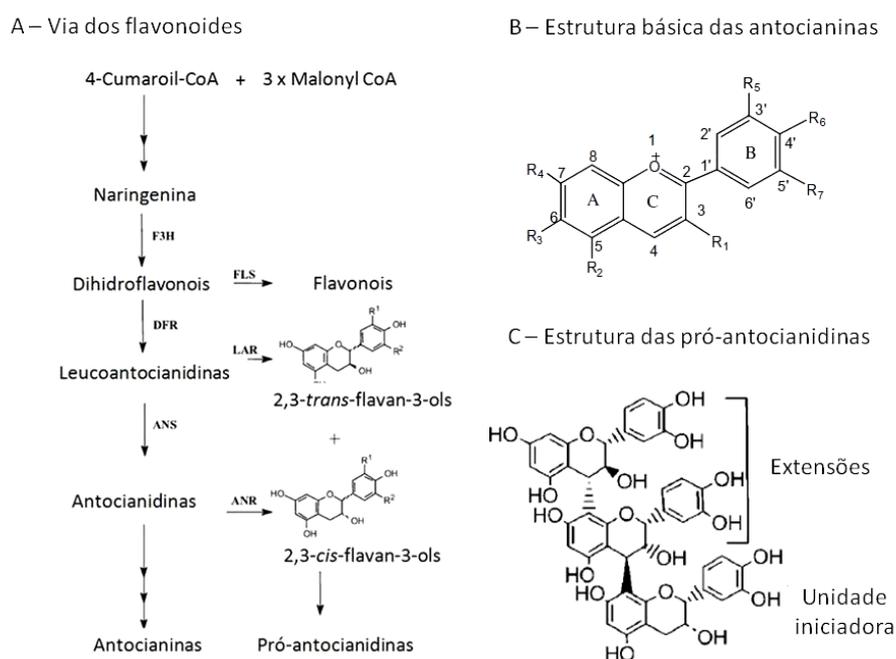


Figura 2.5 – Principais etapas da via dos flavonoides direcionando à síntese de antocianinas e pró-antocianidinas. F3H – Flavanona-3-hidroxilase; FLS – Flavonol sintase; DFR – Dihidroflavonol redutase; LAR – Leucoantocianidina redutase; ANS – Antocianidina sintase; ANR – Antocianidina redutase. Fonte: adaptado de Castañeda-Ovando et al. (2009), Pang et al. (2007) e Tanner et al. (2003)

Os principais tipos de flavonoides encontrados nas sementes são os flavonois, antocianinas, flobafenos, isoflavonas e pró-antocianidinas (PAs). Dentre esses compostos, as antocianinas são encontradas tanto em mono quanto em dicotiledôneas, neste último grupo incluindo *P. vulgaris*. Os flavonois contribuem na pigmentação das sementes principalmente como copigmentos com antocianinas, como em milho. As isoflavonas são compostos descoloridos que ocorrem na subfamília Papilionoideae, constituindo um dos principais flavonoides do embrião e do tegumento (LEPINIEC et al., 2006).

Os flavonois e as flavonas estão diretamente relacionados às antocianinas, exceto por diferirem no número de oxigênios do anel central. A maioria das flavonas e flavonois são amarelos ou apresentam cor de marfim e, assim como as antocianinas, também contribuem para a coloração de flores. Determinadas espécies, especialmente membros da subfamília de leguminosas Papilionoideae, também acumulam um ou mais isoflavonoides (DU et al., 2009; FOWLER; KOFFAS, 2009).

2.7.2 Antocianinas

As antocianinas são pigmentos solúveis em água derivados dos flavonoides a partir da via do ácido shiquímico. Durante o desenvolvimento das plantas, as antocianinas podem ser transientes, aparecendo somente em tecidos juvenis ou senescentes, ou podem ser permanentes (CHALKER-SCOTT, 1999). A estrutura química básica das antocianinas é composta por antocianidinas, que consistem de um anel aromático [A] unido a um anel heterocíclico [C] que contém oxigênio, que também é ligado por carbono-carbono a um terceiro anel aromático [B] (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009) (Figura 2.5).

As antocianinas são responsáveis pela variedade de cores e aspecto brilhante de flores, folhas e frutos em diversas plantas (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009). Além disso, apresentam atividade antioxidante, que apresenta papel vital na prevenção de doenças como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, entre outros (KONCZAK; ZANG, 2004).

No feijoeiro, alguns trabalhos têm caracterizado antocianinas presentes no tegumento das sementes. Takeoka et al. (1997) isolaram três antocianinas de variedades de feijão do grupo comercial preto: delphinidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo. A antocianina com maior concentração foi a delphinidina (56%). Desse modo, métodos de determinação monomérica de antocianinas por espectrofotometria ou por HPLC normalmente expressam as concentrações de antocianinas usando padrão de delphinidina (DÍAZ; CALDAS; BLAIR, 2010).

2.7.3 Pró-antocianidinas

As pró-antocianidinas ou taninos condensados são derivados da via metabólica que leva às antocianinas. Depois da lignina, representam a classe mais abundante de compostos fenólicos naturais. Apresentam esta denominação pela reação de depolimerização oxidativa em meio ácido, que fornece antocianidinas coloridas (HÜMMER; SCHREIER, 2008). Há uma variedade de pró-antocianidinas, dependendo do tipo de ligação, tornando esta classe de compostos fenólicos abundante entre as plantas, por exemplo, nas sementes (LEPINIEC et al., 2006; HE et al., 2008; HÜMER; SCHREIER, 2008).

Quimicamente, as pró-antocianidinas consistem de unidades de flavan-3-ols, ligadas principalmente através dos carbonos C4 e C8 ou de C4 e C6 (Figura 2.5), através de uma série de conversões químicas (HÜMER; SCHREIER, 2008).

Esses compostos apresentam diversas funções biológicas e atividades bioquímicas, incluindo proteção contra predação de animais herbívoros (FEENY, 1970) e ataques de patógenos (bactérias e fungos) (SCALBERT, 1991), assim como restrição do crescimento de plantas vizinhas (BAIS et al., 2003). As PAs também são amplamente distribuídas em alimentos de origem vegetal, particularmente em frutas, legumes, cereais e diversas bebidas como sucos, vinhos, sidra e chás, em que contribuem para o sabor amargo e adstringência destas. Recentemente, considerável atenção tem sido dada a PAs e seus monômeros devido aos seus potenciais efeitos positivos na saúde humana como atividades anticancerígenas, antioxidantes, anti-inflamatórias, propriedades cardioprotetivas, vasodilatadoras e efeitos antitrombóticos. No entanto, é necessário estudar a possibilidade de toxicidade em longo prazo dessas substâncias através de avaliação sistemática (HE et al., 2008).

A formação das pró-antocianidinas ainda não é completamente esclarecida na literatura. Algumas questões ainda permanecem, por exemplo, como as unidades de flavan-3-ols são polimerizadas para produzir PAs e se essa polimerização é intermediada por enzimas, e ao mesmo tempo qual é a enzima que regula esse processo (HE et al., 2008).

Sementes de *P. vulgaris* com tegumento brilhante possivelmente apresentam pró-antocianidinas nos tecidos. Diversas variedades de feijoeiro têm sido caracterizadas quanto à presença ou ausência desses compostos (BENINGER; HOSFIELD; NAIR, 1998; BENINGER; HOSFIELD, 2003), também analisando propriedades antioxidantes (BENINGER; HOSFIELD, 2003; AKOND et al., 2011).

2.8 Técnicas para estudar o brilho do tegumento

As análises do presente estudo basearam-se em técnicas diversificadas, abrangendo: (i) avaliações das diferenças quantitativas de cor e brilho entre amostras de grãos, utilizando espectrofotometria - colorímetro; (ii) análises do tegumento por microscopia eletrônica de varredura; (iii) determinações de fenois totais, taninos totais e taninos condensados através de método analítico (Butanol-HCl) e teste histoquímico com vanilina acidificada (Vanilina-HCl); (iv) análises de similaridade genética e detecção de marcadores moleculares associados ao brilho do tegumento, utilizando a técnica de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*).

2.8.1 Análise de cores e luminosidade (L^*) pelo sistema de cores $L^*a^*b^*$

Em 1976, a *Comission Internationale de L'Eclairage* (CIE), organização não-governamental responsável pela padronização de sistemas de cores e luzes, recomendou o uso do sistema de cores CIE $L^*a^*b^*$ ou CIELAB, em que L^* indica a luminosidade e a^* e b^* as coordenadas de cromaticidade. O objetivo da recomendação foi padronizar a utilização de uma escala de cores que poderia ser usada universalmente para possibilitar comparações entre cores de objetos, tecidos, plásticos, dentre outros materiais. No presente trabalho, utilizou-se essa escala de cores para diferenciar sementes com tegumentos brilhantes de tegumentos opacos e também sua coloração.

A escala de cores $L^*a^*b^*$ é aproximadamente uniforme. Nesse tipo de escala distâncias iguais no diagrama de coordenadas (diagrama em que são inseridas as variações de cor) correspondem a diferenças de cor igualmente perceptíveis. O CIELAB é organizado na forma de um cubo. Neste, o eixo L^* começa na parte superior e termina na parte inferior. O valor máximo de L^* é 100, que indica o perfeitamente branco ou refletor. O valor mínimo é zero, que representa o preto. Os eixos a^* e b^* não apresentam limites numéricos específicos. Valores positivos de a^* direcionam para a cor vermelha, enquanto valores negativos vão em direção ao verde. Valores positivos de b^* indicam o amarelo e valores negativos o azul. O diagrama da Figura 2.6 representa o sistema $L^*a^*b^*$.

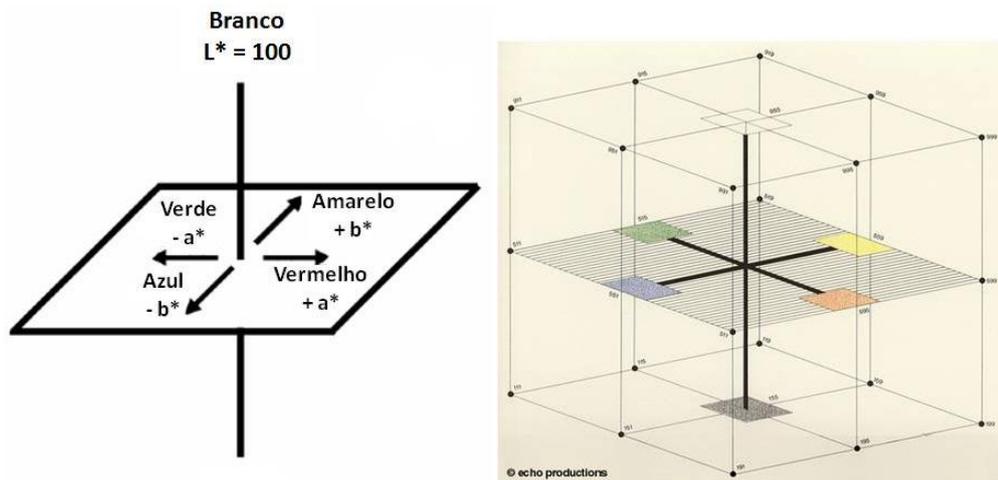


Figura 2.6 - Diagrama representando o sistema de cores CIE $L^*a^*b^*$, recomendado para padronização de análise de cores pela *Comission Internationale de L'Eclairage* (CIE). L^* é o eixo para medida de luminosidade, enquanto que a^* e b^* são eixos de cores

Nesse sistema de cores, são utilizados valores de delta (Δ) para indicar diferenças entre um valor e um padrão conhecido. Desse modo, ΔL^* , Δa^* e Δb^* indicam o quanto um padrão difere de outro nas medidas de L^* , a^* e b^* . Esses valores são frequentemente utilizados para controle de qualidade ou por motivos de ajuste matemático de equações. Assim, Δ apresenta tolerância, de modo que valores de Δ fora de limite estabelecido indicam que a amostra é muito diferente do padrão. Informações mais detalhadas desse sistema de cores são descritas na CIE *Publication 15.2* (1986).

O sistema $L^*a^*b^*$ pode ser utilizado para verificar quantitativamente diferenças e brilho entre amostras de grãos de feijão. A medida de luminosidade (L^*) é indicada para realizar essa análise.

2.8.2 Microscopia eletrônica de varredura

Goldstein et al. (1992) descreve que a microscopia eletrônica de varredura (MEV) é a técnica de caracterização microestrutural mais versátil hoje disponível, encontrando aplicações em diversos campos do conhecimento. A técnica baseia-se na interação de um fino feixe de elétrons focalizado sobre a área ou o microvolume a ser analisado e gera uma série de sinais que podem ser utilizados para caracterizar as propriedades da amostra, tais como a composição, superfície, cristalografia e vários outros aspectos.

O microscópio eletrônico de varredura é composto por duas partes principais, a coluna e a câmara de amostras. A coluna é mantida em vácuo e contém em sua porção superior um canhão de elétrons e, abaixo deste, lentes magnéticas para a focalização de um fino feixe de elétrons sobre a amostra. A quantidade de corrente no feixe de elétrons incidente sobre a amostra determina a intensidade dos sinais a serem emitidos, a qual, por sua vez, é diretamente proporcional ao diâmetro do feixe, implicando no ajuste dos controles do microscópio para a otimização da condição de operação desejada. A fonte mais usual de elétrons corresponde à emissão termo-iônica, gerada a partir de um filamento de tungstênio aquecido a 2.700 K (GOLDSTEIN et al., 1992).

A câmara de amostras conta com diferentes tipos de detectores para captar os sinais gerados na interação elétron-amostra e um suporte, motorizado ou não, que possibilita a movimentação das amostras em três eixos (GOLDSTEIN et al., 1992).

No presente estudo, essa técnica foi aplicada à análise da superfície e de perfis transversais do tegumento, destacando o parênquima paliçádico, para determinações de comprimento dessa camada de células.

2.8.3 Determinações de fenois totais, taninos totais e taninos condensados

Dentre os métodos de determinação de fenois totais e taninos totais, cita-se o de Makkar et al. (1993). O método permite a determinação gravimétrica da quantidade de taninos e evita problemas associados com padrões em métodos espectrofotométricos. A determinação de taninos por essa metodologia baseia-se na ligação dos taninos como polivinilpirrolidona (PVP) insolúvel. O procedimento consiste em pesar o extrato de tanino antes e depois do tratamento com PVP insolúvel e a remoção do produto por centrifugação. O PVP se liga aos taninos e dessa forma a diferença em peso é devida à quantidade de taninos. No presente trabalho este método, no entanto, foi adaptado para análises espectrofotométricas.

Para a determinação de taninos condensados, no presente estudo, foi utilizado o método do Butanol-HCl ou butanol ácido (PORTER; HRSTICH; CHAN, 1986). Esse método, dentre os convencionais, é referido como o melhor para determinação de taninos condensados, em função da alta seletividade. Nessa determinação, as subunidades desses compostos são oxidativamente clivadas para fornecer antocianidinas, que são vermelhas em meio ácido (PORTER; HRSTICH; CHAN, 1986). O desenvolvimento da cor é dependente do solvente e é reduzido pela presença de água, sendo que as condições da reação precisam ser rigorosamente controladas.

Dois problemas principais influenciam o resultado da determinação pelo método do butanol ácido. Primeiramente, as substâncias da amostra apresentam diferentes coeficientes de absorvidade molar. Além disso, a estrutura da molécula de pró-antocianidinas influencia a cinética da reação. Ao usar padrões como cianidina, as determinações podem ser subestimadas. Se não bem definidas e caracterizadas, recomenda-se o isolamento de pró-antocianidinas de amostras para obter resultados mais confiáveis (HÜMMER; SCHREIER, 2008).

Além do método analítico, também foi realizado teste histoquímico com vanilina acidificada (HCl), para detectar taninos condensados. Originalmente usado como método analítico (BROADHURST; JONES, 1978), este se baseia no princípio de que em solução fortemente ácida a vanilina protonada reage com flavanol formando um composto colorido,

que é medido a 500 nm. O resultado é expresso em equivalentes de catequina, padrão usado para a construção da curva de calibração (HÜMMER; SCHREIER, 2008).

Embora o reagente da vanilina detecte tanto flavonoides monoméricos quanto poliméricos, ele é específico para uma classe limitada de compostos que apresentam uma ligação simples na posição 2, 3 e grupos hidroxila em posições alternadas no anel A. Leucoantocianidinas (catequinas) e pró-antocianidinas reagem com a vanilina formando um produto de condensação vermelho (DESHPANDE; CHERYAN; SALUNKHE, 1986).

Assim como no método de butanol ácido, o ensaio de vanilina-HCl apresenta diferenças nos coeficientes de absorção molar de compostos químicos da amostra. Valores de absorbância são geralmente maiores para pró-antocianidinas do que para monômeros, pois a reação não ocorre somente em extensões de unidades de flavan-3-ols ou suas terminações, em que os compostos passam a ser pró-antocianidinas. Desse modo, amostras que contêm antocianinas podem influenciar nos resultados (HÜMMER; SCHREIER, 2008).

2.8.4 Análise de similaridade genética e mapeamento molecular por AFLP

O melhoramento genético de características de importância agrônômica em plantas baseia-se cada vez mais na manipulação assistida por marcadores moleculares, visando obter eficiência mais elevada na transferência de determinados fatores genéticos (MILACH, 1998; CAIXETA et al., 2006). Os marcadores são úteis para detectar variações no genoma, elevando o poder de análise genética das plantas (CAIXETA et al., 2006). Diversas técnicas de marcadores moleculares encontram-se atualmente disponíveis para a análise de diversidade genética, o mapeamento genético e inúmeras outras aplicações. Entre as técnicas destaca-se a de AFLP (*Amplified Restriction Fragment Length Polimorphism*), baseada em PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Esta técnica permite verificar o polimorfismo de DNA em nível individual, a partir da amplificação de fragmentos obtidos pela digestão com duas enzimas de restrição (VOS et al., 1995). O mapeamento e a caracterização do gene responsável pela característica do brilho da semente pode, potencialmente, ser realizado através desta técnica.

A análise de AFLP consiste de quatro etapas. Na primeira, o DNA genômico é digerido simultaneamente com duas endonucleases de restrição: geralmente EcoRI e MseI. A enzima EcoRI reconhece um sítio de 6 pb (corte raro) e a MseI reconhece um sítio de 4 pb (corte frequente). Na segunda etapa os fragmentos genômicos gerados pela clivagem são substratos para ligação de adaptadores específicos de oligonucleotídeos de fita simples. Em seguida, os fragmentos de restrição são amplificados seletivamente por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com os iniciadores contendo nucleotídeos seletivos homólogos aos adaptadores, com 1-3 bases (pb) de extensão do final 3' do DNA. Na quarta etapa, a subpopulação de fragmentos amplificados é separada em gel de poliacrilamida e visualizada por radiografia (VOS et al., 1995), ou, mais frequentemente, os geis são corados com nitrato de prata (CRESTE et al., 2001).

A técnica AFLP permite uma ampla cobertura do genoma, pois diversos fragmentos são gerados após a restrição e amplificação. Além disso, a técnica apresenta elevada reprodutibilidade (CAIXETA et al., 2006). Os marcadores AFLP são dominantes, não permitindo distinguir homozigotos de heterozigotos. O polimorfismo obtido pelos marcadores AFLP é resultante dos seguintes fatores: (a) mutação no sítio de restrição; (b) mutação na sequência adjacente ao sítio de restrição e complementar à região de anelamento do *primer*; e (c) inserção ou deleção dentro dos fragmentos amplificados. No geral, o nível de polimorfismo detectado pelo AFLP é mais reduzido do que o detectado por outros marcadores, como RFLP e microssatélites. No entanto, a habilidade de analisar um elevado número de locos polimórficos simultaneamente, através de uma única combinação de *primers* e em um único gel, resulta em um elevado valor informativo do AFLP (RIDOUT; DONINI, 1999).

De modo geral, os marcadores AFLP são distribuídos ao longo de todo o genoma, apesar de alguns agrupamentos serem observados em trabalhos de mapeamento. Além da distribuição aleatória, os marcadores AFLP possuem herança mendeliana, fazendo com que esta técnica tenha grande potencial para assistir diferentes áreas de genética e melhoramento de plantas, como o monitoramento da herança e de características agronômicas em plantas, o diagnóstico de doenças, a análise de *pedigree* e de diversidade genética e a análise de marcadores ligados a caracteres de interesse. Uma das grandes aplicações desta técnica reside na construção de mapas de ligação e na clonagem de genes de interesse (CAIXETA et al., 2006).

REFERÊNCIAS

AKOND, A. S. M. G. M. A.; KHANDAKER, L.; BERTHOLD, J.; GATES, L.; PETERS, K.; DELONG, H.; HOSSAIN, K. Anthocyanin, total polyphenols and antioxidant activity of common bean. **American Journal of Food Technology**, New York, v. 6, n. 5, p. 385-394, 2011.

BAIS, H. P.; VEPACHEDU, R.; GILROY, S.; CALLAWAY, R. M.; VIVANCO, J. M. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. **Science**, Washington, DC, v. 301, p. 1377-1380, 2003.

BARAHONA, R.; LASCANO, C. E.; COCHRAN, R.; MORRILL, J.; TITGEMEYER, E. C. Intake, digestion, and nitrogen utilization by sheep fed tropical legumes with contrasting tannin concentration and astringency. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 75, p. 1633–1640, 1997.

BARELLI, M. A. A.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; VIDIGAL-FILHO, P. S.; NEVES, L. G.; SILVA, H. T. Genetic divergence in common bean landrace cultivars from Mato Grosso do Sul State. **Semina. Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n.1, p. 1061-1072, 2009.

BASSETT, M. J. Development of a protocol for determining the genotype of seed coat color and color pattern in common bean. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Prosser, WA, v. 35, p. 191-192, 1992.

_____. The genotype for seed coat color of breeding line 5-593. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Prosser, WA, v. 37, p. 244-245, 1994a.

_____. The griseoalbus (gray-white) seed coat color is controlled by an allele (p^{sri}) at the *P* locus in common bean. **HortScience**, Alexandria, v. 29, p. 1178-1179, 1994b.

_____. The margo (*mar*) seed coat color gene is a synonym for the Joker (*j*) locus in common bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 121, p. 1028-1031, 1996.

_____. A test cross protocol for determining the genotype of dark red seedcoat colors in common bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 123, p. 1048–1052, 1998a.

_____. List of seed coat genetic tester stocks in the 5–593 genetic background. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Prosser, WA, v. 41, p. 125–126, 1998b.

_____. The genotype for seed coat color and pattern of breeding line 5-593, 1998. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Prosser, WA, v. 41, p. 191-192, 1998c.

_____. The seedcoat color genotype of ‘Prim’ and the Manteca and Coscorrón market classes of common bean. **HortScience**, Alexandria, v. 34, p. 336–337, 1999.

_____. The seed coat color genotype of 5-593, the recurrent parent for many genetic stocks of common bean maintained as PI lines at Pullman, WA. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Prosser, WA, v. 46, p. 37-38, 2003.

_____. Genetics of seed coat color and pattern in common bean. In: JANICK, J. (Ed.). **Plant breeding reviews**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2007. cap. 8. (Plant Breeding Reviews Series, 28).

BASSETT, M. J.; LEE, R.; SYMANIETZ, T.; McCLEAN, P. E. Inheritance of reserve margo seedcoat pattern and allelism between the genes *J* and *L* for partly colored seedcoat pattern in common bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 127, p. 56–61, 2002.

BENCHIMOL, L. L.; CAMPOS, T.; CARBONELL, S. A. M.; COLOMBO, C. A.; CHIORATTO, A. F.; FORMIGHIERI, E. F.; GOUVÊA, L. R. L.; 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**, Dordrecht, v. 54, p. 1747-1762, 2007.

BENINGER, C. W.; HOSFIELD, G. L.; NAIR, M. G. Flavonol glycosides from the seedcoat of a new Manteca-type dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, p. 2906-2910, 1998.

BENINGER, C. W.; HOSFIELD, G. L. Astragalin (kaempferol 3-Oglucoside) and proanthocyanidins are the main flavonoid compounds of four *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Prosser, WA, v. 42, p. 119-120, 1999.

_____. Flavonol glycosides from Montcalm dark red kidney bean: implications for the genetics of seed coat color in *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, p. 4079-4082, 1999.

_____. Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 7879-7883, 2003.

BENINGER, C. W.; HOSFIELD, G. L.; BASSETT, M. J. Flavonoid composition of three genotypes of dry bean (*Phaseolus vulgaris*) differing in seed coat color. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 124, p. 514-518, 1999.

BENINGER, C. W.; HOSFIELD, G. L.; BASSETT, M. J.; OWENS, S. Chemical and morphological expression of the B and Asp seedcoat genes in *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 125, p. 52-58, 2000.

BETT, K. E.; ELSADR, H. The gene controlling slow darkening in pintos is not *J*. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Prosser, WA, v. 53, p. 82-83, 2010.

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

BORÉM, A.; CARNEIRO, J. E. S. A cultura. In: VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão**. 2. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2006. p. 341-357.

BROADHUSRT, R. B.; JONES, W. T. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 29, n. 9, p. 788-794, 1978.

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

BURLE, M. L.; FONSECA, J. R.; KAMI, J. A.; GEPTS, P. Microsatellite diversity and genetic structure among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary center of diversity. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 121, p. 801-813, 2010.

BUSHEY, S. M.; HOSFIELD, G. L.; BENINGER, C. W. Water uptake and its relationship to pigment leaching in black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Prosser, WA, v. 43, p. 104-105, 2000.

BUSHEY, S. M.; OWENS, S.; HOSFIELD, G. L. The epicuticular wax layer and water uptake in black beans. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Prosser, WA, v. 44, p. 159-160, 2001.

_____. The role of the epicuticular wax layer in water movement across the bean seed coat. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Prosser, WA, v. 45, p. 12-13, 2002.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.) **Marcadores moleculares**. Viçosa: Ed. da UFV, 2006. p. 10-78.

CARVALHO, M. F.; CRESTANI, M.; FARIAS, F. L.; COIMBRA, J. L. M.; BOGO, A.; GUIDOLIN, A. F. Caracterização da diversidade genética entre acessos crioulos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) coletados em Santa Catarina por marcadores RAPD. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1522-1528, 2008.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, Barking, v. 113, p. 859-871, 2009.

CHALKER-SCOTT, L. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 70, n. 1, p. 1-9, 1999.

CHIORATO, A. F. **Divergência genética em acessos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) do banco de germoplasma do Instituto Agrônômico**. 2004. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Agrônômico de Campinas, Campinas, 2004.

CIAT. **Condiciones del campo para realizar las evaluaciones del germoplasma de frijol**. Cali, 1976. 11 p.

COMMISSION INTERNATIONALE DE L'ECLAIRAGE - CIE. **Colorimetry**. Publication 15.2 (E-1.3.1) 1986. 2. ed. Vienna: Central Bureau of the CIE, 1996.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Produção de feijão 2009-2010**. Brasília, DF, 2010.

CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Heidelberg, v. 19, n. 4, p. 299-306, 2001.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 39, p. 1-15, 2004.

DESHPANDE, S. S.; CHERYAN, M.; SALUNKHE, D. K. Tannin analysis of fruit products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 24, n. 4, p. 401-449, 1986.

DÍAZ, A. M.; CALDAS, G. V.; BLAIR, M. W. Concentrations of condensed tannins and anthocyanins in common bean seed coats. **Food Research International**, Essex, v. 43, p. 595-601, 2010.

DU, H.; ZHANG, L.; LIU, L.; TANG, X. F.; YANG, W. J.; WU, Y. M.; HUANG, Y. B.; TANG, Y. X. Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. **Biochemistry**, Moscow, v. 74, n. 1, p. 1-11, 2009.

DIAMANT, R.; WATTS, B. M.; ELIAS, L. G.; RIOS, B. Consumer utilization and acceptability of raw and cooked black beans (*Phaseolus vulgaris*) in Guatemala. **Ecology of Food and Nutrition**, New York, v. 22, p. 183-195, 1989.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: Edgard Blucher, 1974. 312 p.

EMBRAPA. **Feijão**. Santo Antônio de Goiás, GO: Embrapa Arroz e Feijão, 2010. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/>>. Acesso em: 09 mar. 2011.

FEENSTRA, W. J. Biochemical aspects of seed coat colour inheritance in *Phaseolus vulgaris* L. **Mededelingen van de Landbouwhogeschool**, Wageningen, v. 60, n. 2, p. 1-53, 1960.

FEENY, P. Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. **Ecology**, Brooklyn, v. 51, p. 565-581, 1970.

FONSECA, J. R. Algumas características dos feijões plantados na região Sul de Minas Gerais. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 45, p. 203-209, 1998.

FONSECA, J. R.; VIEIRA, E. H. N.; COSTA, J. G. C. da; RAVA, C. A. Algumas características de feijões produzidos na região do Alto São Francisco de Minas Gerais. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 50, p. 787-795, 2003.

FONSECA, J. R.; MARQUES, E. M. G.; VIEIRA, E. H. N.; SILVA, H. T. Algumas características do germoplasma de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) coletado no Espírito Santo. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 54, p. 358-362, 2007.

FOWLER, Z. L.; KOFFAS, M. A. G. Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 83, p. 799-808, 2009.

FRANCO, M. C.; CASSINI, S. T. A.; OLIVEIRA, V. R.; TSAI, S. M. Caracterização da diversidade genética em feijão por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n. 2, p. 381-385, 2001.

FREITAS, F. O. Evidências genético-arqueológicas sobre a origem do feijão comum no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 41, p. 1199-1203, 2006.

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

GOLDSTEIN, J. I.; NEWBURY, D. E.; ECHLIN, P.; JOY, D. C.; ROMIG, A. D.; LYMAN C. E.; FIORI, C.; LIFSHIN, E. Scanning Electron Microscopy and X-ray microanalysis – A textbook for biologist, materials scientists and geologists. Plenum Press, New York, 1992.

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. **Crop Science**, Madison, v. 45, p. 606-615, 2005.

HAUGHN, G.; CHAUDHURY, A. Genetic analysis of seed coat development in Arabidopsis. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 10, p. 472-477, 2005.

HE, F.; PAN, Q. H.; SHI, Y.; DUAN, C. Q. Biosynthesis and genetic regulation of proanthocyanidins in plants. **Molecules**, Basel, v. 13, p. 2674-2703, 2008.

HÜMMER, W.; SCHREIER, P. Analysis of proanthocyanidins. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 52, p. 1381-1398, 2008.

ISLAM, F. M. A.; RENGIFO, J.; REDDEN, R. J.; BASFORD, K. E.; BEEBE, S. E. Association between seed coat polyphenolics (tannins) and disease resistance in common bean. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 58, p. 285-297, 2003.

JUNK-KNIEVELL, D. C.; VANDENBERG, A.; BETT, K. E. Slow darkening in pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is controlled by a single major gene. **Crop Science**, Madison, v. 48, p. 189-193, 2008.

KANTAR, F. P.; HEBBLETHWAITE, D.; PILBEAM, C. J. Factors influencing disease resistance in high and low tannin *Vicia faba*. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 127, p. 83-88, 1996.

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

KONCZAK, I.; ZHANG, W. Anthocyanins-more than nature's colours. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, New York, v. 5, 239-240, 2004.

LAMPRECHT, H. Beiträge zur Genetik von *Phaseolus vulgaris*. Zur Vererbung der Testafarbe. **Hereditas**, Lund, v. 16, p. 169-211, 1932.

_____. Zur Genetik von *Phaseolus vulgaris*. XVII-XVIII. Zwei neue Gene für Abzeichen auf der Testa, Punc und Mip, sowie über die Wirkung von V und Inh. **Hereditas**, Lund, v. 26, p. 292-304, 1940.

LEAKEY, C. L. A. Genotypic and phenotypic markers in common bean. In: GEPTS, P. (Ed.). **Genetic resources of *Phaseolus* beans**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 245-327.

LEPINIEC, L.; DEBEAUJON, I.; ROUTABOUL, J. M.; BAUDRY, A.; POURCEL, L.; NESI, N.; CABOCHE, M. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. **Annual Review in Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 405-430, 2006.

LI, Y. G.; TANNER, G.; LARKIN, P. The DMACA-HCl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 70, p. 89-101, 1996.

MACIEL, F. L.; ECHEVERRIGARAY, S.; GERALD, L. T. S.; GRAZZIOTIN, F. G. Genetic relationships and diversity among Brazilian cultivars and landraces of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) revealed by AFLP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 50, p. 887-893, 2003.

MCCLEAN, P. E.; LEE, R. K.; OTTO, C.; GEPTS, P.; BASSETT, M. J. Molecular and phenotyping mapping of genes controlling seed coat pattern and color in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **The Journal of Heredity**, Washington, DC, v. 93, n. 2, p. 142-152, 2002.

MAKKAR, H. P. S.; BLUMMEL, M.; BECKER, K. Gravimetric determination of tannins and their correlation with chemical and protein precipitation methods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 61, p. 161-165, 1993.

MILACH, S. C. K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S. C. K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 1998. p. 17-28.

PANG, Y.; PEEL, G. J.; WRIGHT, E.; WANG, Z.; DIXON, R. A. Early steps in proanthocyanidin biosynthesis in the model legume *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 145, p. 601-615, 2007.

PORCH, T. G. List of genes – *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Prosser, WA, v. 53, p. 1-27, 2010.

PRAKKEN, R. Inheritance of colours in *Phaseolus vulgaris* L. III. On genes for red seed coat colour and a general synthesis. **Mededelingen van de Landbouwhogeschool**, Wageningen, v. 29, p. 1-82, 1972.

PORTER, L. J.; HRSTICH, L. N.; CHAN, B. G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, Oxford, v. 25, p. 223–230, 1986.

RIDOUT, C. J.; DONINI, P. Use of AFLP in cereals research. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 4, p. 76-79, 1999.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, Oxford, v. 30, p. 3875-3883, 1991.

SCHREIBER, F. Zur Genetik der weissen Samenfarbe bei *Phaseolus vulgaris*. **Der Züchter**, Berlin, v. 6, p. 53-61, 1934.

SCHUURMANS, J.; VAN DONGEN, J. T.; RUTJENS, B. P. W.; BOONMAN, A.; PIETERSE, C. M. J.; BORSTLAP, A. C. Members of the aquaporin family in the developing pea seed coat include representatives of the PIP, TIP, and NIP subfamilies. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 53, p. 655-667, 2003.

SINGH, S. P.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, New York, v. 45, p. 379–396, 1991.

SOUZA, F. H. D.; MARCOS-FILHO, J. The seed coat as a modulator of seed-environmental relationships in Fabaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 365-375, 2001.

STANLEY, D. W. A possible role for condensed tannins in bean hardening. **Food Research International**, Essex, v. 25, p. 187-192, 1992.

TAKEOKA, G. R.; DAO, L. T.; FULL, G. H.; WONG, R. Y.; HARDEN, L. A.; EDWARDS, R. H.; BERRIOS, J. J. Characterization of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, p. 3395-3400, 1997.

TANNER, G.; FRANCKI, K. T.; ABRAHAMS, S.; WATSON, J. M.; LARKIN, P. J.; ASHTON, A. R. Proanthocyanidin biosynthesis in plants. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 34, p. 31647-31656, 2003.

TERRILL, T. H.; ROWAN, A. M.; DOUGLAS, G. B.; BARRY, T. N. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 58, p. 321–329, 1992.

THORNE, J. H. Morphology and ultrastructure of maternal seed tissues of soybean in relation to the import of photosynthate. **Plant Physiology**, Rockville, v. 67, p. 1016-1025, 1981.

VIEIRA, C.; BORÉM A.; RAMALHO, M. A. P.; CARNEIRO, J. E. S. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 2005. p. 273-349.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v. 21, p. 4407-4414, 1995.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, p. 485-493, 2001.

3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, BIOQUÍMICA E MORFOLÓGICA DE VARIEDADES DE FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) CONTRASTANTES PARA BRILHO DO TEGUMENTO

RESUMO

O brilho do tegumento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma característica expressada devidos aos genes *Asp* e *J*. No presente estudo foram analisadas variedades crioulas – Serro Azul Brilhante (SAB - tegumento brilhante) e Fosco (SAF – opaco) e Puebla-152 (P-152 – brilhante) – e uma cultivar, Diamante Negro (DN – tegumento opaco), contrastantes para brilho do tegumento. Foram realizados os cruzamentos SAF x SAB e P-152 x DN e estes foram avançados até F_{3.4}. Os objetivos foram genotipar as variedades para os genes *Asp* e *J*, considerando características específicas condicionadas pelos genes. Desse modo, também foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), análises de absorção de água pelas sementes e determinações de fenois totais, taninos totais e taninos condensados. Além disso, foram realizadas medidas através de um colorímetro, utilizando sistema de cores L*a*b*, visando diferir sementes brilhantes de opacas. Os resultados mostraram que os valores de L* (luminosidade) foram maiores em progênies F_{2.3} e F_{3.4} com tegumento brilhante. No entanto, foram observados vários desvios, indicando o método para validar categorias de sementes ou para genotipagem da coloração do tegumento. As análises indicaram que os parentais SAB e P-152 apresentam genótipo *J Asp*, pois o tegumento é brilhante. Contrariamente, SAF e DN carregam os alelos *J asp*, pois apresentam tegumento opaco, com superfície rugosa (análise de MEV) e menor comprimento do epiderme paliçádico em relação aos genótipos brilhantes (também por MEV), características descritas para o alelo *asp*. *J* é essencial para a produção de taninos condensados e todas as variedades apresentaram elevadas concentrações desses compostos, confirmando o genótipo que foi definido. SAF apresentou maior porcentagem de absorção de água do que as demais variedades, indicando que *asp* pode estar relacionado a esta propriedade. Os resultados desse trabalho apresentam importantes implicações para o melhoramento genético do feijoeiro, aspectos discutidos no decorrer do capítulo.

Palavras-chave: Brilho. *Asp*. *J*. Pró-antocianidinas. Parênquima paliçádico. Colorímetro.

ABSTRACT

Seed coat shininess of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a characteristic expressed due to the *Asp* and *J* genes. We evaluated landraces – Shiny Serro Azul (SAB – shiny seed coat), Dull Serro Azul (SAF – dull seed coat) and Puebla-152 (shiny) – and a cultivar – Diamante Negro (DN – dull seed coat) – contrasting for seed coat shininess. We made the crosses SAF x SAB and P-152 x DN and advanced to F_{3:4} generation. We aimed to genotype the varieties for the *Asp* and *J* genes, considering the different characteristics conditioned by them. Therefore, we performed analyses of scanning electron microscopy, seeds water uptake and determinations of total phenolics, total tannins and condensed tannins. Moreover, we took measures from a colorimeter, using color system L*a*b*, aiming to differentiate shiny seed coat from dull ones. Results showed that values of luminosity (L*) were higher in F_{2:3} and F_{3:4} progenies with shiny seed coat when compared to dull ones. However, we observed samples with deviations to this pattern, indicating the method for categorization and color genotyping. Analyses indicated that varieties SAB and P-152 presented genotype *J Asp*, given the shiny seed coat. On the opposite, SAF and DN carry the alleles *J asp*, because seed coat is dull, with rough textured surface, and lower length of palisade epidermis, in comparison to the shiny genotypes, characteristics described for the allele *asp*. *J* is indicated to be essential for proanthocyanidin production and all varieties present high concentrations of condensed tannins, confirming the inferred genotype. SAF presented higher water uptake than the others, indicating that *asp* may be related to this characteristic. Results of the present study present important implications for common bean breeding, issues discussed on this chapter.

Key-words: Shininess. *Asp*. *J*. Pro-anthocyanidins. Palisade epidermis. Colorimeter.

3.1 Introdução

Os consumidores de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) identificam sua classe comercial de interesse, em parte, considerando a cor e seu padrão de distribuição no tegumento. Por essa razão, cabe aos melhoristas manter as características do genótipo de cada cultivar comercial. Nesse aspecto, o conhecimento sobre a genética do tegumento do feijoeiro é fundamental para guiar as estratégias de seleção de genótipos. Isso se justifica especialmente quando se trabalha com populações segregantes oriundas de cruzamentos entre uma classe comercial com outra que contribua com alelos de interesse (BASSETT, 2007).

Sob outro enfoque, os pesquisadores analisam a cor do tegumento como uma oportunidade de codificar os genes responsáveis e determinar suas funções bioquímicas (HOSFIELD, 2000). Os estudos que vêm sendo realizados mostraram que os genes que se expressam no tegumento estão envolvidos fundamentalmente em processos bioquímicos associados à via dos fenilpropanoides. A expressão dos genes se reflete nas propriedades nutricionais e no aspecto visual dos grãos e, desse modo, na sua aceitação no mercado.

Uma das características observadas pelo consumidor de feijão é o brilho do tegumento. No Brasil, normalmente, sementes com tegumento brilhante são rejeitadas pelo consumidor, pois o cozimento é dificultado, sendo necessário maior período de tempo em relação a grãos que apresentam tegumento opaco.

Apesar desta desvantagem, o brilho pode representar grande relevância para a semente. O tegumento é a estrutura que fornece proteção à semente de fatores bióticos (patógenos, pragas) e abióticos (variações de luz, temperatura e umidade), seja em condições naturais ou durante o armazenamento dos grãos. É provável que o brilho do tegumento aumente a resistência a esses fatores.

Em uma perspectiva histórica, extensas análises genéticas conduziram à identificação de genes que controlam diferentes padrões (*T, Z, L, J, Bip* e *Ana*) e cores (*P, C, R, J, D, G, B, V* e *Rk*) do tegumento. No entanto, muitos pesquisadores apresentaram resultados divergentes, devido à variabilidade e complexidade de genes do tegumento (HOSFIELD, 2000; BASSETT; McCLEAN, 2000). Os problemas se estenderam inclusive à atribuição de

símbolos aos genes, sendo muitas vezes empregado mais de um ao mesmo loco. Muitos desses genes exibem interações epistáticas (McCLEAN et al., 2002), dificultando sua análise separadamente.

Dentre os genes que se expressam no tegumento, dois foram associados à característica do brilho, *Asper* (*Asp*) e *Joker* (*J*). Genótipos *asp asp* apresentam tegumento opaco e genótipos *Asp_* tegumento brilhante (BASSETT, 1996). *Asp* não está relacionado à cor do tegumento, pois controla apenas o brilho (BASSETT, 1996). Esse gene foi ignorado desde a sua publicação original (LAMPRECHT, 1940), pois *J* era considerado o gene responsável pela característica do brilho (LAMPRECHT, 1932; 1940). No período, também era usado o símbolo *Sh*, sendo este equivalente a *J* (LAMPRECHT, 1960).

Para esclarecer esta confusão, Bassett (1996), em seus extensivos estudos com o tegumento de feijoeiro, deixou claros os diferentes papéis de *Asp* e *J*. O alelo *asp* produz um tegumento mais opaco do que *j*, e *asp* é mais frequente em cultivares do que *j*. Além disso, o único efeito visível de *asp* é o tegumento opaco, enquanto que *j* afeta não somente o brilho, mas também o padrão de coloração do tegumento. O principal efeito de *j* consiste em produzir uma coloração desuniforme ao longo do tegumento, o contrário do esperado na presença de *J*. Quando o genótipo é *jj*, a região da corona, ao redor do hilo, é usualmente descolorida e o tegumento apresenta brilho menos intenso (BASSETT, 1996).

A elucidação das diferenças entre os dois genes ficou mais clara através do seu mapeamento genético e, parcialmente, através da caracterização de seus efeitos bioquímicos. *Asp* encontra-se mapeado no grupo de ligação 7 (B7) no feijoeiro (FREYRE et al., 1998; MIKLAS et al., 2000; PÉREZ-VEGA et al., 2010), no entanto, apenas como marcador fenotípico. *J* está localizado no grupo de ligação 10 (B10) no mapa genético do feijoeiro (FREYRE et al., 1998). Ressalta-se que foi encontrado um marcador RAPD ligado a *j*, e este convertido a um STS (*Sequence Tag Site*) para o loco (BASSETT et al., 2002; McCLEAN et al., 2002).

Aspectos bioquímicos sobre os genes têm sido elucidados com maior clareza para *J*. O alelo dominante *J* indica ser essencial para a produção de pró-antocianidinas ou taninos condensados (LEAKEY, 1988; HOSFIELD, 2000). Pró-antocianidinas constituem oligômeros ou polímeros oriundos da condensação de unidades de flavan-3-ols, como catequinas e

epicatequinas (XIE; DIXON, 2005; HE et al., 2008; HÜMMER; SCHREIER, 2008). No feijoeiro, acredita-se que o alelo *J* esteja envolvido na conversão de dihidroflavonol para leucocianidina através da enzima Dihidroflavonol redutase (HOSFIELD, 2000), levando, posteriormente, à formação de pró-antocianidinas. Contrariamente, Beninger, Hosfield e Nair (1998) e Beninger e Hosfield (1999) mostraram que em genótipos *jj* não são produzidas pró-antocianidinas. Desse modo, caracterizar variedades quanto ao brilho do tegumento, genotipando para o gene *J* é importante, pois pode ajudar a guiar a seleção de variedades que apresentam ou não taninos condensados.

Asp, descrito por causar uma mudança estrutural na epiderme palissádica, não possui efeito bioquímico conhecido. Por sua expressão morfológica, na forma recessiva *asp*, a espessura do parênquima paliçádico indica ser menor e relação a genótipos *Asp*. Além disso, foi observada maior rugosidade nas extremidades do parênquima paliçádico de sementes opacas (*asp*) em relação às brilhantes (*Asp*) (BENINGER et al., 2000). A elucidação do papel bioquímico desse gene e suas interações metabólicas são preponderantes para entender porque as variedades apresentam tegumento brilhante ou opaco.

Considerando a importância desses genes, é oportuno estender esses estudos a outras variedades de feijoeiro, como as cultivadas no Brasil. Nesse sentido, também é relevante considerar variedades que são tradicionalmente cultivadas por pequenos produtores e também cultivares de escala comercial nacional. Desse modo, no presente estudo foram caracterizados do ponto de vista fenotípico, morfológico e bioquímico duas variedades crioulas: (i) Serro Azul (região de Cunha, São Paulo), podendo ser de tegumento brilhante (Serro Azul Brilhante) ou opaco (Serro Azul Fosco); (ii) Puebla-152 (origem mexicana), de tegumento brilhante. Além disso, foi estudada a cultivar Diamante Negro (CNPAF/EMBRAPA), de tegumento opaco.

O objetivo das análises foi genotipar as variedades para os genes *Asp* e *J*, considerando as diferentes características condicionadas por cada um dos genes. Desse modo, foram realizadas análises visuais e quantitativas do brilho do tegumento, visando verificar se é possível diferir sementes brilhantes de opacas através de sistema de medição de cores ($L^*a^*b^*$), por meio de um colorímetro. Além disso, foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia ótica (MO), assim como determinações de

fenois e taninos em amostras de cada variedade por métodos espectrofotométricos, para caracterizar morfológica e bioquimicamente as diferenças entre sementes brilhantes e opacas.

O estudo baseou-se na hipótese de que *Asp* varia entre as variedades, sendo que as de tegumento brilhante carregam *Asp* e as de tegumento opaco *asp*, e de que *J* não é encontrado na forma recessiva nas mesmas. Desse modo, é provável que *J* não segregue em populações derivadas do cruzamento entre os parentais contrastantes para o brilho, detectando-se taninos condensados em todos os parentais e nas populações segregantes.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Variedades analisadas

Neste estudo foram caracterizadas duas variedades crioulas e uma cultivar melhorada. A variedade crioula Serro Azul é tradicionalmente cultivada por pequenos produtores rurais da região do município de Cunha, São Paulo, sob baixas condições de tecnificação, no entanto, constitui a fonte de alimento e renda local. Trabalhos têm mostrado que a variedade apresenta baixa produtividade e nodulação nas condições de fertilidade do solo da região de Cunha, mas que pode ser consideravelmente aumentada, sob condições ótimas de fertilização (OLIVEIRA et al., 1998; OLIVEIRA; TSAI, 2001). Esta variedade apresenta dois principais tipos de sementes: (i) com tegumento brilhante (Serro Azul Brilhante – SAB); e (ii) com tegumento opaco (Serro Azul Fosco – SAF).

Por ocasião da coleta de um lote de dois quilogramas de sementes de Serro Azul Fosco, foram encontradas, em meio ao lote, 10 sementes que apresentavam tegumento brilhante. Essas sementes foram cruzadas com as de tegumento opaco (genitor feminino), originando sementes F_1 .

Algumas análises sugeriram que SAB apresenta maior capacidade de nodulação em relação à SAF (OLIVEIRA et al., 1998). Além disso, SAB indica apresentar alta resistência à antracnose, enquanto que SAF é altamente suscetível às raças 65 e 73 desse patógeno (dados

não publicados). Essas características e a importância local que assume a variedade justificam a sua escolha para análises de segregação do brilho, para posteriores associações com caracteres de importância agrônoma.

Além disso, foi analisada a variedade Puebla-152 (P-152), de origem mexicana, do grupo mesoamericano. Esta variedade apresenta tegumento preto e brilhante e originalmente foi selecionada em função de sua alta capacidade de fixação de nitrogênio. Além disso, apresenta potencial resistência à podridão de raiz (NAVARRO; SASS; NIENHUIS, 2008; 2009). Puebla-152 foi contrastada com a cultivar Diamante Negro (DN), mesoamericana, também do grupo comercial preto, mas com tegumento opaco.

A cultivar DN é originária do cruzamento das linhagens XAN 87 x AS 367, realizado no Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), na Colômbia. A seleção foi realizada no Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP/EMBRAPA), sob condições de inoculação artificial em campo, com o agente do crestamento bacteriano comum. Constituiu de uma geração de seleção massal em F_3 e por *pedigree*, de F_4 a F_6 , obtendo-se a linhagem CB 7201160 (CNF 5923). Foi lançada como cultivar em 1991. DN apresenta alta produtividade, sendo resistente a doenças como o crestamento bacteriano comum e o vírus do mosaico, além de ser moderadamente resistente a algumas raças da antracnose (EMBRAPA, 2010).

Dois parentais, P-152 e DN-6, da coleção de germoplasma de feijoeiro do CENA/USP, foram cruzados, gerando a F_1 .

3.2.2 Multiplicação dos cruzamentos

Após o cruzamento entre os parentais SAF (genitor feminino) e SAB (genitor masculino), e também o recíproco, a F_1 resultante foi avançada para F_2 em casa de vegetação, no ano de 1999. Os dois cruzamentos foram multiplicados, gerando originalmente 121 (cruzamento 1) e 163 (cruzamento 2) progênies $F_{2;3}$. Uma amostra de dez sementes de cada família foi avançada para a geração $F_{3;4}$, em 2009, durante a estação seca (entre abril e julho), em propriedade de hortifrutigranjeiros, situada no Bairro Campestre, Piracicaba, SP (Figura

3.1). As sementes foram coletadas de cinco plantas individuais representantes de cada progênie, sendo retirada uma amostra de cerca de seis vagens por planta. As vagens foram postas à secagem em casa de vegetação durante cerca de uma semana. Após o processamento, as sementes foram armazenadas em câmara fria ($8^{\circ}\text{C} \pm 3$), até o momento das análises.



Figura 3.1 – Visualização de área experimental (Piracicaba, SP), com a multiplicação (A) de populações oriundas dos cruzamentos entre as variedades de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) SAF x SAB ($F_{3;4}$) e P-152 x DN ($F_{3;4}$), para avaliação da segregação do brilho do tegumento; e (B) multiplicação de parentais e F_1 dos cruzamentos entre SAF x SAB

Do cruzamento entre P-152 (genitor feminino) e DN (genitor masculino), foram obtidas 75 progênies $F_{2;3}$ segregantes para a característica do brilho, em 1996, em casa de vegetação. Em 2010, a população foi avançada para $F_{3;4}$, da mesma maneira que a do cruzamento SAF x SAB, na estação seca, no mesmo local.

3.2.3 Análise genotípica das variedades para os genes Asper e Joker

Análises visuais foram realizadas visando inferir os genótipos dos parentais para os genes *Asp* e *J*, considerando os aspectos característicos de cada um dos locos. As variedades foram comparadas com genótipos provenientes de Mark J. Bassett (Tabela 3.1), que desenvolveu extensas análises genéticas de genes do tegumento do feijoeiro, desenvolvendo

um protocolo teste para a determinação desses genótipos (BASSETT, 1998a). Os genótipos foram desenvolvidos a partir de cruzamentos com a linhagem selvagem 5-593, que apresenta a maioria dos alelos na forma homocigota dominante (genótipo *Stp T Z l⁺ Bip [Cr] D J G B V Rk Asp*) (BASSETT, 1998b; 2003). Desse modo, cada genótipo apresenta um ou mais genes em que o alelo dominante foi substituído pelo recessivo. O nome de cada genótipo, portanto, é dado pelo alelo que foi substituído, a partir de retrocruzamento (até a terceira geração - BC₃) com 5-593. Por exemplo, em *asp* BC₃ 5-593 foi apenas substituído o alelo *Asp* por *asp*, conservando os demais locos do tegumento.

Tabela 3.1 – *Testers* para definição de genótipos do tegumento em *Phaseolus vulgaris* L. As denominações de cada estoque referem-se apenas aos alelos que foram substituídos pela sua forma recessiva em relação à linhagem 5-593. Na listagem, os genótipos para *J* e *Asp*, relacionados ao brilho do tegumento, encontram-se sublinhados

Parental	Nome do estoque	Genótipo	Referência
P ₁ *	5-593	<i>Stp T Z l⁺ Bip P [C r] D <u>J</u> G B V Rk <u>Asp</u></i>	Bassett (1998)
P ₂	<i>j</i> BC ₃ 5-593	<i>P C D <u>j</u> G B V <u>Asp</u></i>	Bassett (1996)
P ₃	<i>c^u</i> <i>j</i> BC ₃ 5-593	<i>P c^u D <u>j</u> G B V <u>Asp</u></i>	Bassett (1992)
P ₄	<i>c^u</i> BC ₃ 5-593	<i>P c^u D <u>J</u> G B V <u>Asp</u></i>	Bassett (1992)
P ₅	<i>p</i> BC ₃ 5-593	<i>p C D <u>J</u> G B V <u>Asp</u></i>	Bassett (1992)
P ₆	<i>v</i> BC ₃ 5-593	<i>P C D <u>J</u> G B v <u>Asp</u></i>	Bassett (1992)
P ₇	<i>j v</i> BC ₃ 5-593	<i>P C D <u>j</u> G B v <u>Asp</u></i>	Bassett (1992)
P ₈	<i>d j v</i> BC ₃ 5-593	<i>P C d <u>j</u> G B v <u>Asp</u></i>	Bassett (1992)
P ₉	<i>asp</i> BC ₃ 5-593	<i>P C D <u>J</u> G B V <u>asp</u></i>	Bassett (1996)

* 5-593 constituiu o parental recorrente para o desenvolvimento dos *testers*, apresentando a maioria dos locos na forma homocigota dominante, com mais locos caracterizado em relação aos demais genótipos.

3.2.4 Análise visual da intensidade de brilho do tegumento

Para a análise e classificação do brilho das sementes, foram observadas as recomendações do CIAT (1976), que classifica as sementes em brilhantes, intermediárias e opacas. No entanto, para análises de segregação dentro dos cruzamentos realizados, as sementes foram apenas classificadas como brilhantes ou opacas, visto que tal classificação pode variar visualmente em função da interação genótipo-ambiente, levando a interpretações errôneas. Os parentais e as linhagens em cada geração de auto-fecundação foram avaliados visualmente em placas de Petri dispostas sobre papel branco.

3.2.5 Método espectrofotométrico (colorímetro) para análise do brilho do tegumento

No presente trabalho foi proposto um método para diferenciar quantitativamente sementes brilhantes e opacas, utilizando medidas espectrofotométricas, obtidas através de um colorímetro. Amostras de sementes dos parentais e de famílias $F_{2:3}$ e $F_{3:4}$ oriundas dos cruzamentos entre os mesmos (SAF x SAB; P-152 x DN) foram analisadas em colorímetro Minolta Chroma Meter CR-300, visando obter uma medida quantitativa do brilho das sementes, obtendo-se os valores de três variáveis: L^* , a^* e b^* (Figura 3.2).

A *Comission Internationale de L'Eclairage* (CIE) recomendou o uso do sistema de medição de cores $L^*a^*b^*$, pois este é similar ao que as células ganglionares do olho humano visualizam: (i) a quantidade de verde ou vermelho; (ii) a quantidade de azul ou amarelo; e (iii) a quantidade de luminosidade. O sistema $L^*a^*b^*$ utiliza três eixos para descrever a cor: os valores de L^* estão no eixo z, sendo que o valor 100 consiste o perfeitamente branco e o valor 0 o perfeitamente preto; os valores de a^* estão no eixo x, sendo os valores positivos mais vermelhos e os negativos mais verdes; os valores de b^* estão no eixo y, com valores positivos mais amarelos e negativos mais azuis. Nesse sistema, o valor de L^* indica a luminosidade, de modo que quanto mais próximo de 100, mais brilhante é considerada a amostra.



Figura 3.2 - Colorímetro Minolta Chroma Meter Cr-300 e sistema de medida $L^*a^*b^*$ (*Comission Internationale de L'Eclairage* - CIE), por meio do qual foram realizadas as medidas

Amostras de cerca de 30 a 40 sementes foram colocadas dentro de pequena placa opaca circular com superfície aproximada de 13 cm², cobrindo todo o fundo da placa. Foram tomadas quatro medidas de cada amostra e determinadas as médias e os desvios entre as medidas.

As famílias segregantes do cruzamento entre SAB e SAF não variaram apenas para o brilho, mas também para a cor. Assim, foram enquadradas visualmente em quatro classes: Serro Azul com tonalidades Marrom Brilhante (MB), Marrom Fosco (MF), Cinza Brilhante (CB) e Cinza Fosco (CF). De cada uma das classes, foram selecionadas aleatoriamente seis progênies F_{2:3}, constituindo seis repetições. Do cruzamento entre Puebla e Diamante Negro, foram tomadas seis famílias F_{2:3} enquadradas nos fenótipos preto brilhante (PB) e também seis de fenótipo preto opaco (PO) para as medidas.

3.2.6 Análise de tegumentos por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Sementes de feijoeiro representativas de cada uma das variedades (SAB, SAF, P-152 e DN), além de três controles, a linhagem 5-593 e os *testers j* BC₃- 5-593 e *asp* BC₃- 5-593, foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Cada uma das variedades foi multiplicada em campo na estação seca de 2010 (abril a julho) e, depois de colhidas, foram secas ao ar e armazenadas em câmara fria (8°C ±3) até o momento da análise. Foram analisadas cinco sementes para cada variedade. Cada semente foi seccionada com uma lâmina e fixada em um suporte metálico (*stub*), sendo posteriormente coberta com ouro por 260 segundos. A análise da superfície e de cortes transversais dos tegumentos foi realizada em microscópio eletrônico de varredura LE0435 VP ZEISS, com aceleração de 20 kV. Os procedimentos de preparação das amostras foram realizados no Laboratório de Histologia a Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas do CENA/USP e as análises microscópicas no NAP/MEPA (ESALQ/USP).

Em cada semente analisada, foram selecionados dois campos aleatórios de visualização, localizados na parte oposta ao hilo da semente, e realizadas 10 medidas em cada campo, calculando-se a média para a amostra. As medidas foram realizadas utilizando o

software Image J 1.44p. As medidas obtidas no programa foram convertidas ao sistema métrico com base na barra escalar de cada fotografia. As conversões foram realizadas no programa Microsoft Excel versão 2007.

3.2.7 Descritores do tamanho das sementes e absorção de água

Para cada uma das variedades (SAB, SAF, DN e P-152, focadas neste estudo), foram realizadas as medidas das seguintes variáveis do tamanho das sementes: comprimento da semente (mm), espessura da semente (mm), largura das sementes (mm) e peso de 100 sementes.

Outra variável avaliada foi a absorção de água pelas sementes. Os procedimentos foram realizados de acordo com Bushey; Hosfield; Beninger (2000), com adaptações. Amostras de 12 sementes de cada variedade (SAB, SAF, P-152 e DN), com três repetições, foram pesadas em balança de precisão e imersas em 20 mL de água destilada com 50 ppm de CaCl_2 , em recipientes plásticos. As amostras foram mantidas à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ durante cinco horas. A cada 30 minutos as sementes foram retiradas da solução, secas rapidamente com papel e pesadas. A absorção de água foi expressa pelo grau de umidade (%) das sementes em cada um dos tempos. O experimento foi repetido duas vezes para verificar se os resultados seriam semelhantes.

3.2.8 Caracterização de compostos fenólicos dos tegumentos das variedades

3.2.8.1 Extração de tegumentos e compostos fenólicos

Para as determinações de compostos fenólicos, foi utilizada uma amostra de 50 sementes de cada parental (SAB, SAF, P-152 e DN) e dois controles (5-593 e *j* BC₃ 5-593), todos em triplicata. As amostras foram imersas em n-heptano puro durante 96 horas e, logo após, rapidamente hidratadas (cerca de uma hora). Após o tratamento das sementes, os

tegumentos foram removidos manualmente com o auxílio de uma pinça e dispostos em placas de Petri. Em seguida, as amostras foram postas à secagem em estufa (40°C), até peso constante (cerca de 48 horas). Finalmente, as amostras foram trituradas e maceradas em almofariz, para proceder com as determinações químicas (Figura 3.3.).



Figura 3.3 – Procedimentos para a extração do tegumento de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)

3.2.8.2 Extração de compostos fenólicos

Para a extração de compostos fenólicos, foram adicionados 10 mL de solução de acetona 70% a 200 mg de amostra finamente macerada, em tubos de ensaio. As amostras foram colocadas em sonicador durante 20 minutos para agitação e homogeneização e, posteriormente, centrifugadas a 3000 g por 10 minutos, 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e colocado em outro tubo de ensaio, para proceder com as determinações.

3.2.8.3 Determinação de fenois totais e taninos totais

Para a determinação de fenois totais e taninos totais, foram seguidos os procedimentos de Makkar et al. (1993), com modificações, utilizando espectrofotometria. Como referência para as análises, foi confeccionada uma curva padrão com ácido tânico, utilizando reagente de Folin e carbonato de sódio para as leituras no espectrofotômetro (Figura 3.4).

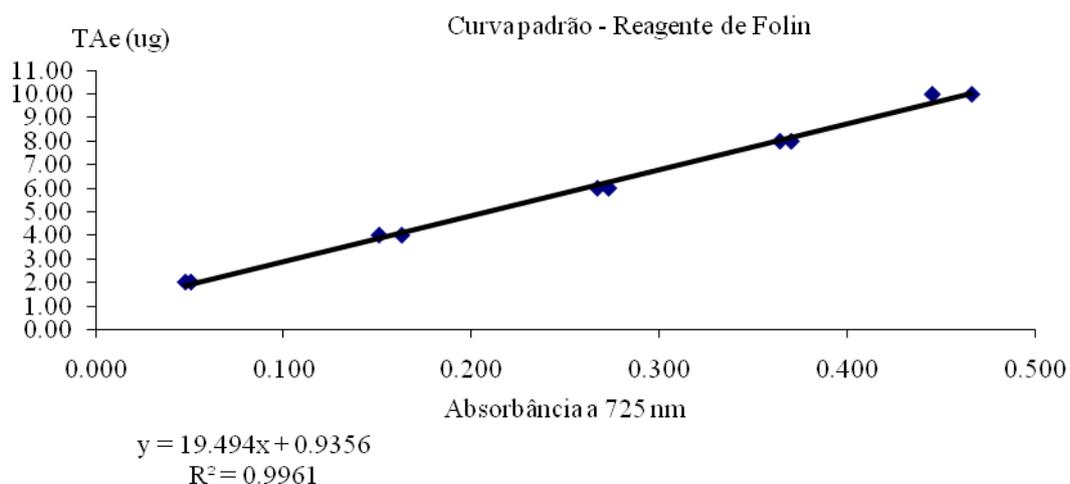


Figura 3.4 – Curva padrão com ácido tânico e reagente de Folin, para determinações de fenois totais e taninos totais

Os extratos de cada amostra foram diluídos nas proporções adequadas e preparados para as determinações, utilizando tubos de ensaio. Para fenois totais, a 50 µL do extrato previamente diluído foram adicionados 450 µL de água destilada. A esse volume foram adicionados 250 µL de reagente de Folin diluído com água (1:1). Após agitação dos tubos, foi acrescentado o volume de 1,25 mL de carbonato de sódio 20%, também sendo agitado. Depois de 40 minutos foram realizadas as leituras em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 725 nm. Os valores finais foram calculados como equivalentes de ácido tânico por kg de matéria seca.

Para taninos totais, foram preparados tubos de ensaio contendo 100 mg de PVPP, 1 mL de água destilada e 1 mL de extrato devidamente diluído. As amostras foram agitadas e colocadas em geladeira (4°C) por 15 minutos. Consecutivamente, os tubos foram novamente agitados e centrifugados a 1.900 rpm, à 4°C, por dez minutos. Posteriormente, 100 µL do

sobrenadante (fração sem taninos, pois os mesmos foram ligados ao PVPP) foram transferidos para outro tubo, completando-se o volume a 500 μ L com água destilada. Finalmente, foram adicionados o reagente de Folin e o carbonato de sódio, nas mesmas condições e quantidades que para fenóis totais. As leituras também foram realizadas após 40 minutos, a 725 nm, para a determinação dos não taninos.

Para determinar os taninos totais, as quantidades de não taninos foram subtraídas dos fenóis totais, sendo também expressos, portanto, em equivalentes de ácido tânico por kg de matéria seca.

3.2.8.4 Determinação de taninos condensados

A extração dos compostos fenólicos foi procedida da mesma maneira que para fenóis totais e taninos totais. As determinações seguiram a metodologia proposta por Porter, Hrstich e Chan (1986), com adaptações. A 500 μ L de extrato foram adicionados 3 mL de butanol-HCl (95:5) e, em seguida, 100 μ L de reagente férrico (ferro sulfato de amônio 2% em HCl 2N). As amostras foram aquecidas em banho-maria à 100°C, durante uma hora. Logo após, os tubos foram resfriados em água corrente. As amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro, a 550 nm. Os taninos condensados foram expressos como equivalentes-grama de leucocianidina por kg de matéria seca, através da fórmula: (leitura x 78,26 x fator de diluição) / % MS.

3.2.8.5 Teste histoquímico para taninos condensados

Três sementes de cada um dos parentais foram seccionadas e imediatamente colocadas sobre lâminas e coradas com solução de Vanilina 10% em um (1) volume de etanol misturado com um (1) volume de HCl concentrado (37%). As lâminas foram visualizadas em microscópio ótico.

3.2.9 Análises estatísticas

Os dados gerados pelo colorímetro (medidas de L^* , a^* e b^*) foram analisados através do teste de Shapiro-Wilk ($P < 0.05$), no programa Statistix, para verificar se apresentavam distribuição normal. Gráficos de distribuição de frequências foram gerados no programa Microsoft Excel 2007. Posteriormente, as medidas de $L^*a^*b^*$ das progênies $F_{2:3}$ e $F_{3:4}$ foram avaliadas pelo teste F ($P < 0,05$) através de análise de variância (ANAVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), utilizando o aplicativo PAST.

As três variáveis ($L^*a^*b^*$) foram avaliadas através de Análise de Componentes Principais (PCA), visando verificar se as amostras de tegumento brilhante apresentavam-se separadas das de tegumento opaco. A análise foi realizada utilizando o programa Canoco 4.5 e os gráficos *biplot* foram gerados utilizando o CanoDraw.

Para verificar a interação entre os fatores brilho e cor nas medidas realizadas, foi realizada ANAVA em delineamento bifatorial com teste F ($P < 0,05$). As médias foram comparadas por teste de Tukey ($P < 0.05$).

As diferenças entre o tamanho das sementes e a absorção de água, as quantidades de fenois totais, taninos totais e condensados, e as medidas do comprimento das células do parênquima paliçádico foram avaliadas pelo teste F ($P < 0.05$) através da ANAVA e as médias foram comparadas por teste de Tukey ($P < 0.05$). As análises foram realizadas no STATISTIX e no PAST.

3.3 Resultados

3.3.1 Genotipagem das variedades

A análise comparativa com os padrões observados e definidos nos genótipos de Bassett (1992) permitiu inferir os genótipos dos parentais (para os genes *J* e *Asp*) utilizados nos cruzamentos. As variedades SAB e P-152 apresentam o genótipo *J Asp* (tegumento brilhante), enquanto que SAF e DN são *J asp* (tegumento opaco). Desse modo, as populações constituídas a partir dos cruzamentos entre SAF x SAB e P-152 x DN não segregaram para *J*. Na Figura 3.5 são apresentados os perfis de cada parental em comparação com os *testers* utilizados como controles.

3.3.2 Análise visual e quantitativa do brilho do tegumento

Pela análise visual das sementes, foram constituídas categorias de cores e de brilho do tegumento para cada um dos parentais e progênies $F_{2:3}$ e $F_{3:4}$ avaliadas. O tegumento do parental P-152 foi classificado como preto e brilhante, enquanto que para DN, o tegumento foi designado como preto e opaco. Os parentais SAB e SAF apresentam cores diferentes, tendo sido classificados: SAB - tegumento marrom e brilhante; SAF - tegumento acinzentado e opaco.

Devido às características dos parentais, todas as famílias $F_{2:3}$ e $F_{3:4}$ do cruzamento entre P-152 e DN apresentaram tegumento preto, variando apenas para o caractere brilho, sendo brilhantes ou opacas. No entanto, as famílias $F_{2:3}$ e $F_{3:4}$ de SAF x SAB variaram de marrom a cinza, combinadas com a presença ou ausência de brilho. Algumas famílias dentro dos dois cruzamentos apresentaram brilho mais intenso. Também foram visualizadas progênies com sementes de brilho intermediário, no entanto, essa variação não foi avaliada.

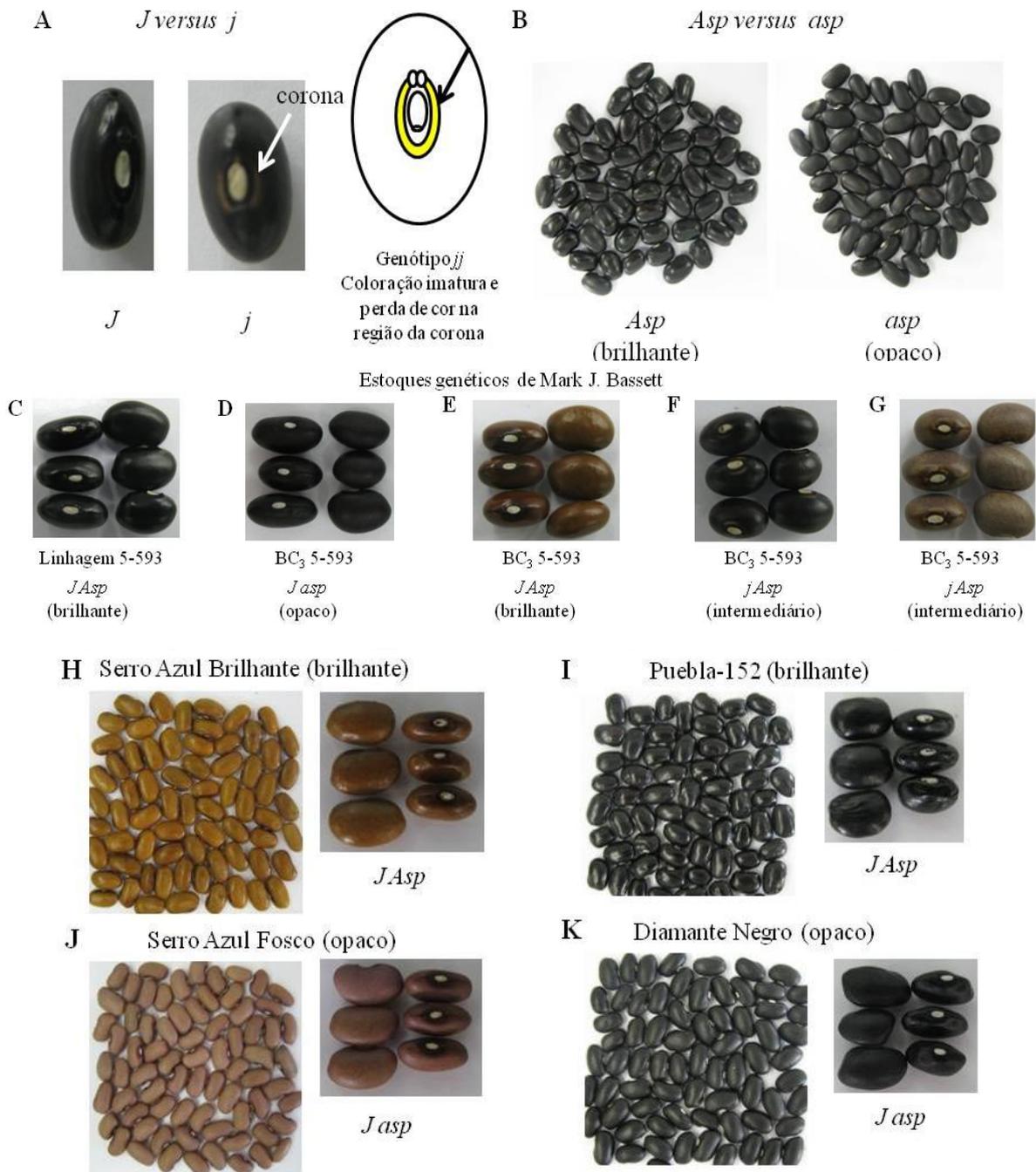


Figura 3.5 - Perfil do tegumento e da região do hilo e corona de *testers* (Mark J. Bassett) para os genes *Asper* (*Asp*) e *Joker* (*J*) e das variedades Serro Azul Brilhante (SAB), Serro Azul Fosco (SAF), Puebla-152 (P-152) e Diamante Negro (DN). Genótipos: (A) diferença entre *J* e *j*; (B) Diferença entre *Asp* e *asp*; (C) linhagem 5-593; (D) genótipo *J asp*; (E) genótipo *J Asp*; (F) e (G) com genótipo *j Asp*. Parentais amostrados: (H) e (I) com tegumento brilhante e genótipo *J Asp*; e (J) e (K) com tegumento opaco e genótipo *J asp*

As análises quantitativas do brilho do tegumento (colorímetro) dos parentais e famílias $F_{2;3}$ e $F_{3;4}$, derivadas dos cruzamentos, permitiram diferenciar sementes brilhantes de opacas. Primeiramente, análises da distribuição estatística dos dados mostraram que as variáveis L^* , a^* e b^* se comportaram diferencialmente nas populações avaliadas. Apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) apenas as variáveis L^* e a^* , tanto nas amostras do cruzamento SAF x SAB (L^* : $p = 0,68$; a^* : $p = 0,69$; b^* : $p = 0,00$), quanto nas do cruzamento P-152 x DN (L^* : $p = 0,09$; a^* : $p = 0,50$; b^* : $p = 0,00$). A análise de distribuição estatística é apresentada graficamente nos Anexos C e D, sendo os valores de $L^*a^*b^*$ de cada progênie de ambos os cruzamentos apresentados nos Anexos A e B.

Dentre as medidas L^* , a^* e b^* , a medida de L^* diferenciou as variedades e progênies. As medidas de a^* e b^* diferiram as cores do tegumento. Considerando os parentais, as medidas de a^* e b^* diferiram entre SAB ($L^* = 37,7$; $a^* = 12,8$; $b^* = 15,0$) e SAF ($L^* = 37,4$; $a^* = 9,7$; $b^* = 30,6$), no entanto, os valores de L^* não foram diferentes (Figura 3.6). A interação entre brilho e cor não permitiu diferenciar sementes brilhantes de opacas (dos parentais) pela medida de L^* , quando apenas duas amostras com cores diferentes são comparadas. Resultado semelhante foi obtido para P-152 ($L^* = 17,4$; $a^* = -0,3$; $b^* = 3,1$) e DN ($L^* = 17,6$; $a^* = -0,2$; $b^* = 4,2$), que não diferiram para a^* e L^* , mas diferiram para b^* (Figura 3.6), sugerindo também interação entre cor e brilho.

Contrariamente, nas progênies dos dois cruzamentos, foi verificada diferença entre amostras brilhantes e opacas, nas duas gerações de autofecundação (F_2 e F_3) (Figuras 3.6 e 3.7). Entre as progênies $F_{2;3}$ de P-152 x DN não foi detectada diferença estatística (Tukey, $P > 0,05$), no entanto, os valores de L^* foram menores nas progênies com tegumento opaco do que nas de tegumento brilhante. Contrariamente, as progênies $F_{3;4}$ diferiram para brilho (Tukey, $P < 0,05$).

As progênies $F_{2;3}$ e $F_{3;4}$ do cruzamento SAF x SAB, enquadradas em quatro classes visuais, diferiram ($P < 0,05$). Os valores de L^* foram menores nas classes Marrom Opaco e Cinza Opaco do que nos contrastantes brilhantes para a mesma cor.

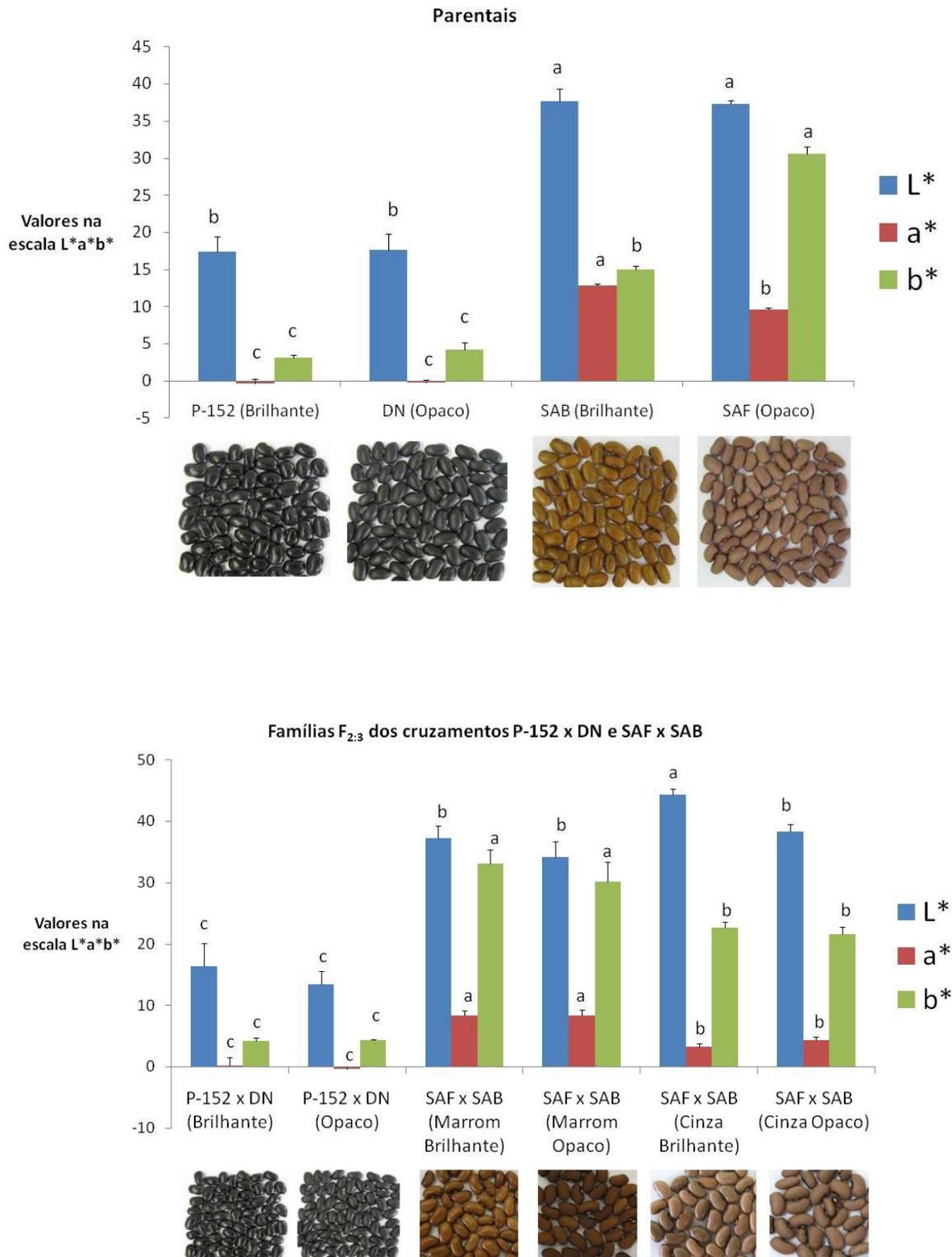


Figura 3.6 - Valores de luminosidade (L^*) e dos componentes de cores (a^* e b^*), do sistema $L^*a^*b^*$ (obtidas em colorímetro), em famílias $F_{2,3}$ e $F_{3,4}$ do cruzamento SAB x SAF e P-152 x DN. As análises foram realizadas com base em seis repetições de cada categoria. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). (Continua...)

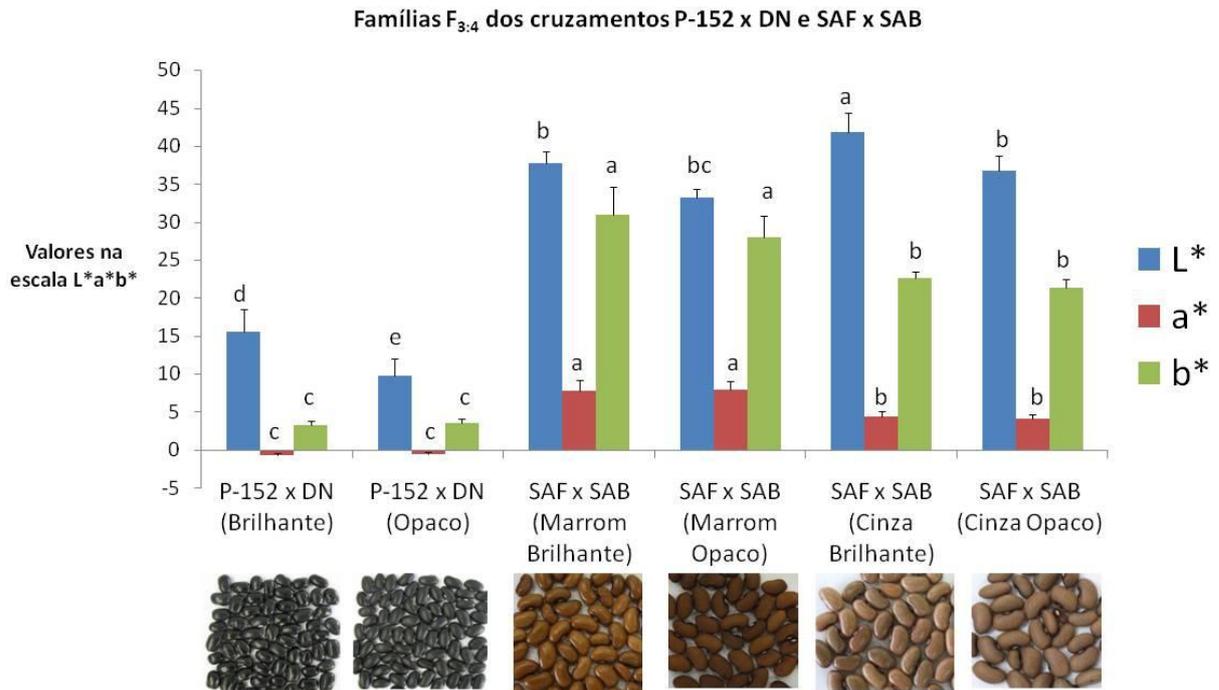


Figura 3.6 Continuação

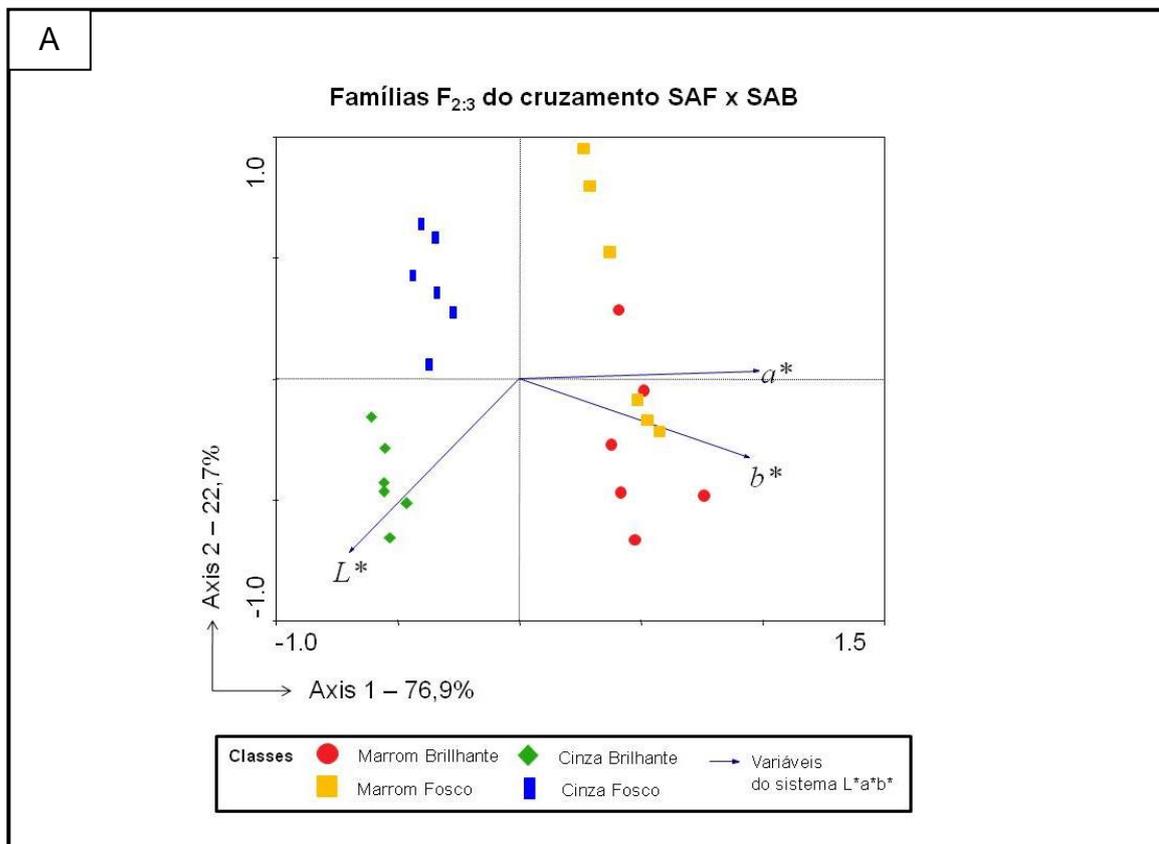


Figura 3.7 – Análise de componentes principais (PCA) em *biplot* – de medidas do sistema L*a*b*, obtidas em colorímetro Minolta Chroma CR 300, de famílias F_{2,3} e F_{3,4} dos cruzamentos entre variedades de feijoeiro contrastantes para brilho do tegumento: SAF x SAB e P-152 X DN. L*: luminosidade (para diferenciar sementes brilhantes de opacas); a* e b*: componentes de cor (continua...)

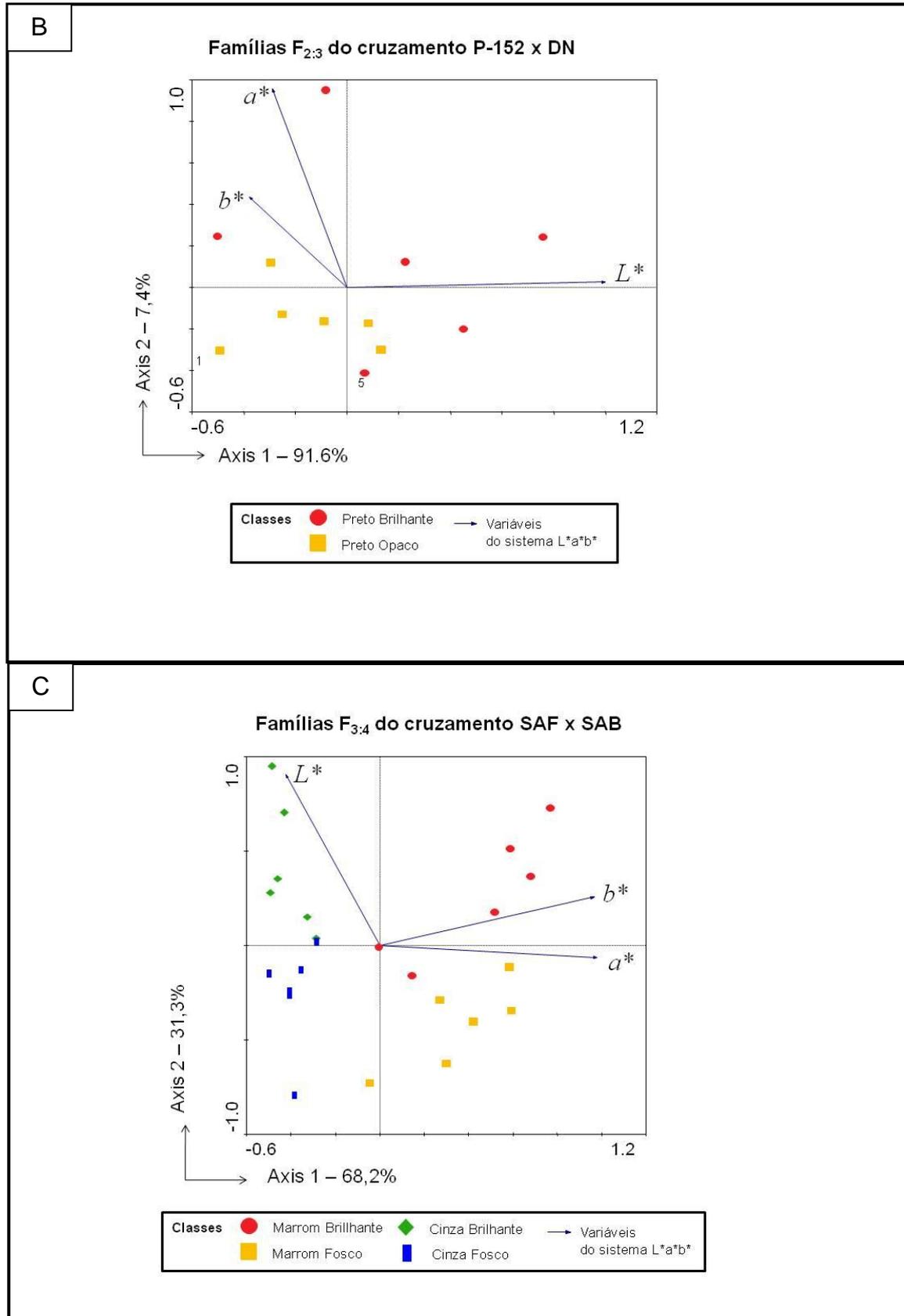


Figura 3.7 – Continuação

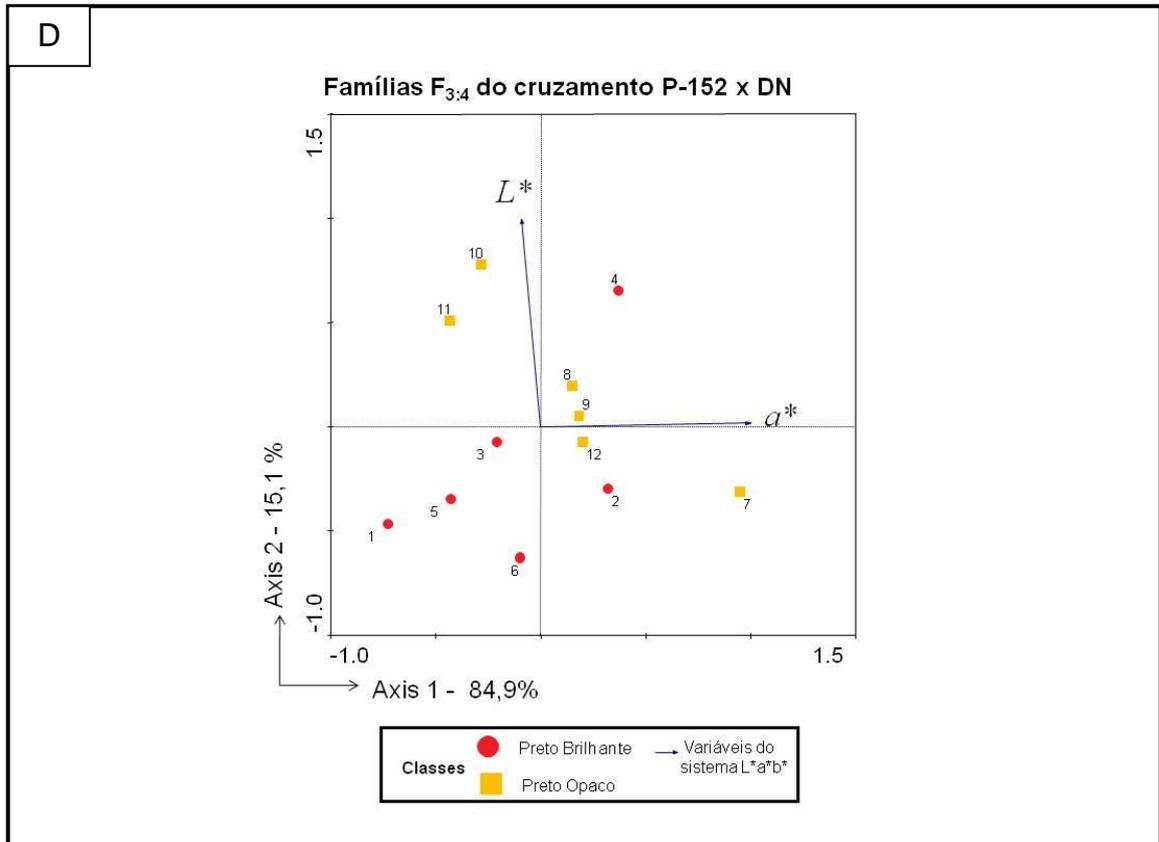


Figura 3.7 – Continuação

Através da análise de componentes principais (PCA), também foi possível discernir as amostras de tegumento brilhante das opacas. Dois componentes principais explicaram a maioria da variância (em todos os casos, mais de 90%) (Figura 3.7). No entanto, foi possível discernir claramente os grupos brilhante e opaco apenas nas progênies $F_{3,4}$ dos cruzamentos (SAF x SAB; P-152 x DN). Nas progênies $F_{2,3}$ houve sobreposição de amostras, no caso de SAF x SAB, e dispersão das amostras de P-152 x DN.

Devido a estes resultados, foi realizada a análise da interação entre cor e brilho do tegumento. Os resultados mostraram que a interação foi significativa ($P < 0,05$), sugerindo que a cor do tegumento interfere também na medida de L^* e, portanto, na possibilidade de diferenciar sementes brilhantes de opacas. Na Tabela 3.2 foi apresentada a análise de variância, considerando também a interação cor/brilho.

Tabela 3.2 – Análise da variância da interação entre brilho e cor, utilizando as medidas de L* de famílias F_{3:4} do cruzamento entre SAF x SAB. A análise foi baseada em oito repetições de cada tratamento (categoria de cor/brilho)

Fator de Variação	GL	SQ	QM	F	
Blocos	7	30,88	4,41	1,18	ns
Tratamentos	3	367,51	122,50	32,76	**
Brilho	1	130,65	130,65	34,94	**
Cor	1	220,50	220,50	58,97	**
Interação	1	16,36	16,36	4,38	*
Erro	21	78,52	3,74		
Total	31	476,91			

ns: não significativo; * Significativo a $P < 0,05$; ** Significativo a $P < 0,01$

3.3.3 Análise da superfície do tegumento

As análises da superfície dos tegumentos de cada variedade e dos controles (5-593, *asp* BC₃ 5-593 e *j* BC₃ 5-593) mostraram que as sementes de tegumento opaco apresentam maior rugosidade em relação às brilhantes (Figura 3.8).

O controle *j* BC₃ 5-593 também apresenta superfície pouco ondulada, indicando que este loco não se relaciona à rugosidade. Esta linhagem é recessiva para *j*, e carrega o alelo *Asp*. O brilho da superfície do tegumento desta linhagem é menos intenso em relação a 5-593 devido ao efeito de *j*.

Contrariamente, o controle para *asp* apresenta superfície rugosa, como esperado, pelo efeito deste alelo. O tegumento dessa linhagem é opaco, com apenas certo brilho incipiente, devido ao efeito do alelo *J*.

Entre SAB e SAF, é possível visualizar maior rugosidade no parental opaco. DN também é mais rugoso, comparado com P-152.

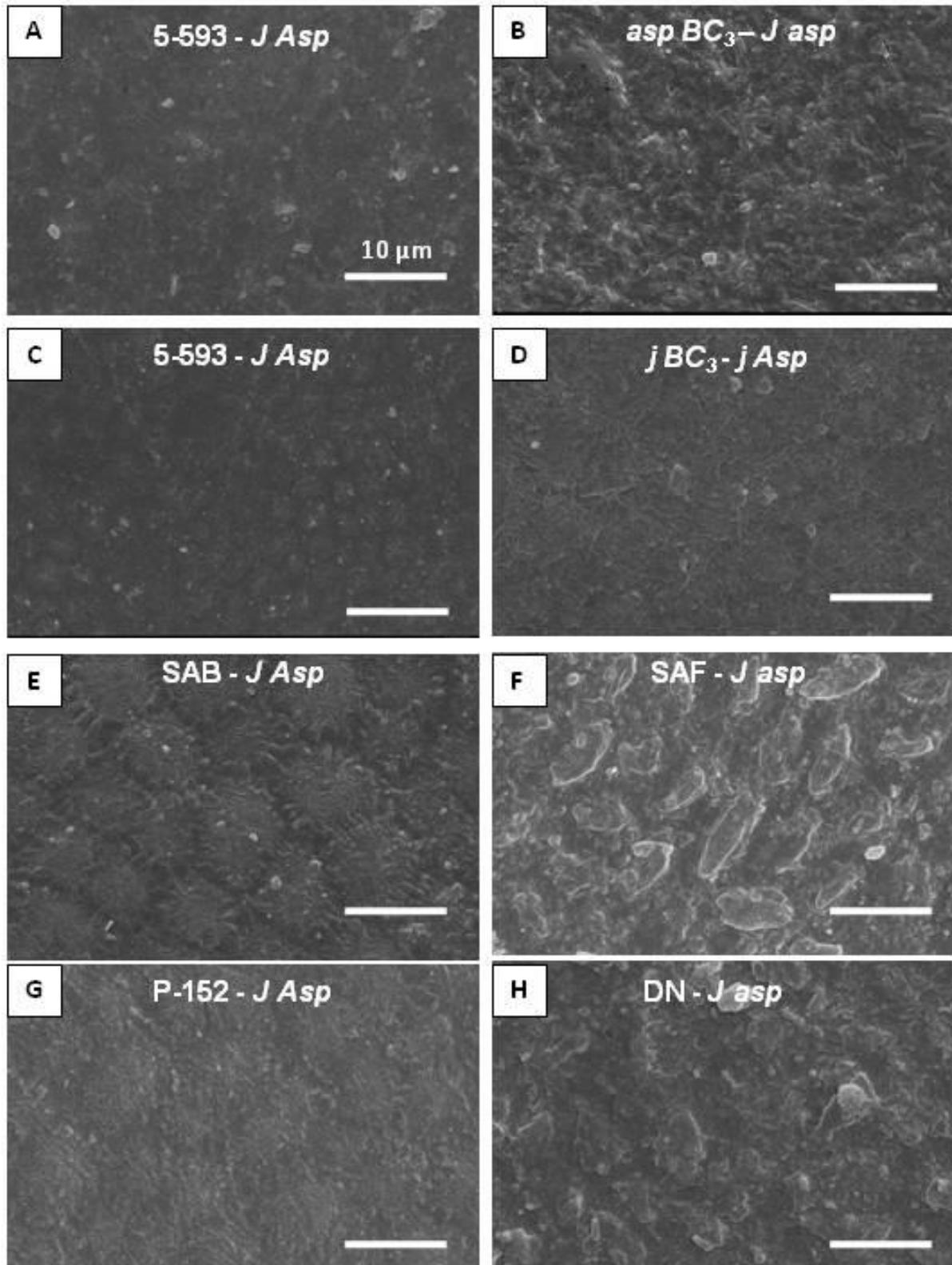


Figura 3.8 – Superfície do tegumento de variedades de feijoeiro contrastantes para brilho do tegumento. 5-593 – linhagem controle (Mark J. Bassett) para *Asp*; *asp BC₃* 5-593 – *tester* para *asp*; *j BC₃* 5-593 – *tester* para *j*. (A) e (B) comparando *J Asp* com *J asp*. (C) e (D) comparando *J Asp* com *j Asp*. SAB – Serro Azul Brillante (tegumento brilhante); SAF – Serro Azul Fosco (opaco); P-152 – Puebla-152 (brilhante); e DN – Diamante Negro (opaco). As barras representam comprimento de 10 µm

3.3.4 Comprimento do parênquima paliçádico

Na Figura 3.9 foram apresentados os perfis de cortes transversais de tegumentos realizados em cada uma das variedades analisadas. As medidas do comprimento do parênquima paliçádico mostraram que as variedades com tegumento brilhante apresentaram maior comprimento médio em relação às sementes de tegumento opaco (Tabela 3.3).

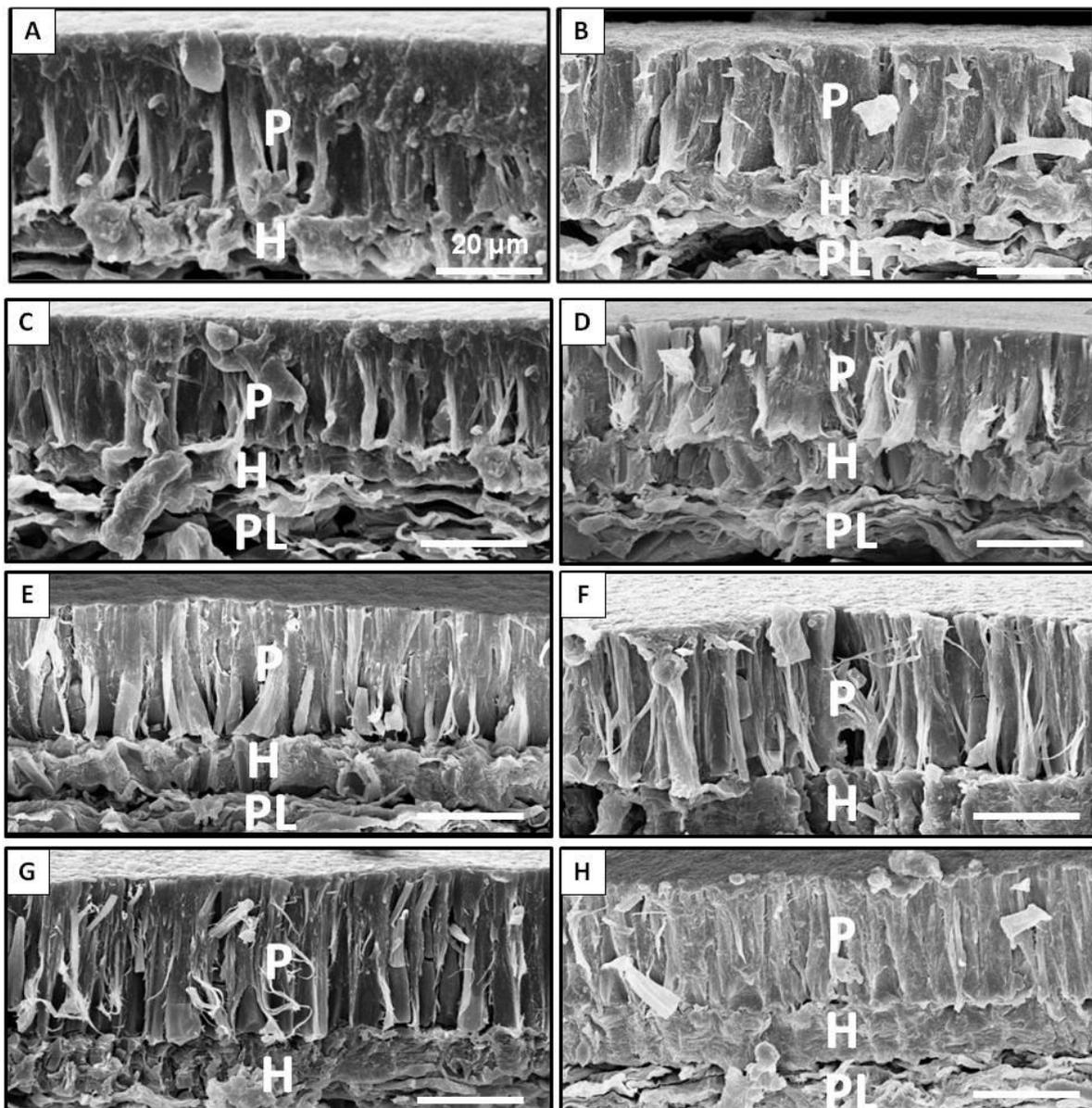


Figura 3.9 – Perfil transversal do tegumento de variedades de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) contrastantes para brilho do tegumento. P: parênquima paliçádico; H: hipoderme; PL: parênquima lacunoso. A – Linhagem 5-593 (*J Asp*) comparado com B – *asp BC₃ 5-593* (*J asp*); C – 5-593 comparado com D – *j BC₃ 5-593* (*j Asp*); E – Serro Azul Brilhante (SAB) (*J Asp*); F – Serro Azul Fosco (SAF) (*J asp*); G – Puebla-152 (P-152) (*J Asp*); e H – Diamante Negro (*J asp*). As barras representam comprimento de 20 μ M

Tabela 3.3 – Comprimento do parênquima paliçádico de genótipos de feijoeiro contrastantes para brilho do tegumento. Os resultados expressam a média de cinco sementes avaliadas. Em cada semente, foram avaliadas duas áreas no aumento de 200X (medindo-se dez pontos em cada campo) situadas na região oposta ao hilo

Variedade	Genótipo	Comprimento médio da epiderme	
		palissádica (μm)	Faixa de variação (μm)
5-593	<i>J Asp</i>	38,8 \pm 3,2 b	35,6 – 42,0
<i>asp</i> BC ₃ 5-593	<i>J asp</i>	33,2 \pm 2,2 c	31,0 – 35,4
<i>j</i> BC ₃ 5-593	<i>j Asp</i>	35,2 \pm 2,6 b	32,6 – 37,8
SAB	<i>J Asp</i>	40,8 \pm 2,0 b	42,8 – 38,8
SAF	<i>J asp</i>	37,0 \pm 2,4 b	39,4 – 34,6
P-152	<i>J Asp</i>	45,7 \pm 4,5 a	41,2 – 50,2
DN	<i>J asp</i>	42,3 \pm 3,4 ab	38,9 – 45,7
Comparação das variedades aos pares – Teste de Tukey (P = 0,05)			
		5-593 x <i>asp</i> BC ₃ 5-593	$p = 0,02$ *
		5-593 x <i>j</i> BC ₃ 5-593	$p = 0,11$ ns
		SAB x SAF	$p = 0,02$ *
		P-152 x DN	$p = 0,20$ ns

Os controles 5-593 e *asp* BC₃ 5-593 diferiram nestas análises. Dentre as variedades, apenas SAB e SAF foram diferentes. SAB apresentou maior valor de comprimento do parênquima paliçádico (40,8 μm) do que o opaco SAF (37,0 μm). Os parentais P-152 e DN têm origem mesoamericana, no entanto, são de diferentes locais e foram selecionados para diferentes finalidades, e desse modo, a comparação entre os mesmos é dificultada, embora os valores dos comprimentos tenham sido menores em DN (42,3 μm) do que em P-152 (45,7 μm).

3.3.5 Parâmetros qualitativos e absorção de água das variedades

Dentre as variáveis do tamanho da semente (comprimento, largura, espessura e peso de 100 sementes), considerando apenas os parentais, somente o comprimento das sementes não diferiu entre as variedades (Tabela 3.4).

A porcentagem de absorção de água diferiu entre as variedades. SAF absorveu água rapidamente (21,5% após cinco horas) enquanto que SAB (1,6% após cinco horas) praticamente não absorveu. A cultivar DN começou a absorver água antes de P-152. No

entanto, após 270 minutos, a porcentagem de absorção de água de P-152 ultrapassou DN, sendo 9,2 e 8,9%, respectivamente (Figura 3.10).

Tabela 3.4 – Caracteres do tamanho da semente e absorção diferencial de água de variedades de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) contrastantes para brilho do tegumento. SAB – Serro Azul Brillhante (tegumento brilhante); SAF – Serro Azul Fosco (opaco); P-152 – Puebla-152 (brilhante); e DN – Diamante Negro (opaco)

Variedade	SAB	SAF	P-152	DN
Caracteres do tamanho das sementes				
Comprimento da semente (mm)	9,2 ±0,42 a	9,1 ±0,67 a	9,1 ±0,52 a	9,4 ±0,53 a
Largura da semente (mm)	5,2 ±0,32 b	4,2 ±0,40 c	6,2 ±0,41 a	5,6 ±0,41 b
Espessura da semente (mm)	3,7 ±0,26 b	3,4 ±0,31 c	4,4 ±0,23 a	4,1 ±0,26 a
Peso de 100 sementes (g)	18,4 ±0,17 d	19,3 ±0,31 c	25,5 ±0,43 a	21,7 ±0,20 b
Absorção de água				
Absorção de água após 5 h (%)	1,6 ±1,64	21,5 ±1,54	11,7 ±1,51	9,9 ±2,92
Absorção de água após 24 h (%)	19,9 ±15,52	47,5 ±3,48	52,7 ±0,40	35,5 ±1,94
Absorção de água após 48 h (%)	27,8 ±16,22	49,1 ±4,12	53,7 ±0,79	39,2 ±4,49

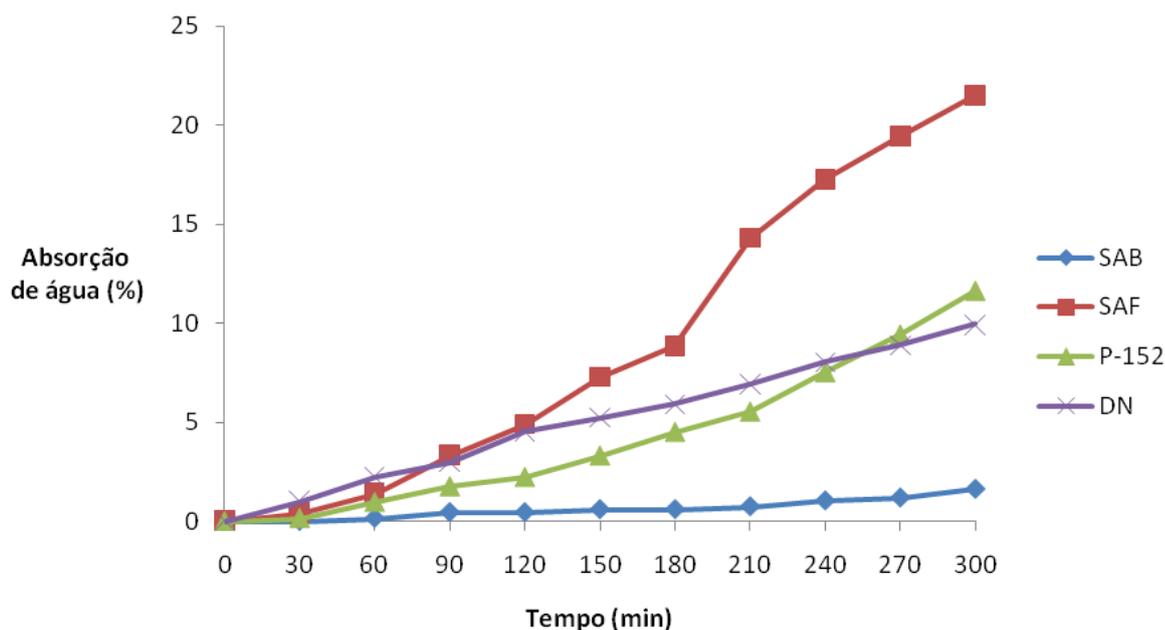


Figura 3.10 – Absorção diferencial de água de variedades de feijoeiro contrastantes para brilho do tegumento. SAB – Serro Azul Brillhante (tegumento brilhante); SAF – Serro Azul Fosco (opaco); P-152 – Puebla-152 (brilhante); e DN – Diamante Negro (opaco). Os pontos representam a média de três repetições

Após 24 e 48 horas, SAF, P-152 e DN continuaram absorvendo água (Tabela 3.5). P-152, no entanto, indicou estar estabilizando a absorção depois de 48 horas (absorção de 53,7%), enquanto que SAF e DN ainda apresentaram considerável de acréscimo (após o

período com 49,1 e 39,2%, respectivamente) em relação à medida de 24 horas (Tabela 3.4). SAB apresentou absorção maior de água após 24 e 48 horas (19,9 e 27,8%, respectivamente), mas ainda bem abaixo das demais variedades e bastante irregular entre as repetições, acarretando em elevado desvio (Tabela 3.4). Desse modo, houve a necessidade de repetir o experimento, refletindo em resultado semelhante. No Anexo E são apresentados todos os dados obtidos.

3.3.6 Determinações de compostos fenólicos

As variedades SAB, SAF, P-152 e DN apresentaram elevadas concentrações de fenois totais, taninos totais e taninos condensados (pró-antocianidinas), comparativamente a 5-593 e *j BC₃ 5-593* (Figura 3.11). Como esperado, foram detectados níveis de taninos totais mais elevados em 5-593 (25,3 Eq. ácido tânico/kg matéria seca) em relação ao *tester j BC₃ 5-593* (12,6 Eq. ácido tânico/ kg matéria seca). Da mesma maneira, a quantidade de taninos condensados foi mais elevada em 5-593 (60,8 Eq. leucocianidina/ kg de matéria seca) do que em *j BC₃ 5-593* (43,9 Eq. leucocianidina/ kg de matéria seca).

A análise também mostrou que a quantidade de fenois totais e de taninos condensados foi mais elevada (Tukey, $P < 0.05$) nos parentais com tegumento brilhante (SAB e P-152) do que nos opacos (SAF e DN) (Figura 3.11).

O teste de vanilina HCl aplicado a cortes frescos de tegumentos confirmou os resultados do método de Porter, Hrstich e Chan (1986) em relação aos taninos condensados. Nos cortes do controle 5-593, observou-se coloração intensa do parênquima paliádico e no tecido parenquimático abaixo da camada cristalina transparente (Figura 3.12). Ao contrário, a coloração foi pouco pronunciada em *j BC₃ 5-593*. O parênquima lacunoso, no entanto, apresentou coloração neste genótipo.

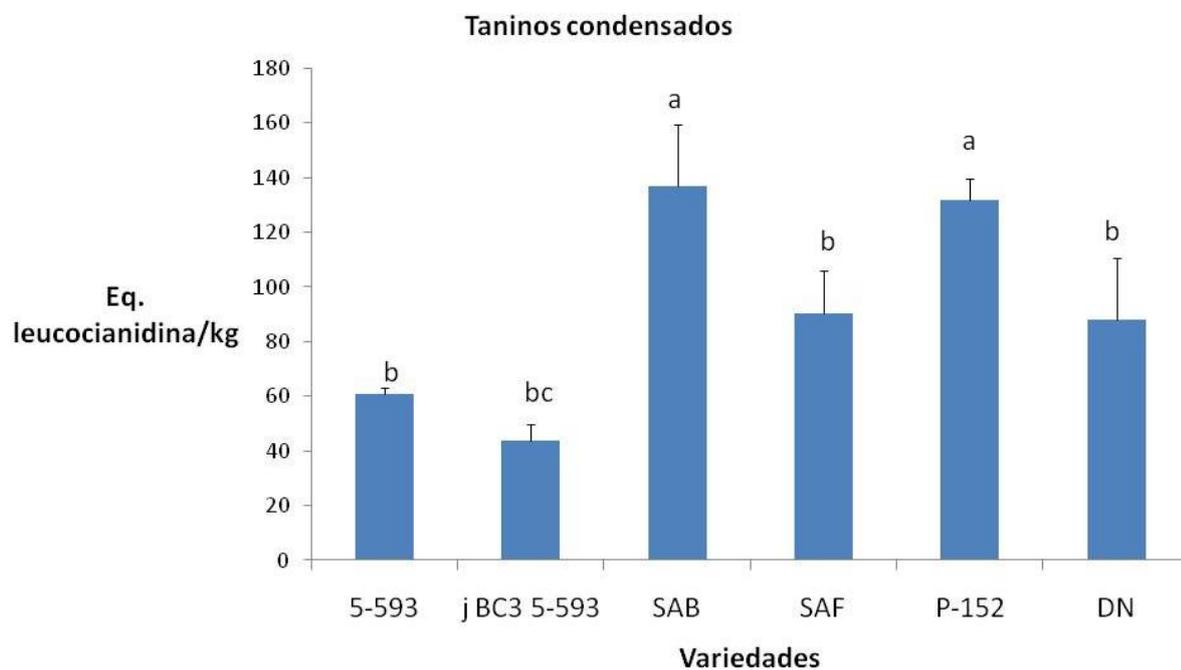
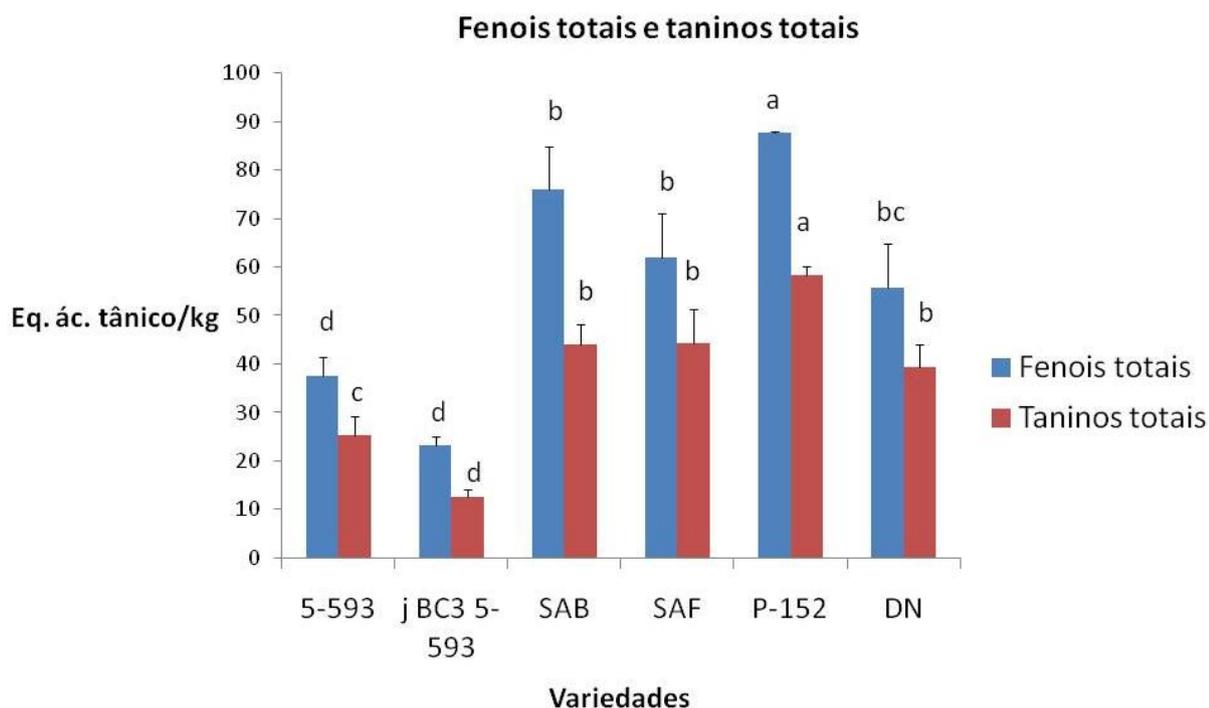


Figura 3.11 – Fenois totais, taninos totais e taninos condensados de amostras de variedades crioulas (Serro Azul Brilhante, Serro Azul Fosco e Puebla-152) e a cultivar Diamante Negro (CNPAP/EMBRAPA) de *Phaseolus vulgaris* L. contrastantes para brilho do tegumento. Os resultados expressam a média de três repetições para cada parental. 5-593 e j BC₃ foram os controles para análises de taninos condensados

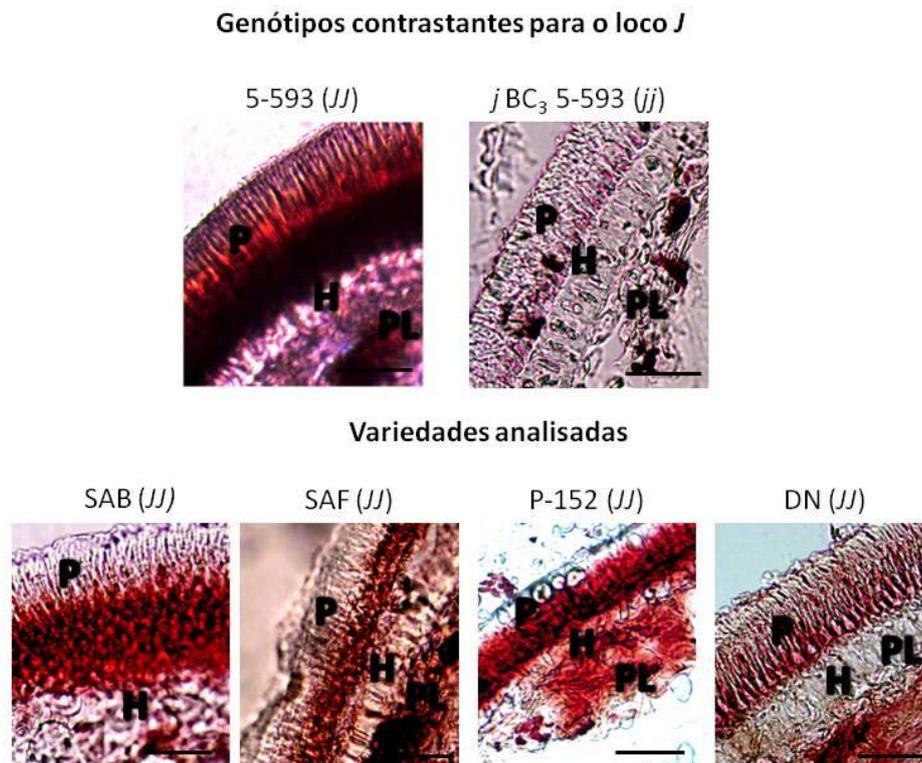


Figura 3.12 – Perfil transversal do tegumento (cortes frescos) corado com vanilina 10% (em etanol e HCl 37%, 1:1). As áreas coradas em vermelho intenso indicam a presença de catequinas e/ou taninos condensados (pró-antocianidinas). Genótipos *J* apresentam taninos condensados e o controle *j j* não contém pró-antocianidinas, não sendo observada coloração vermelha típica no parênquima paliçádico. P: Parênquima paliçádico; H: hipoderme; PL: parênquima lacunoso. As barras indicam comprimento de 50 μ m

3.4 Discussão

3.4.1 Análise do brilho

No presente estudo, variações de brilho e cor foram observadas nas variedades estudadas. A regulamentação para a determinação da cor de cultivares de feijoeiro é determinada pela Instrução Normativa nº 12, de 28 de março de 2008 (BRASIL, 2008). Através dessa normativa, o feijão foi classificado nas seguintes classes de cores: Branco, Preto, Cores e Misturado. Os parentais P-152 e DN foram enquadrados na classe Preto. SAB e SAF, por serem variedades locais e crioulas, não se apresentam regulamentadas para esses

padrões, mas dadas as especificações da normativa, foram enquadradas na classe Misturado, pois não atenderam a nenhum dos critérios para enquadramento em outras classes. No entanto, SAB se enquadrou em um dos aspectos da classe Cores, subclasse Mulato. Essa subclasse é descrita por apresentar tegumento de cor marrom claro a escuro, com ampla variação de tamanho e forma (BRASIL, 2008).

O presente trabalho, no entanto, não se deteve à classificação da cor. Apenas foi realizada esta consideração mediante a interação entre cor e brilho observada nas análises do colorímetro.

Nos cruzamentos entre os parentais (SAF x SAB; P-152 x DN), as famílias $F_{2:3}$ e $F_{3:4}$, embora terem apresentado variações na intensidade de brilho entre famílias, foram apenas classificadas como brilhantes ou opacas. O CIAT (1976) recomenda a classificação das sementes em brilhantes, intermediárias e opacas. No entanto, essa classificação é mais adequada para definir uma linhagem avançada ou cultivares. No presente estudo, foi visualizada variabilidade de intensidade do brilho entre sementes dentro uma mesma progênie, sugerindo interação entre genótipo e ambiente ou também devido ao fato de as progênies ainda não estarem em homozigose (gerações F_2 e F_3 apenas). A classificação de uma família como brilhante ou opaca foi visivelmente nítida, no entanto, para discernir uma progênie brilhante de uma intermediária, houve limitações condicionadas pela variação ambiental.

Os dados obtidos por meio do colorímetro permitiram diferir quantitativamente a intensidade de brilho entre as linhagens de cada um dos cruzamentos. As análises do colorímetro validaram classificações visuais. No entanto, uma limitação considerável nesse método é a cor e sua tonalidade. Para diferenciar tegumento brilhante de opaco é necessário que amostras apresentem coloração uniforme entre elas, o que foi claramente verificado nas populações F_2 e F_3 de SAF x SAB. Desse modo, ao avaliar outros materiais genéticos, a variabilidade na coloração constitui um critério de classificação prévio para a análise. Considerando estes aspectos, a análise de sementes com padrões diferenciados de cores, variando para brilho, é praticamente inviável.

As análises do colorímetro também sugeriram que o tempo de armazenamento das sementes influencia nas medidas de L^* , a^* e b^* e, portanto, interfere na comparação entre sementes de tegumento brilhante e opaco. As progênes $F_{2:3}$ de cada cruzamento foram obtidas nos anos de 1996 (SAF x SAB) e 1999 (P-152 x DN). Os resultados da ANOVA de cada variável (Figura 3.6) e da PCA (Figura 3.7) mostraram que não foi possível diferir estatisticamente os grupos de amostras brilhante e opaco nas progênes $F_{2:3}$ de ambos os cruzamentos, com exceção de algumas amostras, pois houve sobreposição ou dispersão dos dados no gráfico (Figura 3.7).

Quando analisadas todas as amostras das populações SAF x SAB e P-152 x DN, na geração $F_{3:4}$, no entanto, não foi possível distinguir os grupos brilhante e opaco (Figura 3.13). Nesta situação, a variação da cor no conjunto das amostras interfere nos valores de $L^*a^*b^*$. A distribuição normal dos valores de L^* e a^* pode explicar isso, indicando que os valores apresentam uma variação a partir de apenas uma média. Junk-Knievel, Vandenberg e Bett (2008) estudaram populações de feijoeiro derivadas de cruzamentos entre um parental que apresenta escurecimento regular (rápido) do tegumento sob exposição à luz ultravioleta (UVC, $\lambda = 254$ nm) e outro com lento escurecimento. Desse modo, foi possível diferenciar amostras escurecidas de amostras com pouco escurecimento pelo sistema de cores $L^*a^*b^*$. Analisando os dados das populações, os autores verificaram que estes apresentavam distribuição bimodal, discernindo claramente amostras com rápido e lento escurecimento. Portanto, o método permitiu a genotipagem para o caractere escurecimento no estudo.

Os dados do presente estudo, apesar de terem permitido, por amostragem, a separação entre cores e entre as classes brilhante e opaco, não possibilitaram genotipar as amostras para o brilho do tegumento. Desse modo, o método pode ser aplicado para validar diferenças entre classes que apresentem cor uniforme. Além disso, a metodologia pode ser convenientemente aplicada para genotipar populações segregantes para cores do tegumento, pois o gráfico da população $F_{3:4}$ de SAF x SAB da Figura 3.13 mostrou a formação de dois grupos, um com amostras de cor marrom e o outro com as amostras de tegumento cinza. As amostras de P-152 e DN ($F_{3:4}$) não foram separadas, pois todas apresentam tegumento preto.

Devido a estes resultados, a genotipagem dos parentais e, posteriormente, das progênes segregantes para o brilho do tegumento foi realizada com base nas classes visuais definidas para cada cruzamento.

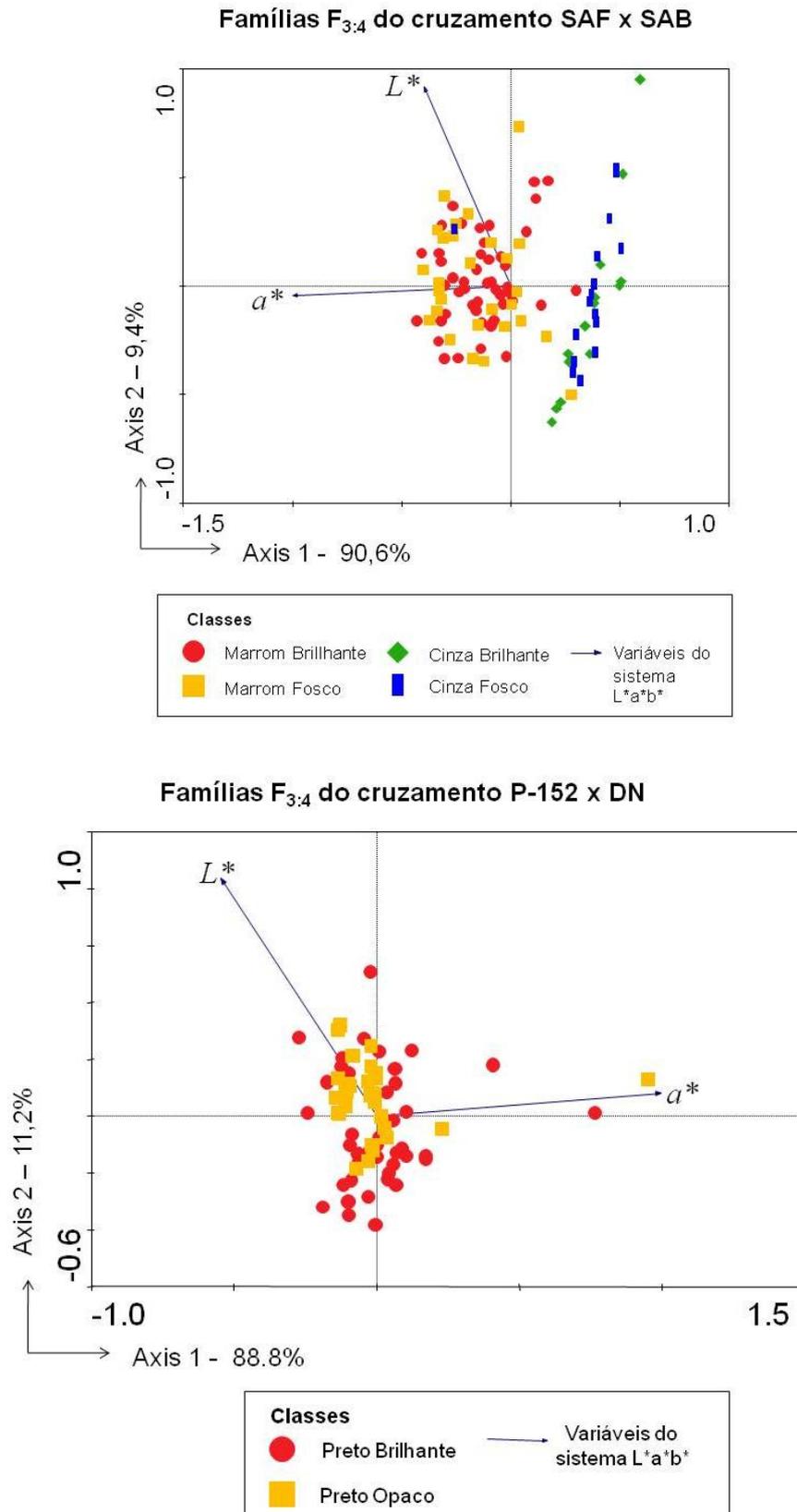


Figura 3.13 – Análise de Componentes Principais (PCA) dos valores de L*a*b em populações de feijoeiro em F_{3:4}, dos cruzamentos: SAF x SAB e P-152 x DN, variedades contrastantes para brilho do tegumento

3.4.2 Genotipagem dos parentais

Os genótipos de cada um dos parentais foram atribuídos com base em rigorosas observações e comparações com os genótipos de Bassett (1992). Além das observações da literatura, outras características importantes para diferenciar os efeitos dos genes *Asp* e *J* foram propostas e apresentadas na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Principais características fenotípicas do tegumento de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) devidas às formas alélicas dos genes *J* e *Asp*

Genótipo	Fenótipo	Descrição
<i>J Asp</i>	Tegumento brilhante	Brilho intenso, no entanto, dependente do genótipo da cor e do padrão. A superfície do tegumento é regular e praticamente lisa (observações de microscopia eletrônica de varredura).
<i>J asp</i>	Tegumento opaco	Tegumento opaco devido ao efeito de <i>Asp</i> , mas com um leve tom brilhante, especialmente na bordadura do hilo, devido ao alelo dominante <i>J</i> . O tegumento apresenta maior rugosidade na superfície, devido à presença de <i>asp</i> .
<i>j Asp</i>	Tegumento com brilho intermediário*	Intensidade de brilho reduzida pelo efeito de <i>j</i> . A coloração do tegumento também é irregular e a região da corona apresenta-se parcial ou totalmente descolorida. A superfície do tegumento é regular e praticamente lisa.
<i>j asp**</i>	Tegumento opaco	Espera-se tegumento opaco e rugoso.

*Não significa que variedades com tegumento de brilho intermediário tenham genótipo *j Asp*, pois mesmo genótipos *J Asp* apresentam variações na intensidade do brilho.

** Genótipo não caracterizado no presente estudo.

3.4.3 Análises de microscopia eletrônica de varredura

Na literatura foi descrito que sementes com tegumento opaco apresentam superfície com maior rugosidade em relação a sementes brilhantes (LAMPRECHT, 1940). As análises de microscopia de varredura do presente estudo confirmaram esta característica. Os parentais

SAF e DN apresentaram superfície rugosa, assim como o controle *asp* BC₃ 5-593 (Figura 3.8). Beninger et al. (2000) removeram a cutícula do tegumento para mostrar esta característica e observaram elevações nas extremidades das células do parênquima paliçádico. No presente estudo, não foi removida a cutícula, sendo possível observar claramente a diferença de rugosidade entre brilhantes e opacas.

Também os resultados da análise do comprimento do parênquima paliçádico do presente estudo estão de acordo com o estudo de Beninger et al. (2000), pois mostraram que as variedades que carregam *asp* apresentaram menor comprimento médio (Tabela 3.3). Comparando *asp* BC₃ 5-593 com SAF e DN, no entanto, foi verificado que o conjunto epiderme paliçádica, hipoderme e parênquima lacunoso apresentou-se bem mais espesso do que em *asp* BC₃ 5-593. Apenas o parênquima paliçádico apresentou menor comprimento, quando comparado com os brilhantes.

Beninger et al. (2000) também constataram que *asp*, por diminuir o tamanho das células do parênquima paliçádico, limitou o acúmulo de antocianinas no tegumento. Ao comparar *asp* BC₃ 5-593 com 5-593, o primeiro apresentou apenas 55% do total de delphinidina-3-glicosídeo, 58% do total de petunidina-3-glicosídeo e 55% do total de malvidina-glicosídeo, as três principais antocianinas encontradas nas amostras por análises de HPLC.

Apesar destas análises, não se conhece as razões para a mudança estrutural que *asp* condiciona no tegumento, especialmente no parênquima paliçádico. Nesse sentido, alguns trabalhos exploraram também a camada de cutícula que reveste o tegumento. Bushey, Hosfield e Owens (2002) trataram sementes de feijoeiro com xilol para remoção da cutícula. Uma das cultivares analisadas no estudo foi Shiny Crow, de tegumento brilhante. Quando não tratado com a substância, os autores observaram por microscopia eletrônica que a cutícula se apresentava uniformemente distribuída sobre o tegumento. No entanto, as sementes tratadas apresentavam variabilidade na espessura da camada de cutícula ao longo do tegumento, característica semelhante a de cultivares de tegumento opaco avaliadas. Desse modo, é provável que *Asp* esteja envolvido na produção de uma ou mais substâncias que mantenham a uniformidade da superfície cuticular do tegumento.

3.4.4 Absorção de água

A porcentagem de absorção de água foi extremamente reduzida na variedade SAB, comparativamente a SAF (Figura 3.10). A presença de brilho no tegumento tem sido associada à baixa absorção de água e alguns trabalhos mostraram resultados semelhantes ao do presente estudo. Bushey, Hosfield e Beninger (2000) estudaram cinco cultivares de feijão preto (Raven, Shiny Crow, Shiny Harblack, Black Magic e Black Jack) e verificaram que as que apresentavam tegumento opaco absorveram maior quantidade de água do que as de tegumento brilhante, em período de três horas. Os extremos desse experimento foram Raven, em que a porcentagem de absorção de água foi de 45%, enquanto que Shiny Harblack e Shiny Crow absorveram cerca de 1% apenas. Além disso, os autores verificaram que a quantidade de antocianinas perdidas quando as sementes eram embebidas em água quente foi maior nas cultivares de tegumento opaco (Raven: 93%; Black Magic: 90%) do que nas de tegumento brilhante (Shiny Harblack: 51%).

No trabalho de Bushey, Hosfield e Owens (2002) foram analisadas cultivares contrastantes para brilho do tegumento visando verificar por que sementes brilhantes absorviam menor quantidade de água. No estudo, os autores avaliaram amostras tratadas e não tratadas com xilol. As cultivares com sementes de tegumento brilhante tratadas com xilol absorveram mais do que o dobro da quantidade de água após descoloração com xilol, em relação às não tratadas. Através dessa análise os autores constataram que a uniformidade de deposição da camada de cera na superfície do tegumento influencia na capacidade de absorção. Essa característica, portanto, como mencionado anteriormente, poderia estar relacionada a *Asp*.

Essas análises também são coerentes com os resultados da MEV do presente estudo. O maior comprimento do parênquima paliçádico e a uniformidade da cutícula na superfície no tegumento são fatores que provavelmente limitam a entrada e distribuição de água pela semente. Conseqüentemente, o processo de embebição e germinação também pode ser retardado. Foi observado que SAB apresenta germinação consideravelmente lenta em relação a SAF (dados não fornecidos no presente trabalho).

Apesar destes resultados, no presente estudo as variedades P-152 e DN apresentaram níveis intermediários de absorção de água nas primeiras cinco horas, comparativamente a SAF e SAB. P-152 apresenta tegumento com brilho intenso e seria esperada reduzida velocidade de absorção de água pelas sementes. No entanto, os valores não diferiram da absorção de DN.

A literatura sugere que, devido aos efeitos estruturais que determina, *asp* poderia estar relacionado à rápida absorção de água em relação a genótipos *Asp* (BUSHEY; HOSFIELD; BENINGER, 2000). No entanto, estas constatações não foram muito precisas, pois da mesma maneira que no presente estudo, algumas cultivares apresentaram níveis intermediários de absorção de água nos outros trabalhos.

As divergências entre esses resultados levam à hipótese de que as características estruturais condicionantes da absorção de água pelo tegumento são devidas não somente a um loco, como *asp*, mas também a outros locos. Possivelmente, a herança dessas características seja quantitativa.

Além disso, destaca-se que SAB e SAF são materiais genéticos crioulos, sem seleção específica para melhoramento. Contrariamente, P-152 e DN foram selecionadas e melhoradas para finalidades específicas. Nesse processo, é possível que um alelo de loco específico ou alelos de vários locos ligados à estrutura do tegumento tenham sido também selecionados.

A presença de compostos fenólicos de diferentes classes no tegumento pode condicionar a absorção de água. Desse modo, compostos associados a muitos genes podem estar relacionados.

Além de todos esses aspectos, é possível também explicar a absorção de água sob o ponto de vista fisiológico. O tegumento é o modulador das interações entre as estruturas internas da semente e o ambiente externo, de modo que suas características estruturais determinam a sua capacidade de absorção de água (SOUZA; MARCOS-FILHO, 2001). Os genes condicionam a estrutura e a presença e regulação da quantidade de fenólicos e proteínas presentes no tegumento, no entanto, a absorção de água pode constituir uma resposta fisiológica, devida a essa estruturação.

3.4.5 Fenois totais, taninos totais e taninos condensados

Os resultados mostraram que a quantidade de fenois totais e de taninos condensados foi mais elevada nos parentais com tegumento brilhante (SAB e P-152) do que nos de tegumento opaco (SAF e DN) (Figura 3.11). É provável que a diferença entre sementes brilhantes e opacas seja relacionada à quantidade de antocianinas, como mostrado por Beninger et al. (2000). No entanto, no presente estudo não foram determinadas antocianinas para confirmar essa hipótese.

Devido a todos os parentais (SAB, SAF, P-152, DN) apresentarem o genótipo *JJ*, foi esperada a detecção de taninos condensados em todas as amostras. No entanto, mesmo no *tester j* BC₃ 5-593 foram detectadas pró-antocianidinas, sendo que a quantidade média neste genótipo representou 72% da quantidade média encontrada no controle *J* (5-593).

Este resultado pode ser explicado sob dois pontos de vista: o método empregado e recentes estudos sobre o gene *J*. Dois problemas principais influenciam o resultado da determinação pelo método do butanol ácido de Porter, Hrstich e Chan (1986). Primeiramente, as substâncias da amostra apresentam diferentes coeficientes de absorvidade molar. Além disso, a estrutura da molécula de pró-antocianidinas influencia a cinética da reação. Dependendo do padrão utilizado as quantidades podem ser estimadas erroneamente (HÜMMER; SCHREIER, 2008). Além disso, é provável que outras substâncias como kaempferol, composto produzido anteriormente na via dos flavonoides, interfiram no resultado (BENINGER; HOSFIELD, 1999). Desse modo, o método não apresenta especificidade elevada. Análises de HPLC e espectrometria de massas, utilizando padrões específicos (pró-antocianidinas isoladas) seriam necessárias para discriminar de maneira mais adequada estes compostos.

Apesar disso, Beninger e Hosfield (1999a) caracterizaram os polifenólicos da cultivar Prim, de tegumento amarelo, uma variedade de feijoeiro do grupo Manteca, amplamente consumida no Chile por sua boa digestibilidade. O genótipo da variedade Prim é *CC dd jj GG BB v^{lae} v^{lae}* (BASSETT, 1999). Por carregar o alelo *jj*, não foram encontradas pró-antocianidinas na cultivar, inclusive por análise de cromatografia em camada delgada (CCD), em que placas de sílica foram coradas com solução de vanilina, não produzindo coloração na cultivar Prim.

Comparativamente, em estudo similar, utilizando a cultivar Montcalm (do tipo Dark Red Kidney), com genótipo *JJ*, ao contrário, foram encontradas pró-antocianidinas (BENINGER; HOSFIELD, 1999b).

No presente estudo, o teste de vanilina foi aplicado a cortes frescos de tegumento. No *tester j BC₃ 5-593* não foi observada coloração do parênquima paliçádico, embora tenha sido observada coloração vermelha no parênquima lacunoso. Esse resultado mostrou que o método conseguiu diferir sementes de genótipo *J* (com coloração vermelha intensa tanto no parênquima paliçádico quanto no lacunoso) de genótipos *j* (coloração mais fraca, praticamente sem coloração no parênquima paliçádico).

Essas observações indicaram que os testes histoquímicos ou a técnica de CCD, utilizando o corante vanilina, podem ser adequados para caracterizar qualitativamente a presença ou ausência de pró-antocianidinas em variedades de feijoeiro.

Com relação ao método do butanol ácido, apesar de as variedades de tegumento brilhante (SAB e P-152) terem apresentado maior quantidade de taninos condensados, não é possível afirmar consistentemente que o brilho do tegumento se associa a esta diferença. Nestas variedades, apenas *Asp* variou e, pelos estudos já realizados, postulou-se que o gene estaria envolvido na produção de substâncias de efeito estrutural no tegumento (BENINGER et al., 2000).

Desse modo, é provável que outros genes, em interação com o alelo dominante *J* ou dependentes de sua expressão (epistasia), controlem a acumulação de taninos condensados no tegumento. Trabalhos recentes mostraram diferenças genéticas na concentração de taninos condensados, sugerindo um padrão de herança quantitativa. Caldas e Blair (2009) estudaram populações de cruzamentos entre cultivares Andinas e Mesoamericanas, visando detectar QTLs para genes relacionados à cor e ao padrão do tegumento. Os autores mostraram que a herança dos taninos se adequa a um modelo oligogênico. Díaz, Caldas e Blair (2010), utilizando as mesmas populações, caracterizaram taninos condensados e antocianinas em todas as linhagens recombinantes, sugerindo que a produção de antocianinas também é controlada por poucos genes.

Em contrapartida, a Dra. Kirstin Bett (2011), da Universidade de Saskatchewan Canadá, em comunicação pessoal, informou que recentes pesquisas estão indicando que o loco *J* pode não ser o precursor das pró-antocianidinas. No entanto, resultados mais precisos são necessários para confirmar esta hipótese. Nesta situação, provavelmente genótipos *jj* poderiam também sintetizar pró-antocianidinas, no caso de outro loco poder estar envolvido. Os trabalhos até agora, no entanto, têm mostrado que genótipos *jj* não contêm pró-antocianidinas.

É necessário enfatizar que os estudos com pró-antocianidinas permanecem com muitas perguntas, pois ainda não são completamente conhecidos os mecanismos de polimerização destes compostos. Desse modo, estudos mais aprofundados são necessários para elucidar os genes que controlam a síntese e acumulação dos taninos condensados.

3.4.6 Implicações dos resultados

Os resultados do presente trabalho apresentam importantes implicações no que concerne à característica do brilho do tegumento do feijoeiro. Sementes de tegumento opaco não necessariamente apresentam ausência de taninos condensados, pois podem carregar os alelos *J* e *asp* simultaneamente. As pró-antocianidinas estão envolvidas no endurecimento das sementes (LEAKEY, 1988), além do escurecimento do tegumento no armazenamento (JUNK-KNIEVEL; VANDENBERG; BETT, 2008), caracteres indesejáveis para o consumo e aceitação no mercado.

Além da influência em características da semente de interesse comercial, alguns estudos sugeriram que alta porcentagem de taninos condensados na dieta de alguns animais afeta negativamente a digestibilidade de proteínas e carboidratos, reduzindo o ganho de peso e a eficiência na absorção de nutrientes (BARAHONA et al., 1997; LI et al., 1996). Além disso, o efeito antinutricional dos taninos tem sido reportado em estudos com cereais e legumes, promovendo a redução da qualidade desses alimentos para o consumo humano (CABRERA; MARTIN, 1989). Taninos de legumes precipitam proteínas e formam complexos com ferro no lúmen gastrointestinal, reduzindo a disponibilidade de minerais do grão (MIRA et al., 2002).

Portanto, na seleção de cultivares de feijoeiro, se for desejado obter variedades que produzam pequenas quantidades ou que não sintetizem taninos condensados, é necessário conhecer o alelo de *J* que estas carregam. Desse modo, não necessariamente sementes brilhantes serão descartadas durante a seleção, pois *Asp* indica não estar relacionado a estes compostos.

Em contrapartida, considerável atenção tem sido dada a pró-antocianidinas e seus monômeros devido aos seus potenciais efeitos positivos na saúde humana como atividades anticancerígenas, antioxidantes, anti-inflamatórias, propriedades cardio-protetivas, vasodilatadoras e efeitos antitrombóticos (BENINGER; HOSFIELD, 2003; HE et al., 2008). Baseado no modelo de herança quantitativo dos taninos condensados (CALDAS; BLAIR, 2009), é possível obter genótipos com reduzidos conteúdos de taninos através dos programas de seleção no melhoramento do feijão.

Além desses aspectos, outro critério para seleção é o tempo de cozimento. Os resultados do trabalho e da literatura mostraram que variedades de tegumento opaco tendem a absorver maior quantidade de água do que sementes brilhantes, no mesmo intervalo de tempo. Desse modo, é possível que o efeito estrutural a que *Asp* condiciona, esteja associado à capacidade de absorção de água. Assim, deve interferir também no tempo de cozimento dos grãos. A relação entre esse caractere e absorção de água foi estabelecida: quanto maior a absorção de água menor o tempo de cozimento (ELIA; HOSFIELD; UEBERSAX, 1997).

Por isso, o brilho do tegumento costuma ser rejeitado pelo consumidor, pois o tempo de cozimento é maior e o cozimento pode não ser completo ou apresentar-se irregular entre os grãos. No entanto, no trabalho a variedade de tegumento brilhante P-152 absorveu água nas mesmas proporções que a de tegumento opaco DN. Por ter sido selecionada e avançada para fins específicos, é provável que a seleção de determinadas características do tegumento tenham favorecido a maior capacidade de absorção de água. Desse modo, a presença de brilho no tegumento não implica necessariamente lenta absorção de água. Por essa característica, esta variedade precisaria ser melhor estudada, para verificar como se comporta durante o cozimento.

Além disso, o tegumento brilhante pode representar uma barreira para o ataque de insetos e à penetração de patógenos.

Desse modo, discriminar os alelos que controlam o brilho do tegumento é extremamente importante para o entendimento das propriedades bioquímicas e de cocção, além da relação destas sementes com o ambiente. Análises das populações segregantes do presente estudo para estas características constituiriam passos importantes para o entendimento destas relações.

3.5 Conclusões

Os parentais SAB e P-152 apresentam genótipo *J Asp*, enquanto os parentais SAF e DN-6 foram genotipados por *J asp*. Desse modo, todos os parentais possuem o genótipo *J J* e as populações dos cruzamentos entre os mesmos não segregaram para este loco.

O método de análise de sementes por espectrofotometria, através do colorímetro e sistema de cores $L^*a^*b^*$, permitiu diferenciar sementes brilhantes de opacas através das medidas de luminosidade (L^*). No entanto, a metodologia é limitada a amostras de sementes com a mesma coloração e também coloração uniforme pelo tegumento. Além disso, é mais adequada para genotipagem de cores do tegumento em populações segregantes.

As medidas de L^* foram menores nas progênes de tegumento opaco do que nas de tegumento brilhante.

A análise da superfície do tegumento por microscopia eletrônica de varredura mostrou que sementes opacas apresentaram maior rugosidade do que as brilhantes, efeito descrito na literatura como associado a *asp*.

Além disso, o comprimento médio do parênquima paliçádico dos parentais brilhantes foi menor do que o dos parentais com tegumento opaco, estando em concordância com dados prévios da literatura.

Outro parâmetro diferenciador entre sementes brilhantes e opacas foi a porcentagem de absorção de água. Os valores foram expressivamente elevados na variedade SAF, comparativamente a SAB. Esses valores sugerem que *asp* pode apresentar efeito sobre a absorção de água. No entanto, DN e P-152 apresentaram padrão similar de absorção de água. Por serem uma cultivar e uma linhagem avançada, respectivamente, muitas características podem ter sido selecionadas durante seu melhoramento. Desse modo, é provável que outros genes estejam relacionados à propriedade de absorção de água ou que esse parâmetro seja uma resposta fisiológica às condições da semente.

A quantidade de fenois, taninos totais e condensados pode constituir um fator interferente na absorção de água. Modelos de herança genética destes compostos são complexos e não completamente elucidados.

Os métodos de determinação de fenois e taninos aplicados no estudo mostraram-se limitados para diferenciar sementes brilhantes e opacas. No entanto, observou-se que a quantidade de taninos condensados diferiu entre SAB e SAF e entre P-152 e DN, com maior quantidade nas sementes de tegumento brilhante.

O método de vanilina indicou ser adequado para avaliar qualitativamente genótipos contrastantes para produção de pró-antocianidinas.

As caracterizações do presente estudo constituem subsídios imprescindíveis para análises da segregação do brilho nas populações dos cruzamentos entre as variedades estudadas e, posteriormente, a detecção de marcadores moleculares associados. Além disso, fornecem bases para estudos que visem relacionar o brilho do tegumento a importantes caracteres culinários e agrônômicos (resistência a insetos e doenças).

REFERÊNCIAS

BARAHONA, R.; LASCANO, C. E.; COCHRAN, R.; MORRILL, J.; TITGEMEYER, E. C. Intake, digestion, and nitrogen utilization by sheep fed tropical legumes with contrasting tannin concentration and astringency. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 75, p. 1633–1640, 1997.

BASSETT, M. J. Development of a protocol for determining the genotype of seed coat color and color pattern in common bean. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Prosser, WA, v. 35, p. 191-192, 1992.

_____. The margo (*mar*) seed coat color gene is a synonym for the Joker (*j*) locus in common bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 121, p. 1028-1031, 1996.

_____. A test cross protocol for determining the genotype of dark red seedcoat colors in common bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 123, p. 1048–1052, 1998a.

_____. The genotype for seed coat color and pattern of breeding line 5-593, 1998. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Prosser, WA, v. 41, p. 191-192, 1998b.

_____. The seed coat color genotype of 5-593, the recurrent parent for many genetic stocks of common bean maintained as PI lines at Pullman, WA. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Prosser, WA, v. 46, p. 37-38, 2003.

_____. Genetics of seed coat color and pattern in common bean. In: JANICK, J. (Ed.). **Plant breeding reviews**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2007. cap. 8. (Plant Breeding Reviews Series, 28).

BASSETT, M. J.; McCLEAN, P. E. A brief review of the genetics of partly colored seed coats in common bean. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Prosser, WA, v. 43, p. 99–101, 2000.

BASSETT, M. J.; LEE, R.; SYMANIETZ, T.; McCLEAN, P. E.. Inheritance of reserve margo seedcoat pattern and allelism between the genes *J* and *L* for partly colored seedcoat pattern in common bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 127, p. 56–61, 2002.

BENINGER, C. W.; HOSFIELD, G. L.; NAIR, M. G. Flavonol glycosides from the seedcoat of a new Manteca-type dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, p. 2906-2910, 1998.

BENINGER, C. W.; HOSFIELD, G. L. Astragalin (kaempferol 3-Oglucoside) and proanthocyanidins are the main flavonoid compounds of four *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Prosser, WA, v. 47, p. 119-120, 1999a.

_____. Flavonol glycosides from Montcalm dark red kidney bean: implications for the genetics of seed coat color in *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, p. 4079-4082, 1999b.

BENINGER, C. W.; HOSFIELD, G. L. Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 7879-7883, 2003.

BENINGER, C. W.; HOSFIELD, G. L.; BASSETT, M. J.; OWENS, S. Chemical and morphological expression of the B and Asp seedcoat genes in *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 125, p. 52-58, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Instrução normativa n. 12**. Brasília, DF, 2008. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18540>>.

BUSHEY, S. M.; HOSFIELD, G. L.; BENINGER, C. W. Water uptake and its relationship to pigment leaching in black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Prosser, WA, v. 43, p. 104-105, 2000.

_____. The role of the epicuticular wax layer in water movement across the bean seed coat. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Prosser, WA, v. 45, p. 12-13, 2002.

CABRERA, A.; MARTIN, A. Genetics of tannin content & its relationship with flower and testa colours in vicia-faba. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 113, p. 93-98, 1989.

CALDAS, G. V.; BLAIR, M. W. Inheritance of seed condensed tannins and their relationship seed coat color and pattern genes in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 119, p. 131-142, 2009.

CIAT. **Condiciones del campo para realizar las evaluaciones del germoplasma de frijol**. Cali, 1976. 11 p.

DÍAZ, A. M.; CALDAS, G. V.; BLAIR, M. W. Concentrations of condensed tannins and anthocyanins in common bean seed coats. **Food Research International**, Essex, v. 43, p. 595-601, 2010.

ELIA, F. M.; HOSFIELD, G. L.; UEBERSAX, M. A. Genetic analysis and interrelationships between traits for cooking time, water absorption, and protein and tannin content of Andean dry beans. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 122, p. 512-518, 1997.

EMPRAPA. **Feijão**. Santo Antônio de Goiás, GO: Embrapa Arroz e Feijão, 2010. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/>>. Acesso em: 09 mar. 2011.

FREYRE, R.; SKROCH, P.; GEFFROY, V.; ADAM-BLONDON, A. F.; SHIRMOHAMADALI, A.; JOHNSON, W.; LLACA, V.; NODARI, R.;

PEREIRA, P.; TSAI, S. M.; TOHME, J.; DRON, M.; NIENHUIS, J.; VALLEJOS, C.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core map and alignment of RFLP maps. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, p. 847–856, 1998.

HE, F.; PAN, Q. H.; SHI, Y.; DUAN, C. Q. Biosynthesis and genetic regulation of proanthocyanidins in plants. **Molecules**, Basel, v. 13, p. 2674-2703, 2008.

HOSFIELD, G. L. Seed coat color in *Phaseolus vulgaris* L.: its chemistry and associated health related benefits. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Prosser, WA, v. 43, p. 1-9, 2000.

HÜMMER, W.; SCHREIER, P. Analysis of proanthocyanidins. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 52, p. 1381-1398, 2008.

JUNK-KNIEVELL, D. C.; VANDENBERG, A.; BETT, K. E. Slow darkening in pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is controlled by a single major gene. **Crop Science**, Madison, v. 48, p. 189-193, 2008.

LAMPRECHT, H. Zur Genetik von *Phaseolus vulgaris*. XVII-XVIII. Zwei neue Gene für Abzeichen auf der Testa, Punc und Mip, sowie über die Wirkung von V und Inh. **Hereditas**, Lund, v. 26, p. 292-304, 1940.

LAMPRECHT, H. The synonymy of the genes Sh and D with J and B for the seed coat colour of *Phaseolus vulgaris*. **Agri Hortique Genetica**, Landskrona, Swedish, v. 18, p. 205-208, 1960.

LEAKEY, C. L. A. Genotypic and phenotypic markers in common bean. In: GEPTS, P. (Ed.) **Genetic resources of *Phaseolus* beans**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 245-327.

LI, Y. G.; TANNER, G.; LARKIN, P. The DMACA-HCl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 70, p. 89–101, 1996.

MAKKAR, H. P. S.; BLUMMEL, M.; BECKER, K. Gravimetric determination of tannins and their correlation with chemical and protein precipitation methods. **Journal of the Science of Food Agriculture**, London, v. 61, p. 161-165, 1993.

MCCLEAN, P. E.; LEE, R. K.; OTTO, C.; GEPTS, P.; BASSETT, M. J. Molecular and phenotyping mapping of genes controlling seed coat pattern and color in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **The Journal of Heredity**, Washington, DC, v. 93, n. 2, p. 142-152, 2002.

MIKLAS, P. N.; DELORME, R.; STONE, V.; DALY, J. M.; STAVELY, J. R.; STEADMAN, J. R.; BASSETT, M. J.; BEAVER, J. S. Bacterial, fungal, and viral disease resistance loci mapped in a recombinant inbred common bean population ('Dorado'/ XAN 176). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 125, p. 476–481, 2000.

MIRA, L.; FERNANDEZ, M. T.; SANTOS, M.; ROCHA, R.; FLORENCIO, M. H.; JENNINGS, K. R. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their antioxidant activity. **Free Radical Research**, London, v. 36, p. 1–10, 2002.

NAVARRO, F.; SASS, M. E.; NIENHUIS, J. Identification and confirmation of quantitative trait loci for root rot resistance in snap bean. **Crop Science**, Madison, v. 48, p. 962-972, 2008.

NAVARRO, F.; SASS, M. E.; NIENHUIS, J. Marker-facilitated selection for a major QTL associated with root rot resistance in snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Crop Science**, Madison, v. 49, p. 850-856, 2009.

OLIVEIRA, W. S.; MEINHARDT, L. W.; SESSITSCH, A.; TSAI, S. M. Analysis of *Phaseolus-Rhizobium* interactions in a subsistence farming system. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 203, p. 107-115, 1998.

OLIVEIRA, W. S.; TSAI, S. M. Bean cultivation in a subsistence farming system in the northeast of São Paulo State – Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, p. 265-269, 2001.

PÉREZ-VEGA, E.; PAÑEDA, A.; RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C.; CAMPA, A.; GIRALDEZ, R.; FERREIRA, J. J. Mapping of QTLs for morpho-agronomic and seed quality traits in a RIL population of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 120, n. 7, p. 1367-1380, 2010.

PORTER, L. J.; HRSTICH, L. N.; CHAN, B. G. The conversion of procyanidins and prodelfinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, Oxford, v. 25, p. 223–230, 1986.

SOUZA, F. H. D.; MARCOS-FILHO, J. The seed coat as a modulator of seed-environmental relationships in Fabaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 365-375, 2001.

XIE, D. Y.; DIXON, R. A. Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers? **Phytochemistry**, Oxford, v. 66, p. 2127-2144, 2005.

4 ANÁLISE GENÉTICA E DETECÇÃO DE MARCADORES AFLP ASSOCIADOS AO BRILHO DO TEGUMENTO EM FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

RESUMO

Variedades de feijoeiro com tegumento brilhante são comumente rejeitadas pelos consumidores pela sua dificuldade de cozimento. No entanto, é possível que essa característica aumente a resistência a insetos e patógenos, aspecto importante para o melhoramento. O gene para o brilho do tegumento é *Asper* (*Asp*), sendo comumente confundido com *Joker* (*J*), este que influencia a cor e também o brilho, sendo o precursor de pró-antocianidinas, polifenóis envolvidos no endurecimento das sementes. *Asp* limita a acumulação de antocianinas e se encontra mapeado no grupo de ligação 7 (B7) do feijoeiro, no entanto, ainda não se dispõe de um marcador molecular específico para a característica. Desse modo, foram caracterizadas (fenotípica e bioquimicamente) variedades de feijoeiro contrastantes para o brilho e cruzamentos entre as mesmas, observando que *Asp* segregava, mas não *J* (capítulo anterior). A segregação de *Asp* foi avaliada nas gerações F₂ e F₃ e foi realizada busca de marcadores AFLP associados. Os cruzamentos foram: Serro Azul Fosco x Serro Azul Brilhante (variedades crioulas brasileiras) e Puebla-152 (genótipo mexicano brilhante) x Diamante Negro (cultivar opaca). Em ambos os cruzamentos a segregação foi de acordo com as proporções esperadas (3:1 em F₂ e 5:3 em F₃) sendo o fenótipo brilhante o predominante nas populações. Posteriormente, 75 progênies F_{2,3} do cruzamento Puebla-152 x Diamante Negro foram genotipadas por AFLP. Foi usada a metodologia de *Bulk Segregant Analysis* (BSA) incluindo os parentais e dois *bulks* (progênies brilhantes e opacas). Foram identificados cinco marcadores provavelmente ligados a *Asp*: um de cerca de 400 pb em repulsão e os demais (variando entre 400 e 600 pb) em associação. As bandas foram avaliadas nas progênies F_{2,3}, no entanto, mostraram serem falsos positivos. Mais análises são necessárias para prover marcadores mais confiáveis para essa característica. Análises de sintonia com o genoma da soja e de marcadores microssatélites poderiam ser empregadas para esta finalidade.

Palavras-chave: Brilho. Segregação. AFLP. *Bulk Segregant Analysis*.

ABSTRACT

Common bean varieties with shiny seed coat are commonly rejected by consumers due to their difficult cooking. However, this trait could confer natural resistance to diseases and pests, important aspect for breeding. The gene for shininess is the *Asper* (*Asp*), commonly mistaken with *Joker* (*J*), which influences color but also shininess, being the precursor of proanthocyanidins, polyphenols involved in bean hardening. *Asp* limits accumulation of anthocyanins and is mapped to linkage group 7 (B7) in common bean, but we still lack a consistent molecular marker for this trait. Therefore, we characterized (phenotypically and biochemically) varieties contrasting for shininess and their crosses, observing that *Asp* varied among them, but no *J* (previous chapter). Segregation of *Asp* was evaluated in F₂ and F₃ and associated AFLP markers were searched. The crosses were: Shiny Serro Azul x Dull Serro Azul (Brazilian landraces) and Puebla-152 (shiny Mexican landrace) x Diamante Negro (dull cultivar). In both crosses segregation fitted the expected proportions (3:1 in F₂ and 5:3 in F₃) being the shiny phenotype the predominant in the populations. Then, 75 F_{2:3} lines of the cross Puebla-152 x Diamante Negro were scored for AFLP. Bulk Segregant Analysis was used, including the parents and two bulks (shiny and dull lines). We identified five putative markers linked to *Asp*, one near 400 bp in repulsion and the others in association, varying from near 400 to 600 bp. Those bands were evaluated in all F_{2:3} lines and linkage was analyzed. However, all bands found showed to be false positives. Further analyses are needed in order to provide reliable markers for this trait. Sintony analyses with soybean genome and microsatellite markers could be useful for that purpose.

Key-words: Shininess. Segregation. AFLP. Bulk Segregant Analysis.

4.1 Introdução

No mapa genético do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) encontram-se ordenados diversos genes que controlam características específicas do tegumento. Marcadores morfológicos, como para o brilho do tegumento, também se encontram mapeados. No entanto, ainda não foi encontrado um marcador molecular específico associado ao gene do brilho do tegumento, desconhecendo-se a(s) proteína(s) ou outro(s) composto(s) a que esta característica está relacionada.

São descritos diversos genes associados à cor do tegumento em feijoeiro: *P*, *C*, *R*, *J*, *D*, *G*, *B*, *V*, *Rk*, dentre outros. Também, são descritos genes relacionados ao padrão do tegumento. Nessa listagem, dois têm sido associados à característica do brilho do tegumento, *Asper* (*Asp*) e *Joker* (*J*). No entanto, os dois genes são frequentemente confundidos quanto aos efeitos que produzem. Bassett (1996), em seus extensivos estudos com o tegumento de feijoeiro, esclareceu a diferença *Asp* e *J*. O alelo *asp* produz um tegumento mais opaco do que *j*, mas não altera a coloração. O alelo *asp* é mais frequente nas cultivares de feijoeiro do que *j*. Assim, o único efeito visível de *asp* é o tegumento opaco, enquanto que *j* afeta não somente o brilho, mas também o padrão de cor ao longo do tegumento. Quando o genótipo é *jj*, a região da corona é normalmente descolorida e o tegumento apresenta aspecto opaco. Dessa forma *j* sempre produz uma coloração mais pálida do tegumento do que seria esperado com *J* (BASSETT, 1996).

Asp apresenta dois alelos conhecidos (BASSETT, 1996), enquanto que *J* é multi-alelético (BASSETT, 2007). Os dois genes encontram-se mapeados no mapa consenso do feijoeiro (FREYRE et al., 1998), sendo que *J* está localizado no grupo de ligação 10 (B10) (McCLEAN et al., 2002) e *Asp* no grupo 7 (B07) (MIKLAS et al., 2000; PÉREZ-VEGA et al., 2010) (Figura 4.1).

Recentemente foi encontrado um marcador molecular RAPD ligado a *J* (BASSETT et al., 2002), e este foi convertido a um STS (*Sequence Tag Site*) para mapeamento de linhagens recombinantes (RILs) oriundas do cruzamento BAT 93 x Jalo EEP558 (McCLEAN et al., 2002). No entanto, o marcador RAPD é limitado ao *pool* mesoamericano (BASSETT et al., 2002). A variabilidade alélica de *j* dificulta o estabelecimento de um marcador específico para o gene.

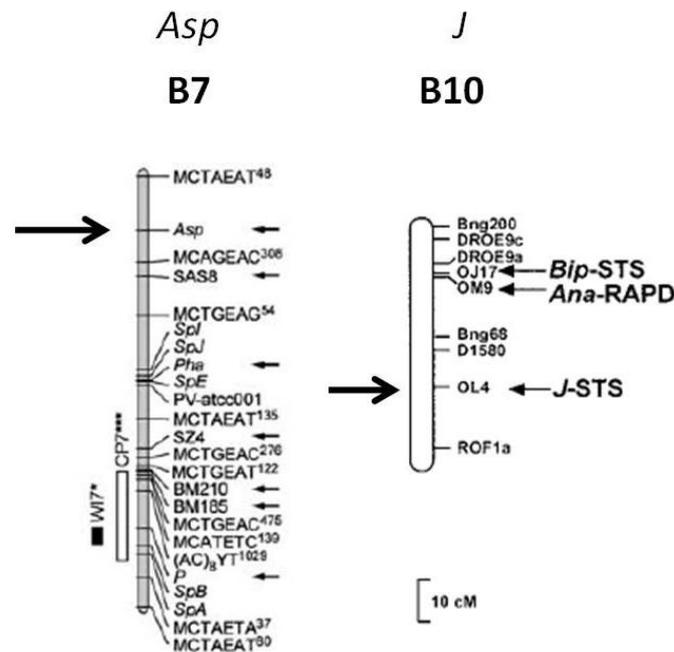


Figura 4.1 – Posição relativa dos locos *Asp* e *J* nos grupos de ligação do mapa genético do feijoeiro. Fontes: Pérez-Vega et al. (2010) e McClean et al. (2002)

Trabalhos também mapearam o gene *Asp*, no entanto, apenas como marcador fenotípico em uma população de mapeamento (MIKLAS et al., 2000; PÉREZ-VEGA et al., 2010).

Análises genéticas mostraram segregação monogênica de *Asp* (MIKLAS et al., 2000; PÉREZ-VEGA, 2010). No entanto, para o loco *J*, Bassett (2003) descreve que não é possível classificação mendeliana precisa em populações, pois os efeitos do gene são muito variáveis, visto que o mesmo interage com outros locos. Desse modo, os limites entre classes genotípicas para o loco são praticamente imperceptíveis.

Utilizando dados da genotipagem previamente apresentados (capítulo anterior), teve-se por objetivo estudar o controle genético do brilho do tegumento em cruzamentos entre variedades crioulas e cultivares de *P. vulgaris* contrastantes para brilho do tegumento. Esses dados constituíram a base para o rastreamento de prováveis marcadores moleculares AFLP associados ao brilho do tegumento, para fins de mapeamento da característica. Nas populações testadas, a hipótese foi que *Asp* controla o brilho e segrega na proporção 3:1 na geração F_2 , sendo que *J* não segrega. Portanto, o marcador AFLP a ser detectado estaria associado a *Asp*.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Variedades analisadas

Foram analisadas as variedades de feijoeiro Serro Azul, Puebla-152 e Diamante Negro. A variedade crioula Serro Azul, cultivada tradicionalmente por pequenos produtores da região de Cunha, São Paulo, apresenta diversidade genética (observada em nível morfológico e molecular), refletindo-se nas características das sementes. Foram estudadas sementes dessa variedade contrastantes para brilho do tegumento, sendo denominadas: Serro Azul Brilhante (SAB - tegumento de cor marrom e brilhante) e Serro Azul Fosco (SAF - tegumento de cor cinza e opaco). Em uma coleta de lote de sementes de dois quilogramas de Serro Azul Fosco foi observado que 10 dentre todas as sementes apresentavam tegumento brilhante. Essas sementes foram separadas e semeadas em vasos em casa de vegetação, tendo sido cruzadas com o Serro Azul Fosco. Sementes brilhantes e opacas foram frequentemente multiplicadas, para fixar a característica do tegumento. Dois cruzamentos realizados entre SAF e SAB (SAF x SAB e SAB x SAF) foram avançados até F₃.

Além disso, foi avaliada uma população segregante do cruzamento entre a linhagem Puebla-152 (P-152 - mexicana) com a cultivar Diamante Negro (DN - originária do CIAT e lançada como cultivar pelo CNPAF/EMBRAPA). A linhagem Puebla-152 foi originalmente selecionada em função de sua alta capacidade de nodulação e sua potencial resistência à podridão de raiz. A cultivar Diamante Negro apresenta resistência a importantes doenças da cultura do feijoeiro como o crestamento bacteriano e o vírus do mosaico. A geração F₁ do cruzamento P-152 x DN foi avançada até F₃ (EMBRAPA, 2010).

4.2.2 Análise da segregação do brilho do tegumento

Após o cruzamento entre os parentais SAF (genitor feminino) e SAB (genitor masculino), e o recíproco, a F₁ resultante foi avançada para F₂ em casa de vegetação, no ano de 1999. Os dois cruzamentos realizados foram multiplicados, gerando 121 (cruzamento 1) e

163 (cruzamento 2) progênies $F_{2:3}$, respectivamente. Uma amostra de dez sementes de cada família foi avançada para a geração F_3 (progênies $F_{3:4}$), em 2009, durante a estação seca (entre abril e julho), em propriedade de hortifrutigranjeiros, situada no Bairro Campestre, Piracicaba, SP. As sementes foram coletadas de cinco plantas individuais representantes de cada progênie, sendo retirada uma amostra de cerca de seis vagens por planta. As vagens foram postas à secagem em casa de vegetação durante cerca de uma semana. Após o processamento, as sementes foram armazenadas em câmara fria ($8^{\circ}\text{C} \pm 3$), até o momento das análises.

Do cruzamento entre Puebla-152 (genitor feminino) e Diamante Negro (genitor masculino), foram obtidas 75 progênies $F_{2:3}$ segregantes para a característica do brilho, em 1996, em casa de vegetação. Em 2010, a população foi avançada para $F_{3:4}$, da mesma maneira que a do cruzamento SAF x SAB, na estação seca, no mesmo local.

Para a análise das sementes, primeiramente foram definidas classes de brilho e de cor, baseadas em observações visuais: Marrom Brilhante (MB), Marrom Fosco (MF), Cinza Brilhante (CB), Cinza Fosco (CF), para as progênies do cruzamento entre SAF e SAB; e Preto Brilhante (PB) e Preto Opaco (PO), para P-152 x DN. Cada progênie $F_{2:3}$ e $F_{3:4}$ de todos os cruzamentos foi avaliada individualmente e enquadrada nas classes (detalhes no capítulo anterior). As classes foram validadas através de medidas tomadas em colorímetro (sistema de cores $L^*a^*b^*$), verificando que as medidas de L^* diferiram o brilho entre as progênies de mesma cor (capítulo anterior).

Como o brilho do tegumento apresenta herança materna, todas as sementes de cada progênie apresentavam tegumento brilhante ou tegumento opaco, permitindo definir o genótipo da planta mãe. Para saber se uma planta F_2 apresentava genótipo do tegumento brilhante é necessário analisar sua progênie. No entanto, para saber se a planta era heterozigota para o brilho, as sementes dessa progênie deveriam ser multiplicadas para a próxima geração, verificando se a descendência iria gerar plantas com sementes brilhantes e também opacas. No presente trabalho, as duas gerações foram avaliadas separadamente (F_2 e F_3), caracterizando as progênies apenas como brilhantes ou opacas.

Anteriormente, foram definidos os genótipos de cada um dos parentais para os genes *Asp* e *J*, sendo que *J* não variou entre nenhum dos parentais, todos apresentando o alelo dominante deste gene. Desse modo, a segregação do brilho em todos os cruzamentos avaliados se deve a *Asp*.

4.2.3 Análise de similaridade genética entre as variedades e validação molecular das classes de brilho e cor

Para fins de mapeamento genético, foi verificado o polimorfismo de cada uma das variedades e também a sua similaridade genética. Inicialmente, três plantas individuais de SAB e SAF foram analisadas por marcadores moleculares AFLP, para verificar o polimorfismo e determinar o agrupamento por similaridade entre as amostras. Posteriormente, também foram analisadas plantas individuais de P-152 e DN, analisando os mesmos parâmetros, no entanto, esperando pouca ou nenhuma variação genética intra-varietal, considerando que estas variedades encontram-se avançadas e, desse modo, com a maioria dos locos em homozigose. SAB, SAF, P152 e DN foram também analisadas conjuntamente, para verificar a similaridade e o agrupamento entre as mesmas.

Posteriormente, foram comparadas três progênes de cada classe fenotípica previamente definida (MB, MF, CB, CO, PB e PO), visando verificar se os marcadores AFLP permitem o discernimento entre as classes, validando-as através da análise molecular.

Para estas análises foram usadas três combinações de *primers* AFLP, listadas na Tabela 4.1.

4.2.4 Detecção de bandas diferenciadoras entre as variedades

Análises de AFLP com combinações de *primers* específicas foram realizadas para detectar bandas diferenciadoras entre as variedades, visando encontrar possíveis bandas que pudessem estar associadas à característica do tegumento brilhante.

4.2.5 População de mapeamento e *Bulk Segregant Analysis* (BSA)

P-152 e DN, por serem uma linhagem avançada e uma cultivar, respectivamente, apresentam maior homozigose e contrastam para diversas características, tendo sido selecionadas como parentais para mapeamento do brilho. Visando encontrar marcadores moleculares AFLP associados à característica, foi avaliada uma população F_2 (progênies $F_{2:3}$ em *bulk*) com 75 progênies segregantes para brilho do tegumento, o que foi verificado na análise genotípica.

Os parentais e 10 sementes de cada família $F_{2:3}$ foram semeados em bandejas em casa de vegetação para obter tecidos foliares para extração de DNA. Nas coletas, quantidade uniforme de tecido foliar (cerca de 2 g) foi coletado de cada uma das plantas das linhagens, formando-se *bulks* por progênie.

Para iniciar o mapeamento do brilho, foi seguido o método de Michelmore, Paran e Kesseli (1991) de *Bulk Segregant Analysis* (BSA), em que quatro progênies brilhantes foram misturadas, formando o *bulk* brilhante, e outras quatro progênies, avaliadas por apresentarem tegumento opaco, compuseram o *bulk* opaco. Para verificar falsos positivos, após a análise do primeiro par de *bulks*, foi composto um segundo par, misturando-se 10 progênies brilhantes em um e 10 opacas no outro.

4.2.6 Extração de DNA e técnica de AFLP

O método de extração de DNA utilizado foi adaptado de Doyle e Doyle (1990). As amostras de tecido foliar foram congeladas em nitrogênio líquido e maceradas em tubos plásticos tipo *Eppendorf*. Em seguida, adicionou-se ao material 700 μL de tampão de extração CTAB 2%. Os tubos foram levados para banho-maria a 65 °C durante 30 minutos, sendo agitados por inversão a cada dez minutos. Posteriormente, foram adicionados ao extrato 650 μL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) para formar uma emulsão. As amostras foram centrifugadas por cinco minutos a 14.000 rpm para separar as fases. Em seguida, retirou-se o sobrenadante e repetiu-se as lavagens com clorofórmio-álcool isoamílico por mais duas vezes. Da fase superior (aquosa), retirou-se 500 μL e transferiu-se para um tubo *Eppendorf* no

qual foi adicionado o mesmo volume de álcool isopropílico para precipitar o DNA. O material foi armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos e centrifugado por cinco minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi lavado duas vezes com etanol 70% para remoção dos sais. A amostra de DNA (*pellet*) foi colocada para secar à temperatura ambiente *overnight*. Em seguida, a amostra de DNA foi ressuspensa em 40 μL de tampão Tris-HCl pH 8,0 tratado com RNase (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A concentração do DNA foi estimada em espectrofotômetro tipo Nanodrop. Logo após, foi avaliada a qualidade das amostras, aplicando-se 5 μL de cada em gel de agarose 1%, corado com o reagente Gel Red.

Para proceder com as análises de AFLP, todas as amostras foram diluídas a 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Nas análises de AFLP, foram adotados os procedimentos de Vos et al. (1995), com modificações, seguindo-se quatro etapas:

(i) Digestão do DNA: cerca de 200 ng de DNA foram digeridos com duas enzimas, uma de corte raro (*EcoRI*) e uma de corte frequente (*Mse-I*). A digestão foi realizada em volume de 50 μL contendo 5 U de *Eco-RI* (Fermentas), 5 U de *Mse-I* (Fermentas) e 5 μL de tampão de digestão REACT 1 (Invitrogen). A solução de digestão foi incubada em termociclador durante 3 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a restrição do DNA e, em seguida, por 15 min a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a inativação das enzimas.

(ii) Ligação de adaptadores: adaptadores específicos para cada uma das enzimas da digestão foram ligados às extremidades dos fragmentos de DNA gerados (Tabela 4.1). Os adaptadores de fita dupla foram previamente preparados misturando-se quantidades equimolares dos dois oligos de fita simples (20 μM para adaptadores *Mse-I*, 5 μM para adaptadores *Eco-RI*). A solução foi aquecida a uma temperatura de 94°C por 2 minutos e deixada esfriar lentamente. A reação de ligação foi preparada em volume de 10 μL [1X de tampão de ligação T4 DNA ligase, 1 μM de adaptador *Mse-I*, 0,1 μM de adaptador *Eco-RI* e 1 U de T4 DNA ligase (New England Biolabs)] e adicionada à reação de digestão anterior. A ligação foi realizada em termociclador à 20°C durante dez horas.

Tabela 4.1 – Sequências dos adaptadores, primers da pré-amplificação e combinações de primers EcoRI/MseI testadas nos parentais Puebla-152 (tegumento brilhante) e Diamante Negro (tegumento opaco) e em bulks de famílias F_{2,3}, derivadas do cruzamentos entre os parentais

Sequências dos adaptadores					
Adaptador EcoRI			Adaptador MseI		
5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'			5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'		
3'-CTGACGCATGGTTAA-5'			3'-TACTCAGGACTCAT-5'		
Primers da pré-amplificação					
Primer EcoRI-A			Primer MseI-A		
5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'			5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'		
Primers da amplificação seletiva					
EcoRI-N	5'-GACTGCGTACCAATTCAN-3'				
EcoRI-NN	5'-GACTGCGTACCAATTCANN-3'				
EcoRI-NNN	5'-GACTGCGTACCAATTCANNN-3'				
MseI-N	5'-GATGAGTCCTGAGTAACN-3'				
MseI-NN	5'-GATGAGTCCTGAGTAACNN-3'				
MseI-NNN	5'-GATGAGTCCTGAGTAACNNN-3'				
Combinações de primers testadas					
1 E-AC / M-CC	11 E-AC / M-G	21 E-AT / M-CG	31 E-AC / M-CTC	41 E-ACG / M-CTC	
2 <u>E-AA / M-CC**</u>	12 E-AC / M-G	22 E-AT / M-CT	32 <u>E-AT / M-CTC**</u>	42 E-ACG / M-CAC	
3 E-AA / M-0	13 E-AC / M-CA	23 E-AT / M-C	33 E-AA / M-CAC	43 E-AAA / M-CGC	
4 E-AA / M-T	14 E-AC / M-CG	24 E-AG / M-0	34 E-AG / M-CAC	44 E-AAA / M-CTC	
5 E-AA / M-G	15 E-AC / M-CT	25 E-AA / M-CGC	35 E-AC / M-CAC	45 E-AAA / M-CAC	
6 E-AA / M-CA	16 E-AC / M-C	26 E-AG / M-CGC	36 E-AT / M-CAC	46 E-AAA / M-CA	
7 E-AA / M-CG	17 E-AT / M-0	27 E-AC / M-CGC	37 E-AGC / M-CAC	47 E-AAA / M-CC	
8 E-AA / M-CT	18 E-AT / M-T	28 E-AT / M-CGC	38 E-AGC / M-CTC	48 E-AAA / M-C	
9 E-AA / M-C	19 E-AT / M-G	29 E-AA / M-CTC	39 <u>E-AGC / M-CAC**</u>	49 E-AAA / M-CT	
10 E-AC / M-0	20 E-AT / M-CA	30 E-AG / M-CTC	40 E-ACG / M-CGC	50 E-AAA / M-A	

* Pré-amplificação: base seletiva A; Amplificação seletiva: uma, duas ou três bases.

** Combinações de *primers* usadas para a análise de similaridade genética e validação de classes fenotípicas de brilho e cor.

(iii) Reação de pré-amplificação: para a amplificação dos marcadores AFLP, primeiramente, foi realizada uma pré-amplificação com *primers* específicos, acrescidos de uma base seletiva, sendo a base A para o *primer* EcoRI e para o MseI (Tabela 4.1). A reação foi realizada em um volume final de 10 µL contendo 2,5 U de Taq DNA polimerase (Promega), 1X tampão da Taq DNA polimerase (Promega), 1,5 µM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 125 nM de cada *primer*, e 2,5 µl de DNA digerido e ligado. A reação foi incubada a 94 °C por 2 min sendo, em seguida, submetido a 26 ciclos de 94 °C por 1 min, 56 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, e extensão final de 72 °C durante 5 minutos. Os produtos da reação

foram diluídos com 40 µL de água Milli-Q esterilizada (1 atm) e armazenados em freezer à -20°C.

(iv) Amplificação seletiva: combinações de *primers* específicos para os adaptadores acrescidos de três ou duas bases seletivas na extremidade 3' foram utilizados (Tabela 4.1). A reação foi realizada em um volume final de 20 µL contendo 1,0 U de Taq DNA polimerase (Promega), 1X tampão da Taq DNA polimerase (Promega), 1,5 µM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 50 nM do primer EcoRI, 300 nM do primer MseI e 3 µL de DNA pré-amplificado e diluído. A reação foi incubada nas seguintes condições: desnaturação inicial à 94°C por 2 min; 15 ciclos de 94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s, 72°C por 1 min, e mais 26 ciclos de 94°C por 30 s, 56°C por 30 s, 72°C por 1 min e extensão final do DNA por 5 min a 72°C.

Após a reação de amplificação seletiva, foram adicionados 8 µL de tampão de carregamento (contendo formamida) em cada amostra. As amostras foram desnaturadas em termociclador por cinco minutos à temperatura de 94°C. Posteriormente, as amostras foram carregadas em gel de poliacrilamida 6%, contendo ureia e submetidas à eletroforese à potência de 40 W (1350 volts e 30 mA aproximadamente), durante cerca de quatro horas. O procedimento de coloração do gel foi adaptado de Creste et al. (2001), utilizando nitrato de prata, para a visualização das bandas.

4.2.7 Análises estatísticas

Foi realizado um teste de qui-quadrado (χ^2) para testar a hipótese de que *Asp* controla o brilho do tegumento nos cruzamentos e de que a segregação é monogênica e está dentro das frequências esperadas pelos princípios mendelianos.

A análise de similaridade genética entre as variedades foi realizada através do programa Bionumerics, versão 5.1, utilizando o índice de similaridade de Jaccard.

A análise de agrupamento foi realizada com base na similaridade de Jaccard, e utilizando o método UPGMA (*Unweighted Pair-Group with Arithmetic Averages*).

4.3 Resultados

4.3.1 Análises da segregação

A partir dos cruzamentos entre SAF e SAB, sendo SAF o parental feminino no cruzamento 1 e SAB no 2, todas as sementes obtidas apresentaram tegumento opaco. Do cruzamento entre Puebla-152 e DN, sendo P-152 o genótipo materno, foram obtidas somente sementes brilhantes.

Na geração $F_{1;2}$ (sementes F_2) todas as sementes obtidas foram brilhantes. A partir de $F_{2;3}$ observou-se a segregação do brilho, sendo que nesta geração a segregação foi de três brilhantes para um opaco (3:1). Na geração $F_{3;4}$ a segregação foi de cinco brilhantes para três opacos (5:3). Na Tabela 4.2 são apresentadas as proporções observadas e esperadas de dois cruzamentos entre SAB e SAF (SAF x SAB; SAB x SAF) e P-152 x DN nas gerações F_2 e F_3 . Além disso, é apresentado outro cruzamento SAF x SAB, mostrando as proporções de uma progênie F_1 . Os resultados sugeriram que um gene com um alelo dominante controla o brilho do tegumento nessas variedades, que pela análise visual e morfológica (capítulo anterior), demonstrou ser *Asp*.

Tabela 4.2 – Segregação para brilho do tegumento em cruzamentos entre variedades de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) contrastantes para brilho do tegumento

Cruzamentos e gerações	Fenótipo observado		Proporções esperadas	Fenótipo esperado		χ^2	P
	<i>Asp</i> (brilhante)	<i>asp</i> (opaco)		<i>Asp</i> (brilhante)	<i>asp</i> (opaco)		
Serro Azul Fosco (SAF) x Serro Azul Brilhante (SAB)*							
Cruzamento 1 (SAF x SAB)							
$F_{2;3}$	84	37	3:1	90,75	30,25	2,008	0,16
$F_{3;4}$	356	213	5:3	355,62	213,38	0,002	0,96
Cruzamento 2 (SAB x SAF)							
$F_{2;3}$	122	41	3:1	122,25	40,75	0,001	0,97
$F_{3;4}$	479	263	5:3	463,75	278,25	1,337	0,25
SAF x SAB – F_1 e F_2 (Cruzamento 3)							
F_1	0	6	0:1	0	6	0,000	1,00
$F_{1;2}$	142	0	1:0	142	0	0,000	1,00
Puebla-152 (P-152) x Diamante Negro (DN)*							
$F_{2;3}$	54	21	3:1	56,25	18,75	0,360	0,55
$F_{3;4}$	258	160	5:3	261,25	156,75	0,108	0,74

* O genitor feminino é o primeiro genótipo mencionado.

4.3.2 Similaridade genética entre as variedades

Pré-requisito para o mapeamento de caracteres de interesse é haver divergência genética entre os parentais e segregação destas características em populações derivadas de cruzamentos entre os genótipos contrastantes. As análises de AFLP de amostras de cada uma das variedades permitiram avaliar a similaridade genética entre ambas. O dendrograma apresentado na Figura 4.2 mostrou a formação de dois grupos principais. No primeiro, foram incluídos SAB e SAF (cerca de 94% de similaridade), enquanto que P-152 e DN constituíram o segundo grupo (91% de similaridade).

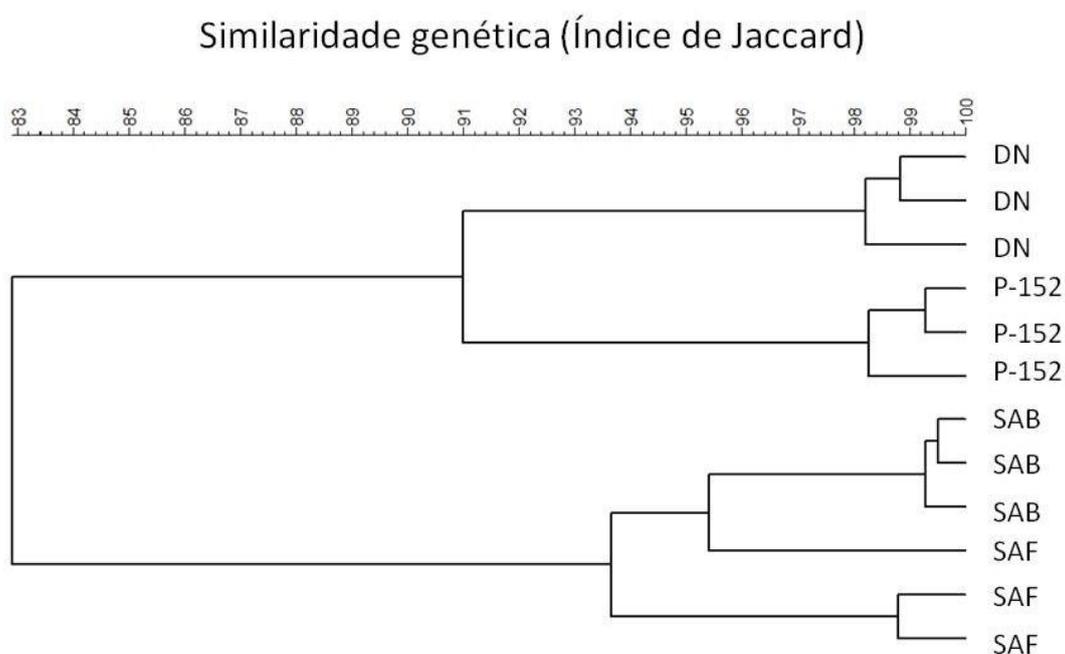


Figura 4.2 – Similaridade genética (através do Índice de Jaccard) entre variedades de feijoeiro contrastantes para brilho do tegumento, analisada a partir de marcadores AFLP. SAB – Serro Azul Brilhante; SAF – Serro Azul Fosco; P-152 – Puebla-152; DN – Diamante Negro

4.3.3 Análise molecular das progênes $F_{2:3}$ para validação das classes fenotípicas

A análise de agrupamento de três progênes $F_{2:3}$ de cada cruzamento (SAF x SAB e P-152 x DN) através de marcadores AFLP permitiu discernir as classes fenotípicas de cor (Marrom, Cinza e Preto). No entanto, não houve distinção clara entre as classes brilhante e opaca, no caso do cruzamento SAF x SAB. As classes PB e PO, do cruzamento P-152 x DN foram coerentemente separadas. Na Figura 4.3 é apresentado o dendrograma referente a esta análise.

As classes CB e CF (SAF x SAB) constituíram um grupo separado de MB e MF, com cerca de 81% de similaridade entre Cinza e Marrom. PB e PO (P-152 x DN) apresentaram similaridade de 86%.

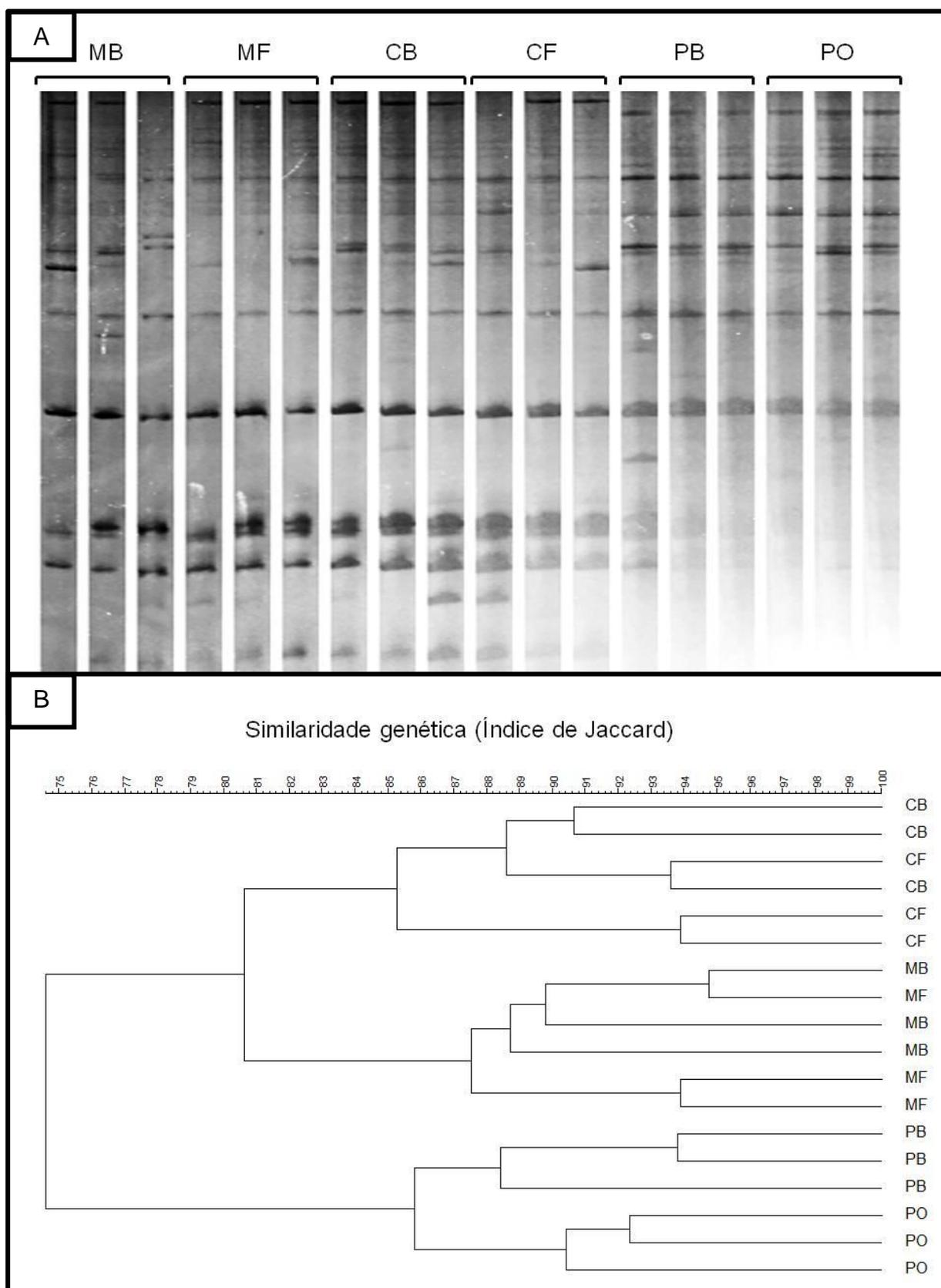


Figura 4.3 – Similaridade genética (através do Índice de Jaccard) entre progênies F2:3 dos cruzamentos SAF x SAB e P-152 x DN, classificadas de acordo com o brilho e a cor do tegumento: MB – Marrom Brilhante; MF – Marrom Fosco; CB – Cinza Brilhante; CF – Cinza Fosco; PB – Preto Brilhante; PO – Preto Opaco. (A) Perfil eletroforético com combinação de primers E-AGC/ M-CAC. (B) Análise de agrupamento a partir de três combinações de primers (E-AA/ M-CC; E-AT/ M-CTC; E-AGC/ M-CAC)

4.3.4 Detecção de bandas únicas

Através da análise de diversas combinações de *primers* foi possível detectar bandas diferenciadoras entre os parentais. SAB apresentou um fragmento de aproximadamente 2.000 pb, que não foi amplificado em nenhum indivíduo de SAF. Também, DN apresentou uma banda de mesmo tamanho, esta ausente em todas as amostras de P-152 (Figura 4.4). Apesar de apresentarem o mesmo tamanho, no entanto, os fragmentos não puderam ser considerados iguais, sendo necessário seu sequenciamento.

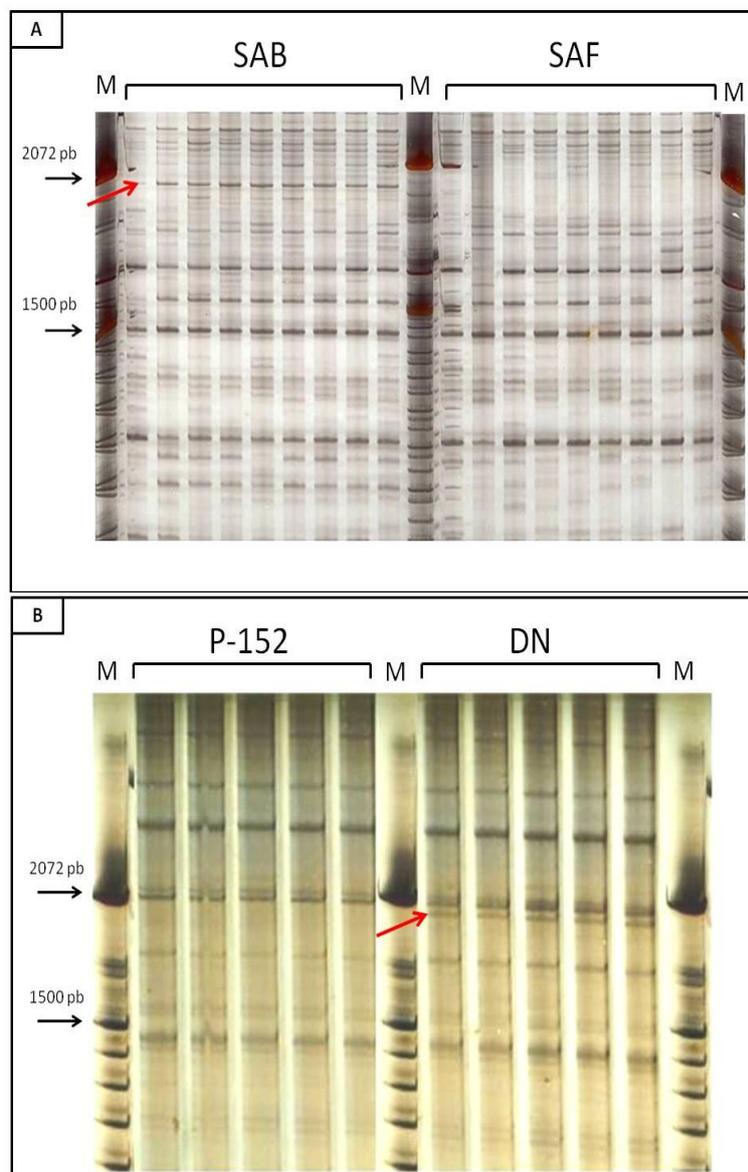


Figura 4.4 – (A) Banda diferenciadora entre as variedades de feijoeiro Serro Azul Brilhante (SAB - tegumento brilhante) e Serro Azul Fosco (SAF - tegumento opaco), detectada através da combinação de *primers* AFLP EcoRI-AA/ MseI-CC; (B) Banda diferenciadora entre Puebla-152 (P-152 – tegumento brilhante) e Diamante Negro (DN – tegumento opaco), através dos *primers* AFLP EcoRI-A/ MseI-CC

4.3.5 Detecção de marcadores AFLP associados ao brilho do tegumento

Dentre as 50 combinações de *primers* testadas, em apenas quatro (EcoRI-AT/MseI-T; EcoRI-AT/MseI-CTC; EcoRI-AG/MseI-CAC; EcoRI-AGC/MseI-CAC) foram identificadas bandas de interesse (total de cinco bandas), provavelmente associadas à característica do brilho do tegumento. Um dos fragmentos (400 pb) foi encontrado apenas no parental DN (opaco) e no *bulk* opaco. Os demais quatro fragmentos variaram entre 400 e 600 pb e foram detectados apenas no parental P-152 (brilhante) e no *bulk* brilhante. Na Figura 4.5 foram apresentados os fragmentos detectados.

Outras bandas também foram encontradas, no entanto, por apresentarem fraca intensidade, não foram consideradas para as análises posteriores, com o segundo *bulk*.

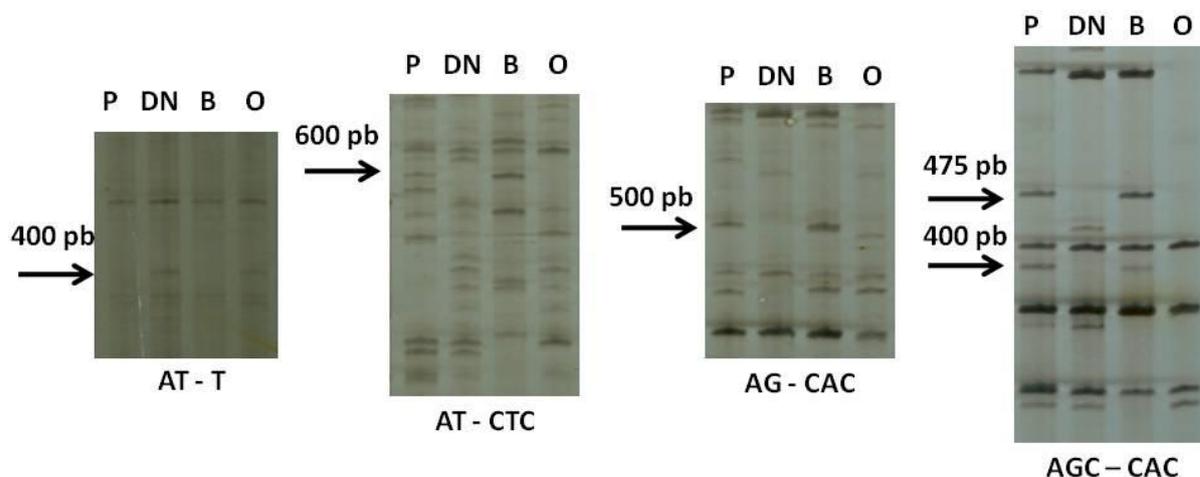


Figura 4.5 - (A) Primers AFLP testados e (B) bandas candidatas associadas ao brilho do tegumento, obtidas por *Bulk Segregant Analysis* (BSA) em população derivada do cruzamento entre Puebla-152 (tegumento brilhante) e Diamante Negro (tegumento opaco). 1: parental Puebla-152; 2: Parental Diamante Negro; 3: Linhagens de tegumento brilhante; 4: Linhagens de tegumento opaco

No entanto, quando as amostras foram também comparadas com o segundo *bulk* de cada categoria (brilhante e opaco), cada fragmento detectado mostrou ser falso positivo. Apesar de estar presente somente no parental brilhante e no *bulk* brilhante ou no outro conjunto, o fragmento não se repetiu no segundo *bulk*. Desse modo, nenhum dos fragmentos pode ser precisamente associado ao brilho do tegumento.

4.4 Discussão

A presença de brilho no tegumento é determinada anteriormente à fecundação, pois o tegumento é formado a partir do desenvolvimento dos integumentos dos óvulos do parental materno (SCHUURMANS et al., 2003). Desse modo, os resultados deste trabalho foram condizentes, pois as sementes derivadas do cruzamento entre os parentais (F_1) sempre apresentaram o fenótipo do parental feminino (SAF com tegumento opaco ou SAB com tegumento brilhante; e P-152 com tegumento brilhante).

Os resultados mostraram que o gene *Asp* segrega nas populações analisadas, de acordo com as proporções esperadas por princípios mendelianos. Outros trabalhos também avaliaram o controle genético do brilho em variedades de feijoeiro, encontrando resultados semelhantes. Koenig e Gepts (1989) estudaram a segregação e ligação entre diversos genes de proteínas, isoenzimas e caracteres morfológicos em feijoeiro, entre eles o brilho do tegumento. A segregação em uma população F_2 derivada do cruzamento BTS ('Black Turtle Soup') x Peru 34 foi de 3:1 (brilhante: opaco). Miklas et al. (2000) estudaram a segregação de diversos locos ligados à resistência a doenças e também genes condicionantes de cor e o loco *Asp*, verificando segregação nas proporções esperadas de uma geração F_5 (progênies $F_{5:7}$) do cruzamento entre Dorado x Xan 176. Pérez-Vega et al. (2010) utilizaram uma população de 104 RILs em F_7 – cruzamento Xana x Cornell 49242 – para mapear entre outros locos, *Asp* (apenas como marcador fenotípico). Os autores verificaram que o loco segregou na proporção 1:1 (brilhante:opaco), como esperado em F_7 .

Aspecto importante do presente trabalho foi que a segregação do brilho do tegumento esteve dentro das proporções esperadas tanto dentro das populações dos cruzamentos entre SAB e SAF, feijões crioulos, sem qualquer grau de seleção para fins de melhoramento genético, quanto na população do cruzamento P-152 x DN, em que a maioria dos locos já se encontram fixados.

A análise comparativa entre materiais genéticos crioulos e melhorados, nesse sentido, auxilia na elucidação do controle genético do brilho nestas populações. Genótipos selecionados e em estado avançado de melhoramento apresentam a maioria dos locos em homozigose. Desse modo, o cruzamento entre parentais contrastantes para o caractere do

brilho apresenta elevada possibilidade de gerar populações segregantes para a característica. Materiais crioulos podem ainda apresentar diversidade genética considerável e é possível que o gene de interesse não esteja em homozigose entre dois possíveis parentais. Desse modo, é preciso multiplicar as sementes por algumas vezes até a característica ser fixada.

As análises de AFLP nas variedades SAB e SAF mostraram polimorfismo dentro de cada variedade. Na análise de agrupamento, SAB foi separado de SAF, indicando que os dois materiais genéticos apresentam divergência considerável e podem ser utilizados para cruzamentos, avaliando-se caracteres de interesse.

O polimorfismo encontrado em P-152 e DN foi mais reduzido. As duas variedades também se apresentaram separadas no dendrograma, indicando haver divergência genética entre as mesmas e potencializando a sua utilização para fins de mapeamento genético.

As bandas diferenciadoras entre as variedades podem representar alelos específicos importantes, presentes em uma, mas ausentes no genótipo contrastante. González et al. (2005) avaliaram diversos marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) em uma população selvagem e em variedades crioulas de feijoeiro. Os autores detectaram quatro marcadores (bandas) que diferenciavam duas variedades, Negro Brilhante e Negro Opaco, que no tegumento contrastavam visualmente apenas quanto ao brilho. As variedades do presente estudo, no entanto, apresentam variação genética para inúmeras outras características, sendo, desse modo, inviável associar as bandas encontradas diretamente à característica do brilho.

Ao analisar as progênies enquadradas nas diferentes classes fenotípicas (MB, MF, CB, CF, PB e PO), o agrupamento mostrou-se relacionado com a coloração do tegumento nas amostras do cruzamentos SAF x SAB, não ocorrendo separação clara entre brilhantes e opacas. No cruzamento P-152 x DN, as classes PB e PO foram separadas nitidamente. No entanto, não foram detectadas bandas presentes apenas na classe PB ou em PO, que diferenciasses as progênies brilhantes das opacas e que pudessem constituir possíveis marcadores para serem analisados na população de mapeamento.

A detecção confiável de marcadores moleculares associados ao brilho do tegumento só é possível mediante o seu mapeamento nas populações segregantes. O método de *Bulk Segregant Analysis* (MICHELMORE; PARAN; KESSELI, 1991) tem sido amplamente

utilizado nos trabalhos na literatura, permitindo a rápida detecção de locos associados a caracteres de interesse. No entanto, as bandas detectadas no presente estudo mostraram-se falsos positivos.

A probabilidade teórica de um loco não ligado a um caractere de interesse na metodologia de BSA, considerando *bulks* de 10 indivíduos, é de apenas 2×10^{-6} (MICHELMORE; PARAN; KESSELI, 1991). No entanto, outros trabalhos também relataram elevada porcentagem de falsos positivos, utilizando a técnica de AFLP e também RAPD, sugerindo cautela nessa interpretação. Wang et al. (2002) aplicaram marcadores AFLP para o mapeamento de um gene responsável pela manutenção do crescimento de gemas apicais de pessegueiro mesmo durante o inverno. Foi avaliado um cruzamento entre variedade com esta característica e outra com deciduidade. No trabalho foi utilizada a BSA, estruturando-se dois *bulks* contrastantes. Os autores testaram 536 combinações de *primers* (considerando as enzimas EcoRI, PstI, KpnI e MseI) e encontraram fragmentos de interesse em apenas 64 combinações. No entanto, ao utilizar um segundo *bulk* para cada característica, apenas 14 dentre as combinações apresentavam fragmentos reproduzíveis entre os *bulks* da mesma categoria. Dentre os marcadores encontrados, alguns apresentaram distorção de segregação, não sendo avaliados.

O estudo de Tataranni et al. (2010) também mostrou a ocorrência de falsos positivos. Estes autores avaliaram uma população segregante para um gene responsável pelo lento amadurecimento do fruto de pessegueiro e detectaram baixo polimorfismo entre os *bulks* avaliados. Algumas bandas não se reproduziram em dois *bulks*.

Também em estudos com feijoeiro foram detectados falsos positivos, mesmo com marcadores RAPD, que geram número reduzido de bandas, ao estudar marcadores ligados à ferrugem do feijoeiro (HALEY et al., 1993) ou à antracnose (YOUNG; KELLY, 1996).

Considerando estes aspectos, seriam necessários testes com mais combinações de *primers* e sua validação com o segundo par de *bulks* para encontrar marcadores a serem testados na população inteira.

Além disso, considerando que o gene encontra-se mapeado, embora baseado em critérios fenotípicos, no grupo de ligação 7 (B7), poderiam ser analisados marcadores microssatélites situados neste grupo, buscando fragmentos ligados.

Tendo em vista a publicação do genoma da soja, seria também viável mapear o loco por análise de sintenia. Recentemente, foi mapeado um loco condicionando a expressão de uma proteína em soja que é encontrada em alta quantidade em sementes opacas comparadas com as brilhantes (GIJZEN et al., 2003). É uma proteína hidrofóbica, HPS, que provoca asma em pessoas alérgicas. Os autores mapearam a proteína e verificaram que esta cosegrega com o loco que condiciona o tegumento opaco/brilhante. Esses locos foram mapeados no grupo de ligação E da soja (GIJZEN et al., 2003). A análise de sintenia entre feijão/soja possivelmente vai permitir o mapeamento molecular do brilho do tegumento em feijão. Possivelmente, o loco do brilho na soja seja semelhante também no feijoeiro.

4.5 Conclusões

As análises dos cruzamentos SAF x SAB e P-152 x DN mostraram que o brilho do tegumento segregou de acordo com as proporções esperadas nas gerações de autofecundação. Na geração F₂, a segregação foi de três brilhantes para um opaco (3:1) e na geração F₃ a de cinco brilhantes para três opacos (5:3). Nestes cruzamentos, foram os alelos de *Asp* que segregaram, e não os de *J*.

A análise molecular por AFLP das variedades SAB e SAF mostrou polimorfismo dentro de cada uma, mas o agrupamento entre as amostras foi coerente com os fenótipos, mostrando o parental brilhante (SAB) separado do opaco (SAF).

A divergência entre os parentais P-152 e DN, mais nítida do que entre SAB e SAF, torna os primeiros mais adequados para o mapeamento do brilho do tegumento.

As análises moleculares das classes fenotípicas de brilho e cor permitiram verificar separação entre as classes de cores cinza e marrom no cruzamento SAB x SAF e entre progênies brilhantes e opacas em P-152 x DN, no entanto, não foram detectadas bandas específicas das classes brilhante ou opaca por esta análise.

A técnica de BSA permitiu identificar bandas em associação ou repulsão à característica do brilho do tegumento. No entanto, essas bandas foram confirmadas como falsos positivos ao se analisar outro conjunto de *bulks* (brilhante e opaco).

Mais análises de AFLP são necessárias, utilizando mais combinações de *primers*, para identificar marcadores ligados ao caractere.

No entanto, dado o vasto número de marcadores microssatélites no grupo de ligação 7, em que está localizado *Asp*, seria recomendado genotipar populações segregantes para verificar se algum dos microssatélites estaria ligado ao gene. Além disso, com a publicação do genoma da soja, pode ser viável mapear o gene por sintenia.

O mapeamento do brilho e o conhecimento da(s) substância(s) que este gene produz é extremamente importante para o entendimento de todos os processos em que o brilho interfere no tegumento do feijoeiro. A possível relação com resistência a doenças e ataques de insetos podem vir a tornar o brilho uma característica com maior aceitação.

REFERÊNCIAS

BASSETT, M. J. The margo (*mar*) seed coat color gene is a synonym for the Joker (*j*) locus in common bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 121, p. 1028-1031, 1996.

_____. The seed coat color genotype of 5-593, the recurrent parent for many genetic stocks of common bean maintained as PI lines at Pullman, WA. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, Prosser, WA, v. 46, p. 37-38, 2003.

_____. Genetics of seed coat color and pattern in common bean. In: JANICK, J. (Ed.). **Plant breeding reviews**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2007. cap. 8. (Plant Breeding Reviews Series, 28).

BASSETT, M. J.; LEE, R.; SYMANIETZ, T.; McCLEAN, P. E. Inheritance of reserve margo seedcoat pattern and allelism between the genes *J* and *L* for partly colored seedcoat pattern in common bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 127, p. 56-61, 2002.

CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Heidelberg, v. 19, n. 4, p. 299-306, 2001.

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

EMPRAPA. **Feijão**. Santo Antônio de Goiás, GO: Embrapa Arroz e Feijão, 2010. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/>>. Acesso em: 09/03/2011.

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

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. **Crop Science**, Madison, v. 45, p. 606-615, 2005.

GIDJZEN, M.; WENG, C.; KUFLU, K.; WOODROW, L.; YU, K.; POYSA, V. Soybean luster phenotype and surface protein cosegregate and map to linkage group E. **Genome**, Ottawa, v. 46, p. 659-664, 2003.

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

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

McCLEAN, P. E.; LEE, R. K.; OTTO, C.; GEPTS, P.; BASSETT, M. J. Molecular and phenotyping mapping of genes controlling seed coat pattern and color in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **The Journal of Heredity**, Washington, DC, v. 93, n. 2, p. 142-152, 2002.

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

MIKLAS, P. N.; DELORME, R.; STONE, V.; DALY, J. M.; STAVELY, J. R.; STEADMAN, J. R.; BASSETT, M. J.; BEAVER, J. S. Bacterial, fungal, and viral disease resistance loci mapped in a recombinant inbred common bean population ('Dorado'/ XAN 176). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 125, p. 476-481, 2000.

PÉREZ-VEGA, E.; PAÑEDA, A.; RODRÍGUEZ-SUÁREZ, C.; CAMPA, A.; GIRALDEZ, R.; FERREIRA, J. J. Mapping of QTLs for morpho-agronomic and seed quality traits in a RIL population of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 120, n. 7, p. 1367-1380, 2010.

SCHUURMANS, J.; VAN DONGEN, J. T.; RUTJENS, B. P. W.; BOONMAN, A.; PIETERSE, C. M. J.; BORSTLAP, A. C. Members of the aquaporin family in the developing pea seed coat include representatives of the PIP, TIP, and NIP subfamilies. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 53, p. 655-667, 2003.

TATARANNI, G.; SPADA, A.; POZZI, C.; BASSI, D. AFLP-based bulk segregant analysis for tagging the slow-ripening trait in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). **The Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 85, n. 1, p. 78-82, 2010.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v. 21, p. 4407-4414, 1995.

WANG, Y.; GEORGI, L. L.; REIGHARD, G. L.; SCORZA, R.; ABBOTT, A. G. Genetic mapping of the evergrowing gene in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). **The Journal of Heredity**, Washington, DC, v. 93, n. 5, p. 352-358, 2002.

YOUNG, R. A.; KELLY, J. D. RAPD markers flanking the *Are* gene for anthracnose resistance in common bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 121, p. 37-41, 1996.

ANEXOS

ANEXO A - Leituras do colorímetro Minolta Chroma CR-310, utilizando o sistema de cores L*a*b* de progênies F_{3:4} dos cruzamentos SAF x SAB. MB: Marrom Brillhante; MF: Marrom Fosco (Opaco); CB: Cinza Brillhante; CF: Cinza Fosco (Opaco)

Progênie F3:4	Classe fenotípica	L*	a*	b*
1	MB	34.24	9.52	29.17
2	CF	44.70	6.86	20.73
3	MF	28.84	8.14	23.54
4	MF	31.75	9.12	28.06
5	MF	32.69	9.57	30.89
6	CB	35.68	8.84	15.47
8	MF	34.74	8.48	31.63
10	MB	41.09	9.60	35.24
11	MB	35.17	13.63	34.38
13	MB	31.01	10.30	28.32
15	MF	29.56	12.28	29.12
16	MF	33.60	8.23	30.46
18	CF	40.55	10.12	15.13
19	MB	30.00	10.91	29.75
20	MB	37.72	12.69	34.76
22	MB	30.11	10.23	27.32
24	MB	35.63	13.76	24.17
26	MF	38.16	11.39	34.95
27	MF	30.79	9.80	27.21
29	MF	37.76	5.74	21.21
30	MB	31.31	10.90	29.22
32	MB	34.38	8.72	30.72
34	MB	33.25	10.39	30.86
35	MB	41.95	8.92	34.75
36	MB	37.66	14.14	33.09
37	CF	42.91	6.87	18.39
38	MB	38.19	9.34	29.54
40	MF	42.28	10.47	36.10
41	CB	42.88	12.72	14.60
42	MB	28.62	9.33	24.00
43	MB	33.60	11.31	32.19
44	CB	44.91	5.08	23.44
45	CB	41.19	9.86	17.42
46	CF	34.50	13.31	33.05
47	MB	40.91	10.28	34.87
48	MB	36.99	11.71	29.39
49	CF	45.89	8.21	18.19
51	CB	41.87	8.61	18.31
53	MB	38.60	13.41	32.25
54	MB	35.64	12.97	30.28

Continua...

Continuação...

55	MF	38.05	10.70	35.26
56	MB	32.14	8.05	28.04
57	CB	47.59	7.22	21.33
58	MB	32.43	9.41	29.38
59	MB	31.24	9.93	27.13
60	MB	40.85	12.12	25.25
61	MF	37.91	13.63	31.42
62	MB	28.36	11.25	27.68
63	MF	35.94	13.16	34.25
64	MB	28.21	13.59	22.66
67	CF	39.55	9.27	18.23
69	MF	38.74	15.93	25.51
72	MF	43.26	11.87	31.48
74	MB	36.88	11.55	30.77
75	MB	41.13	11.05	32.18
76	MB	38.50	9.60	30.51
77	MB	38.70	10.47	27.59
78	MF	35.73	9.08	26.22
79	CB	48.28	6.93	21.26
80	CF	46.31	7.77	20.38
81	MB	44.08	10.35	31.38
83	CB	39.09	8.80	18.11
84	MF	38.38	11.64	34.94
85	CF	40.19	10.20	17.70
86	MB	34.18	11.61	33.40
88	MF	36.91	12.34	36.56
89	MB	43.51	10.45	34.37
90	CB	38.99	5.64	22.34
92	CB	38.91	5.47	22.84
95	MF	32.63	11.49	27.49
98	MF	36.60	13.46	32.78
100	MB	38.45	12.38	34.60
102	MB	30.73	12.37	29.87
105	MB	34.79	11.04	32.79
107	MB	30.41	10.57	28.81
109	MB	29.21	12.91	29.18
112	CF	38.07	13.00	15.24
113	MF	36.75	13.52	34.80
116	MF	36.35	11.05	34.80
117	CB	39.49	7.94	19.33
119	MB	28.59	13.16	24.07
120	MF	32.29	11.81	26.01
121	MB	26.23	9.32	20.16
123	CF	42.90	8.97	18.53

Continua...

Continuação...

124	MF	30.52	10.15	26.58
125	MB	40.35	8.72	33.25
126	CF	34.71	6.09	20.12
127	CB	38.99	8.98	15.30
131	CF	41.24	7.92	18.15
133	MB	37.51	12.02	30.24
134	MF	31.00	9.92	29.34
135	MB	38.95	12.94	36.64
136	MF	35.84	9.50	34.01
137	CB	35.55	15.75	12.26
139	MB	39.40	11.47	34.31
141	CF	40.61	11.34	16.21
143	CF	39.79	8.74	18.74
145	CB	35.29	6.89	19.00
146	MF	35.61	14.62	33.96
147	MB	32.33	11.50	27.75
148	MB	32.26	10.13	31.03
149	MF	36.77	13.08	33.14
150	MB	41.67	10.65	37.46
151	CF	37.45	12.86	15.26
152	MB	35.93	9.94	28.13
153	CF	41.78	6.51	20.88
154	MB	34.07	11.62	28.08

ANEXO B - Leituras do colorímetro Minolta Chroma CR-310, utilizando o sistema de cores L*a*b* de progênies F_{3:4} do cruzamento P-152 x DN. PB: Preto Brilhante e PO: Preto Opaco

Progênie F _{3:4}	Classe fenotípica	L*	a*	b*
68	PB	13.86	-0.53	3.03
69	PB	20.09	-0.64	3.39
70	PB	10.68	-0.35	3.75
71	PB	16.21	-0.01	3.00
72	PO	9.11	-0.27	3.01
73	PB	21.31	-0.64	3.50
75	PB	18.04	-0.80	2.47
76	PO	12.20	-0.62	3.42
77	PB	15.25	-0.76	3.83
78	PB	14.99	-0.76	3.93
79	PB	11.12	-0.67	3.16
80	PB	11.57	-0.61	3.15
81	PO	5.45	-0.07	2.92
82	PO	5.64	-0.29	2.88
83	PO	10.50	-0.80	4.65
84	PB	16.15	-0.24	3.92
85	PO	10.13	-0.48	3.62
86	PB	17.58	-0.89	3.64
87	PB	12.18	-0.60	3.55
88	PO	6.08	0.23	2.99
89	PO	8.33	-0.13	3.51
90	PB	13.91	-0.90	4.33
92	PO	5.97	-0.18	2.85
93	PO	10.91	-0.19	3.58
94	PB	9.58	-0.54	3.73
95	PB	15.87	-0.47	3.09
96	PO	8.40	-0.31	3.52
97	PO	6.58	-0.56	3.66
98	PO	10.14	-0.14	3.07
99	PB	19.61	-0.75	2.86
100	PO	6.02	-0.19	3.04
101	PO	16.21	-0.70	3.11
102	PB	12.62	-0.92	3.28
103	PB	10.23	-0.86	3.67
104	PO	13.16	-0.28	2.87
105	PB	18.45	-0.75	3.01
106	PO	8.61	-0.16	3.11
107	PO	9.10	-0.22	3.57
108	PB	11.11	-0.55	4.05
109	PB	13.07	0.46	3.63
110	PB	14.01	-0.87	2.92

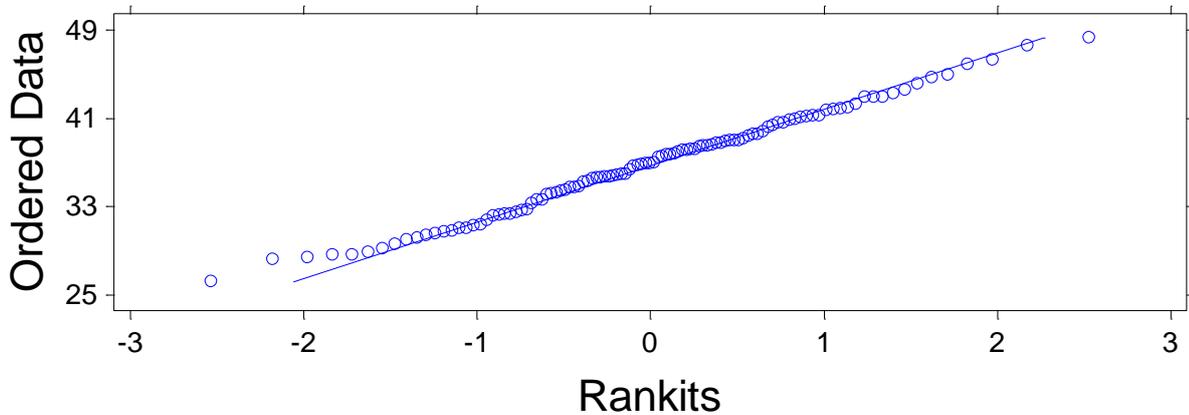
Continua...

Continuação...

111	PB	10.09	0.04	3.03
112	PB	9.67	-0.19	4.24
113	PO	15.02	-0.65	3.42
114	PB	18.91	-0.96	3.77
115	PB	19.34	-0.62	3.18
116	PB	16.67	-0.16	2.34
117	PO	5.17	0.01	3.21
119	PB	18.20	0.34	2.30
120	PB	15.06	-0.96	2.92
121	PO	12.49	-0.36	3.52
122	PO	12.95	-0.70	3.33
123	PB	19.48	-0.33	3.91
124	PB	17.99	-0.55	3.82
125	PO	9.98	-0.30	3.45
126	PO	10.29	0.25	3.04
127	PB	7.25	0.07	3.43
128	PB	15.61	-1.12	3.36
129	PO	11.17	-0.33	3.53
130	PB	20.37	-0.08	3.12
131	PO	6.67	-0.21	3.45
132	PB	15.83	-0.07	3.68
133	PO	7.77	-1.32	8.29
134	PB	15.30	-0.82	3.99
135	PB	18.74	-0.92	4.32
136	PB	21.23	-0.82	3.75
137	PO	8.28	-0.63	3.68
138	PB	12.32	-1.31	7.32
139	PO	9.58	0.00	3.54
140	PB	16.75	-0.71	3.49
141	PB	4.38	-0.05	2.73
142	PB	15.44	-0.61	5.63

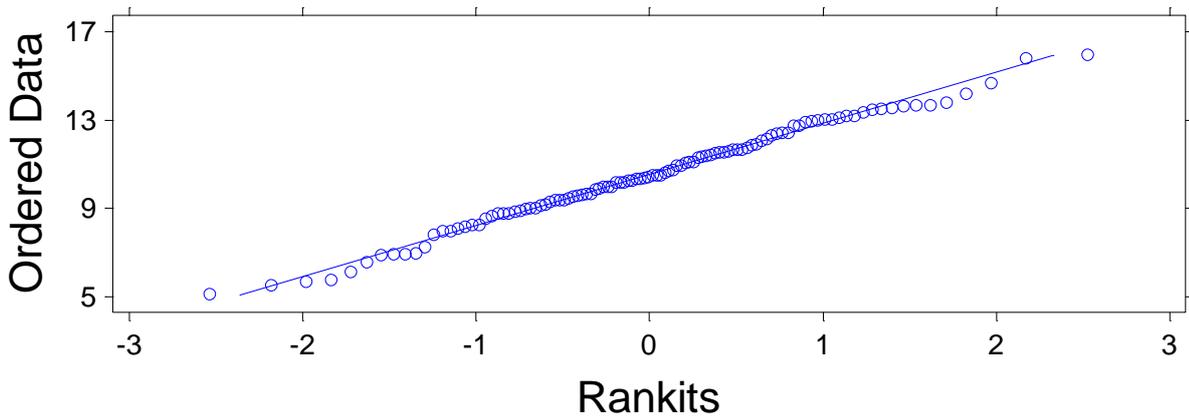
ANEXO C – Análise da distribuição dos valores de L^* , a^* e b^* em população $F_{3,4}$, derivada do cruzamento SAF x SAB. Teste de Shapiro-Wilk para verificar aderência à distribuição normal

Normal Probability Plot of L



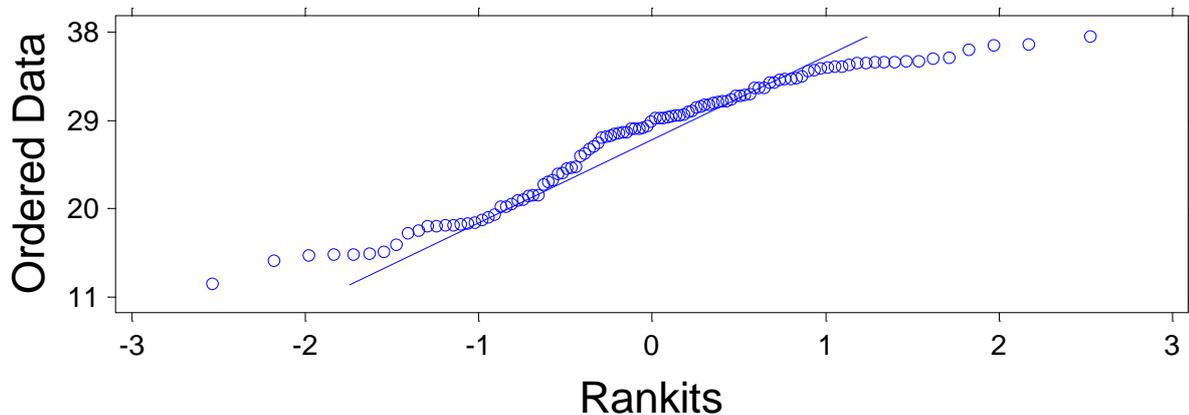
Shapiro-Wilk W 0.9907 P(W) 0.6777 107 cases

Normal Probability Plot of a



Shapiro-Wilk W 0.9909 P(W) 0.6949 107 cases

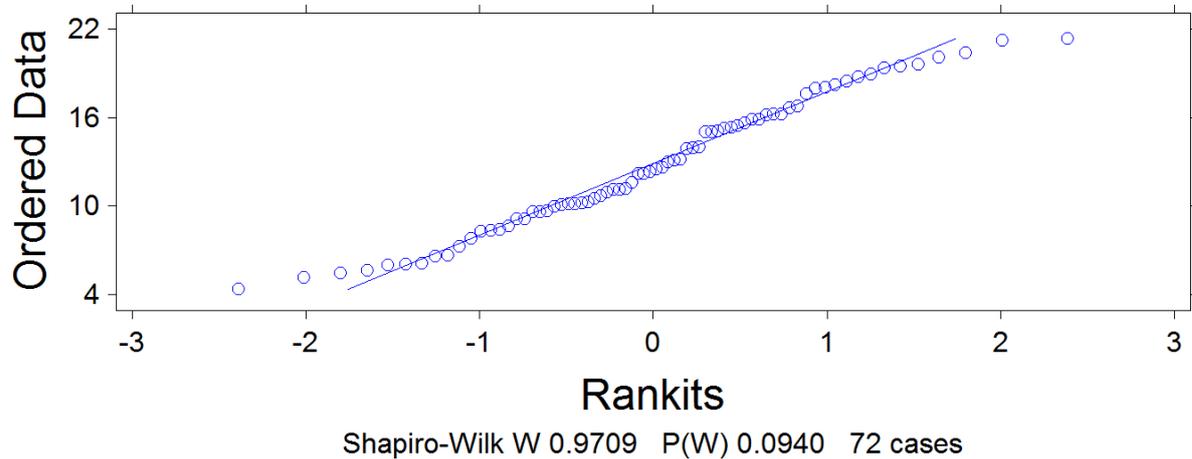
Normal Probability Plot of b



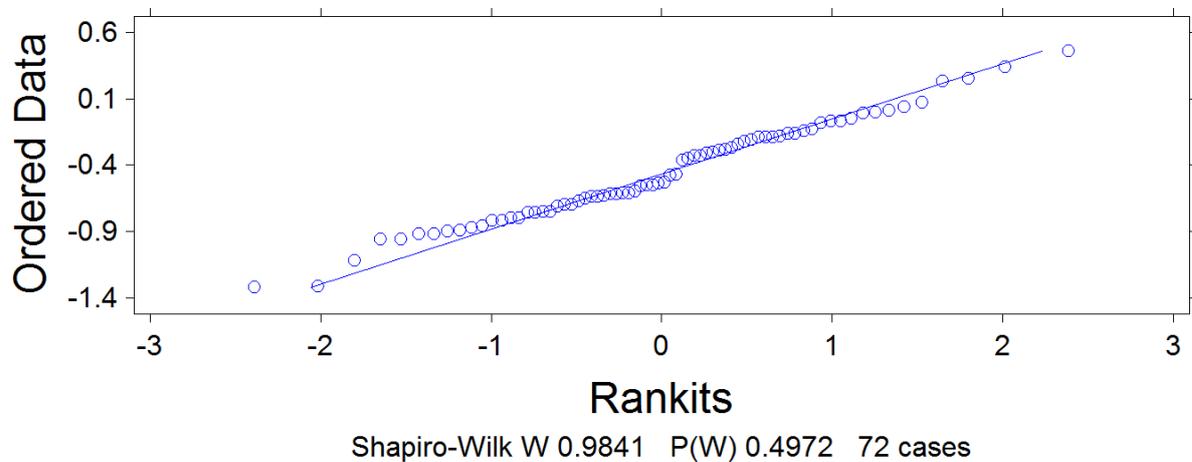
Shapiro-Wilk W 0.9382 P(W) 0.0001 107 cases

ANEXO D – Análise da distribuição dos valores de L^* , a^* e b^* em população $F_{3,4}$, derivada do cruzamento P-152 X DN. Teste de Shapiro-Wilk para verificar aderência à distribuição normal

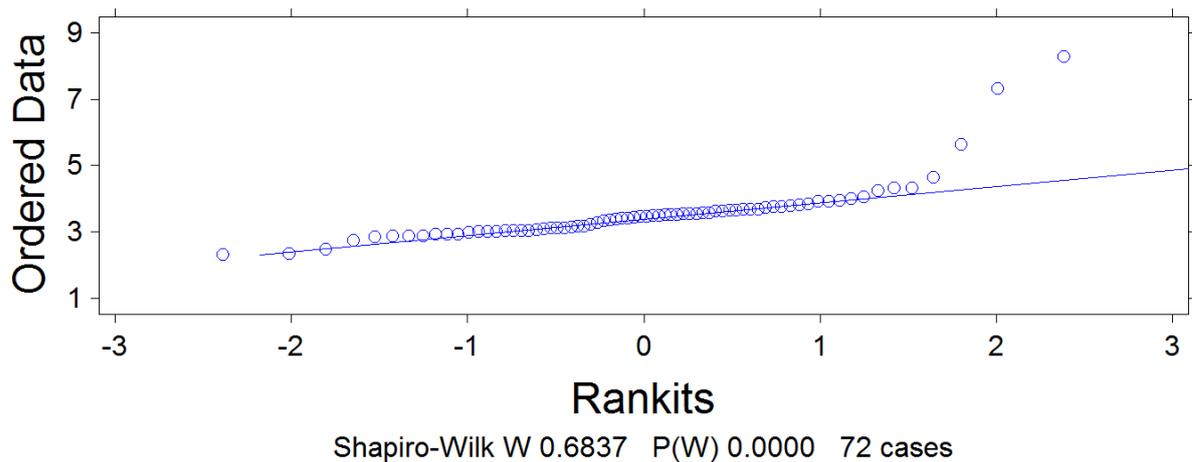
Normal Probability Plot of L



Normal Probability Plot of a



Normal Probability Plot of b



ANEXO E – Porcentagem de absorção de água de variedades de feijoeiro contrastantes para brilho do tegumento. SAB: Serro Azul Brillhante; SAF: Serro Azul Fosco; P-152: Puebla-152; e DN: Diamante Negro. Três amostras de 12 sementes de cada variedade foram embebidas em água com 100 ppm de CaCl₂, sendo mantidas à temperatura de 27°C. As sementes foram pesadas a cada 30 minutos, em um período de cinco horas. Pesagens também foram realizadas após 24 e 48 horas

Amostra	Tempo de embebição												
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	210 min	240 min	270 min	300 min	24 h	48 h
SAB 2	0.00	0.00	0.00	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	7.08
SAB 3	0.00	0.00	0.00	0.45	0.45	0.89	0.89	1.77	2.63	2.63	3.48	29.52	37.11
SAB 4	0.00	0.00	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.00	0.00	0.44	0.88	24.41	32.74
Média	0.00	0.00	0.15	0.45	0.45	0.59	0.59	0.74	1.03	1.17	1.60	18.13	25.64
Desvio padrão	0.00	0.00	0.25	0.00	0.00	0.26	0.26	0.92	1.41	1.26	1.64	15.52	16.22
SAF 1	0.00	0.85	1.69	2.93	3.73	5.69	7.57	15.02	18.60	21.09	22.92	48.33	49.78
SAF 2	0.00	0.00	0.87	1.73	3.40	5.42	6.97	13.69	17.45	19.79	21.72	43.39	44.23
SAF 3	0.00	0.41	1.63	5.10	7.28	10.37	11.68	14.18	15.68	17.41	19.87	50.10	52.27
Média	0.00	0.42	1.40	3.25	4.81	7.16	8.74	14.30	17.24	19.43	21.51	47.27	48.76
Desvio padrão	0.00	0.43	0.46	1.71	2.15	2.78	2.56	0.67	1.47	1.87	1.54	3.48	4.12
P-152 1	0.00	0.00	0.32	0.32	0.32	0.32	1.25	1.86	4.53	7.60	10.23	52.34	53.12
P-152 2	0.00	0.33	1.65	3.25	4.18	6.29	7.74	9.15	10.51	11.31	13.12	53.14	54.36
P-152 4	0.00	0.66	0.66	2.90	3.53	4.44	5.35	6.52	7.67	8.79	10.95	52.75	52.90
Média	0.00	0.33	0.88	2.16	2.67	3.68	4.78	5.84	7.57	9.23	11.43	52.74	53.46
Desvio padrão	0.00	0.33	0.69	1.60	2.07	3.06	3.28	3.69	2.99	1.89	1.51	0.40	0.79
DN 1	0.00	0.36	1.08	1.08	1.43	1.79	2.48	3.51	5.17	6.46	8.64	33.41	36.19
DN 3	0.00	0.78	1.16	1.54	2.29	2.29	3.76	4.48	5.88	6.91	7.91	37.25	44.23
DN 4	0.00	1.98	4.62	6.42	9.82	11.43	11.43	12.68	12.98	13.29	13.29	35.75	36.73
Média	0.00	1.04	2.28	3.01	4.51	5.17	5.89	6.89	8.01	8.89	9.95	35.47	39.05
Desvio padrão	0.00	0.84	2.02	2.96	4.61	5.43	4.84	5.04	4.32	3.82	2.92	1.94	4.49