

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE AGRONOMIA**

**PATRÍCIA PAGNONCELLI BORBA**

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES IRAP PARA A  
GENOTIPAGEM DE *Phaseolus vulgaris* L.**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**PATO BRANCO**

**2015**

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE AGRONOMIA**

**PATRÍCIA PAGNONCELLI BORBA**

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES IRAP PARA A  
GENOTIPAGEM DE *Phaseolus vulgaris* L.**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**PATO BRANCO**

**2015**

PATRÍCIA PAGNONCELLI BORBA

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES IRAP PARA A  
GENOTIPAGEM DE *Phaseolus vulgaris* L.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheira Agrônoma.

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup> Taciane Finatto

PATO BRANCO

2015

**Pagnoncelli, Patrícia**  
Desenvolvimento de marcadores IRAP para a genotipagem e  
*Phaseolus vulgaris* L./ Patrícia Pagnoncelli Borba  
Pato Branco. UTFPR, 2015  
61f. : il. ; 30 cm

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Taciane Finatto

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade  
Tecnológica Federal do Paraná. Curso de Agronomia. Pato Branco,  
2015.

Bibliografia: f. 49 – 56

1. Agronomia. 2. Marcadores Moleculares. 3. IRAP. 4. *Phaseolus vulgaris* L. I. Finatto, Taciane, orient. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curso de Agronomia. III. Desenvolvimento de marcadores IRAP para a genotipagem e *Phaseolus vulgaris* L.

CDD: 630



Ministério da Educação  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
Câmpus Pato Branco  
Departamento Acadêmico de Ciências Agrárias  
**Curso de Agronomia**



## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**Trabalho de Conclusão de Curso - TCC**

### **DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES IRAP PARA A GENOTIPAGEM DE *Phaseolus vulgaris* L.**

por

**PATRÍCIA PAGNONCELLI BORBA**

Monografia apresentada às 13:00 horas e 30 minutos do dia 06 de novembro de 2015 como requisito parcial para obtenção do título de ENGENHEIRA AGRÔNOMA, Curso de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo-assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

**Eng. Agr. MSc. Leomar Guilherme Woyann**  
UTFPR

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marisa Cacia de Oliveira**  
UFPR

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Taciane Finatto**  
UTFPR  
Orientadora

A "Ata de Defesa" e o decorrente "Termo de Aprovação" encontram-se assinados e devidamente depositados na Coordenação do Curso de Agronomia da UTFPR Câmpus Pato Branco-PR, conforme Norma aprovada pelo Colegiado de Curso.

À minha mãe, Zeneide, e minha madrinha, Zélide, as pessoas que mais me ajudaram e contribuíram para que esta jornada fosse concluída.

Às minhas irmãs, Franciele (*in memoriam*) e Paula, por maior que seja a distância, sempre as sentirei por perto.

À Ayuni, enta omry.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, saúde, pela minha família e a oportunidade de trilhar novos caminhos..

Agradeço a toda família Pagnoncelli pela minha formação e educação, por me apoiarem numa segunda graduação. Especialmente minha mãe, Zeneide e minha madrinha, Zélide, minha irmã Paula e a Ayuni pelo carinho e afeto incondicional de todas as horas, por acompanharem meus passos e pelo amparo nas horas de necessidade.

À minha orientadora Taciane Finatto, pela oportunidade, a interminável paciência, pelo enorme conhecimento compartilhado e por me auxiliar em todos os momentos de angústia em que os experimentos não saíram a contento.

Aos meus colegas e amigos de Agnes Shimosaka, Heloísa Machado, Sorhaila Camila Batistel, Bruna Hasse Cerny, Vinícius Acorsi, Luiza Tonelli, Douglas Baretta, Danilo Sevim, Kamila Kovali, Cristiane Dipp e muitos outros, pela convivência, pelos risos e pelo crescimento pessoal incalculável. Agradeço, especialmente, a amiga Aline Sasso que prontamente se dispôs a me auxiliar durante meu período de estágio.

A UTFPR e aos professores Doutores Marisa Cacia de Oliveira, William Machado, Rosangela Dallemole Giaretta, Thiago Vargas, Michelangelo Müzzel Trezzi, Jorge Jamhour e tantos outros que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

Enfim, meu sincero muito obrigada, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para transformar este sonho em realidade.

“O bater das asas de uma borboleta num extremo do globo terrestre, pode provocar uma tormenta no outro extremo no espaço de tempo de semanas.” (Edward Lorenz)



## RESUMO

PAGNONCELLI, Patrícia. Desenvolvimento de marcadores IRAP para a genotipagem de *Phaseolus vulgaris* L. 61 f. TCC (Curso de Agronomia), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2015.

O feijão é uma leguminosa de grande importância na alimentação humana. Seu cultivo é feito, majoritariamente, por pequenos produtores rurais, sendo dessa forma uma importante fonte de renda e de subsistência. Conhecer os recursos genéticos disponíveis é uma importante ferramenta para o desenvolvimento sustentável da agricultura. A perda de recursos genéticos e consequente redução da variabilidade genética tem implicância direta no meio ambiente, na produção de alimentos, economia, e agronomicamente, implica em extinção de constituições genéticas que contribuem para o melhoramento das culturas. Os marcadores moleculares são peças-chave no estudo da variabilidade e diversidade genética, pois são formas precisas para a identificação e avaliação minuciosa da variação genética, permitindo a compreensão da variabilidade genética entre indivíduos de uma mesma espécie. Os marcadores moleculares de DNA detectam variações nas sequências de nucleotídeos em locais específicos do genoma. Os marcadores IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*) são baseados em retrotransposons. Estes marcadores examinam a variação dos locais de inserção dos retrotransposons, e a amplificação é feita na sequência de DNA entre as regiões de longas repetições terminais (LTRs) de dois retrotransposons. A genotipagem do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma opção importante para o registro de cultivares, caracterização de variedades locais, escolha de genitores em blocos de cruzamento. O desenho dos iniciadores foi feito no programa RJPrimer a partir de pesquisa *in silico* de retrotransposons na base de dados *Phytozome* 10.1 (Genoma de *Phaseolus vulgaris* v1.0). A extração e isolamento do DNA genômico foi realizada a partir de folhas jovens de 22 genótipos de feijão. O DNA foi analisado em gel de agarose quanto à integridade e quantificado em espectrofotômetro. A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada por PCR utilizando os 12 pares de iniciadores IRAP desenhados. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%. A análise da dissimilaridade genética foi feita no software NTSYS-PC utilizando o coeficiente de Dice gerando um dendrograma a partir da análise de agrupamento UPGMA. Foram construídos dois dendrogramas de dissimilaridade que permitiram agrupar os genótipos, apontando uma separação visível entre as variedades locais e comerciais estudadas. Os iniciadores foram capazes de apontar a similaridade entre genótipos parentais e seus descendentes como o caso dos genótipos IPR Andorinha, BRS Estilo e seu cruzamento F2 e também percebeu-se o grau de similaridade entre IPR Siriri e IPR Tangará, as quais possuem genitores em comum. Foi possível averiguar a proximidade genética entre o genótipo Bolinha e a variedade local Land2 as quais apresentam fenótipos similares. Os iniciadores IRAP aqui desenvolvidos possibilitam a identificação de polimorfismos genéticos em *P. vulgaris* e podem ser utilizados como ferramenta auxiliar na caracterização de genótipos bem como na identificação de redundâncias presentes em coleções de trabalho.

**Palavras-chave:** Marcadores Moleculares. Retrotransposons. Feijão.  
Dissimilaridade genética.

## ABSTRACT

PAGNONCELLI, Patrícia. Development of IRAP markers for genotyping *Phaseolus vulgaris* L. 61 f. TCC (Course of Agronomy) - Federal University of Technology - Paraná. Pato Branco, 2015.

Common bean is a legume of great importance in human nutrition. Its cultivation is done mostly by small farmers, and it is an important source of income and subsistence for them. Knowing the genetic resources available is an important tool for sustainable development of agriculture. The loss of genetic resources and consequent loss of genetic variability has direct implication in the environment, food production and economy. Agriculturally, it involves loss of genetic constitutions that contribute to crop improvement. Molecular markers are the key in the study of variability and genetic diversity. They are accurate ways to identify and do a thorough evaluation of genetic variation that helps to understand the genetic diversity among varieties of the same species. The molecular DNA markers detect variations in nucleotide sequences into specific genome sites. The IRAP markers (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) are based on retrotransposons. These markers examine the variation in insertion sites of retrotransposons, and the amplification is made in the DNA sequence between the regions of the long terminal repeats (LTR) of two retrotransposons. The molecular characterization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes is an important option for registration of cultivars and characterization of landraces. The design of primers was performed with RJPrimer software from *in silico* search of retrotransposons available in *Phytozome* 10.1 database (*P. vulgaris* Genome v1.0). The genomic DNA was obtained from young leaves of 22 common bean genotypes. DNA amplification was performed by PCR using 12 designed IRAP primers pairs. The PCR products were subjected to 2% agarose gel electrophoresis. The analysis of the dissimilarity of the genotypes was performed with NTSYS-pc software using Dice coefficient. A dendrogram was generated from the UPGMA clustering analysis. The degree of correlation between the dissimilarity matrix was obtained by performing Mantel test with 1000 permutations. Two dendrograms of dissimilarity were generated allowing a visible separation between the landraces and commercial genotypes. The IRAP markers were able to point out the similarity between parental genotypes and their descendents as in the case of IPR Andorinha, BRS Estilo and their F2 generation. Was observed a similarity between IPR Siriri and IPR Tangara, which are related. It was possible to identify the genetic similarity between genotype Bolinha and the landrace Land2 that have very similar phenotype. The developed IRAP primers allow the identification of genetic polymorphisms in *P. vulgaris* and can be used as an auxiliary tool in the characterization of genotypes and identification of redundancies present in working collections.

**Keywords:** Molecular Markers. Retrotransposons. Common bean. Genetic dissimilarity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Fluxograma demonstrando a divisão dos marcadores moleculares em bioquímicos (izoenzimas e padrões de banda de proteínas) e moleculares que são subdivididos em marcadores baseados em hibridação (RFLP, Minissatélite e Microsatélite) e Baseados em PCR (REMAP, IRAP, RAPD, EST, ISSR, STS, SSR AFLP e SCAR). UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2015.....23
- Figura 2: Representação gráfica da amplificação das sequências polimórficas entre retrotransposons. Fonte: Schulman.....27
- Figura 3: Gel de agarose 2% visualizado sob luz ultravioleta. As bandas representam os produtos da PCR dos 22 genótipos de feijão amplificados com iniciador Pv\_IRAP\_3 que contém 20 pares de bases. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2015.....39
- Figura 4: Dendrograma de dissimilaridade genética gerado a partir da matriz de distância Euclidiana, com agrupamento pelo método UPGMA mostrando as relações genéticas entre os 22 genótipos a partir dos resultados de 12 pares de iniciadores IRAP desenvolvidos e analisados. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2015.....46
- Figura 5: Dendrograma de dissimilaridade genética gerado a partir da matriz de distância Euclidiana, com agrupamento pelo método UPGMA mostrando as relações genéticas entre os 22 genótipos a partir dos resultados dos pares de iniciadores IRAP com conteúdo de informação polimórfica (PIC) muito informativo. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2015.....47

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Descrição de características morfológicas das sementes e grupo comercial dos genótipos comerciais e locais de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) usados para genotipagem com marcadores moleculares IRAP. UTFPR, Campus Pato Branco, 2015.....32
- Tabela 2: Características dos iniciadores desenvolvidos para análise da dissimilaridade genética em genótipos de *Phaseolus vulgaris* L. A tabela contém a localização do fragmento de DNA contendo Retrotransposons LTRs no genoma do feijão, sequência e tamanho do iniciador em pares de bases (pb), temperatura de anelamento, tamanho do produto amplificado em pares de bases (pb), porcentagem de Guanina e Citosina (GC %), e as cromossomos em que o iniciador poderá se anelar no genoma do feijão. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2015..... 40
- Tabela 3: Conteúdo de informação polimórfica (PIC) dos iniciadores IRAP desenvolvidos. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2015.....42

## LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
DHE	Distinguilidade, homogeneidade e estabilidade
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
IRAP	<i>Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism</i>
ISSR	<i>Inter Simple Sequence Repeat</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeats – regiões de longas repetições terminais</i>
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
NTSYS-PC	<i>Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System for personal computers, Version 2.1, Applied Biostatistics, Inc.</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PIC	<i>Polymorphic information Content</i>
PR	Unidade da Federação – Paraná
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RBIP	<i>Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RNC	Registro Nacional de Cultivares
S-SAP	<i>Sequence Especific Amplification Polymorphism</i>
SAHN	<i>Sequential, agglomerative, hierarquic, nonoverlapping clustering methods</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>P. vulgaris</i> L.	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
<i>O. sativa</i> L.	<i>Oriza sativa</i> L.
s.d.	Sem data

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
2.1 Objetivos gerais.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>18</b>
3.1 O feijão.....	18
3.1.1 Importância socioeconômica.....	18
3.1.2 Botânica.....	18
3.1.3 Genética do feijoeiro.....	20
3.1.4 Variedades locais.....	21
3.2 Marcadores moleculares.....	22
3.2.1 IRAP ( <i>Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism</i> ).....	25
3.3 Genotipagem para caracterização do germoplasma.....	28
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 Genótipos estudados.....	32
4.2 Desenho dos iniciadores.....	34
4.3 Isolamento do DNA.....	35
4.4 Amplificação de DNA por PCR.....	35
4.5 Eletroforese.....	36
4.6 Análise de dissimilaridade genética.....	36
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>38</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>58</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O feijão é uma leguminosa de grande importância na alimentação humana. Seu cultivo é feito, majoritariamente, por pequenos produtores rurais, sendo, dessa forma, uma importante fonte de renda e de subsistência para os mesmos (BARBOSA, 2012). Os grãos de leguminosas são importantes para complementar a alimentação humana, pois são fontes de proteínas e minerais (BEEBE [s.d.]). Esta é uma importante característica encontrada no feijão, pois, agregado ao arroz, compõem a dieta básica de uma parcela da população brasileira e de outros países latino-americanos (CGIAR, 2012).

Conhecer os recursos genéticos disponíveis é uma importante ferramenta para o desenvolvimento sustentável da agricultura. A perda de recursos genéticos e consequente perda da variabilidade genética tem implicância direta no meio ambiente, na produção de alimentos, economia, e agronomicamente, implica em perda de constituições genéticas que contribuem para o melhoramento das culturas.

Os marcadores moleculares são peças-chave no estudo da variabilidade e diversidade genética. Técnicas que utilizam os marcadores são formas precisas para a identificação e avaliação minuciosa da variação genética, sendo assim, um método extremamente importante para a compreensão da diversidade genética entre cultivares de uma mesma espécie (KALENDAR et al. 2011).

Essencialmente os marcadores moleculares de DNA detectam variações nas sequências de nucleotídeos em locais específicos do genoma. Esses padrões distintos de fragmentos de DNA são chamados de *fingerprint* e podem ser verificados, através da análise de bandas geradas durante a eletroforese, após amplificação de fragmentos de DNA.

Os marcadores IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*) são baseados em retrotransposons. Estes elementos compõem grande parte do genoma da maioria das espécies e são os responsáveis pela grande variabilidade genética existente. Retrotransposons são capazes de se replicar e inserir em novos locais aleatoriamente no genoma e essas replicações permitem que sejam

potenciais marcadores moleculares para estudo de diversidade genética (KALENDAR, 2011; SHARMA, 2014)

Os marcadores IRAP examinam a variação dos locais de inserção dos retrotransposons, e a amplificação é feita na sequência de DNA entre as regiões de longas repetições terminais (LTRs) de dois retrotransposons (KALENDAR; SCHULMAN, 2006).

O uso desta metodologia para a caracterização de genótipos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), é uma opção importante para registro de cultivares e caracterização de variedades locais. Respeitando assim, o direito de comunidades tradicionais e indígenas de conservarem *on farm*, o material genético que faz parte de seus costumes e da sua história.

O presente estudo visou desenvolver marcadores moleculares IRAP baseados em retrotransposons, com objetivo de caracterizar diferentes genótipos de feijão.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver marcadores moleculares que possibilitem a genotipagem do feijoeiro.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

– Desenhar marcadores moleculares baseados em retrotransposons – IRAP – com base nas sequências de DNA disponíveis nos bancos de dados públicos.

– Realizar a identificação genotípica de diferentes variedades locais e comerciais de feijão.

– Analisar a dissimilaridade genética presente no grupo de variedades locais e comerciais de feijoeiro.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 O FEIJÃO

##### 3.1.1 Importância socioeconômica

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa (AFONSO, 2010), cultivada em diversas regiões do Brasil, sendo de grande importância econômica e social para o país. Esta espécie é cultivada, em grande parte, por pequenos agricultores em todo o território nacional, tendo grande importância na subsistência. Contudo, há também a produção em escala comercial com emprego de tecnologias que vão desde o uso de agroquímicos até o uso de máquinas para a produção e colheita (BARBOSA, 2012).

O feijão é considerado um componente importante na alimentação brasileira sendo fonte de nutrientes para grande parte da população. Apresenta em sua composição: proteínas, fibra alimentar entre outros que tornam esse produto muito importante na alimentação humana. Quando consumido com cereais ricos em aminoácidos metionina e cisteína, como o arroz, proporciona uma dieta nutricionalmente equilibrada, sendo assim de grande importância para países em desenvolvimento (BORÉM; CARNEIRO, 2006 p. 14).

##### 3.1.2 Botânica

*P. vulgaris* pertence à Classe Eudicotyledoneae, Ordem Fabales, Família Leguminosae/Fabaceae – Papilionoideae e gênero *Phaseolus* (APG III, 2009). Este gênero originou-se nas Américas e possui cerca de 55 espécies, contudo apenas 5 são cultivadas: *P. vulgaris* L. mais amplamente utilizada e com maior importância, *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray var *latifolius* Freeman e *P. polyanthus* Greenman (DEBOUCK, 1993, apud SANTOS e GAVILANES, 2006, p 42).

O sistema radicular da cultura do feijoeiro é formado por uma raiz principal de onde se desenvolvem, lateralmente, as raízes secundárias concentradas na base do caule. É uma planta herbácea cujo caule é formado por nós e entrenós, onde estão inseridos, os cotilédones, as folhas primárias e trifoliadas (SILVA; COSTA, 2003). O número de nós e entrenós podem variar conforme o seu hábito de crescimento (determinado ou indeterminado).

As folhas primárias da cultura são simples e opostas, tendo a cor e pilosidade que podem mudar conforme a variedade cultivada (SILVA; COSTA, 2003). As folhas trifolioladas aparecem no segundo nó do caule e são formadas durante a embriogênese (SANTOS; GAVILANES, 2006). O formato das folhas compostas é cordiforme e seu tamanho e forma variam com os fatores ambientais, cultivar, posição da folha no caule e idade da planta (SANTOS; GAVILANES, 2006).

As inflorescências do feijoeiro agrupam-se em racimos, e sua morfologia favorece a autopolinização (SANTOS; GAVILANES, 2006). O fruto do feijoeiro é um legume, também denominado vagem, que expõe suas sementes quando maduro. A vagem é constituída de duas partes que são unidas por duas fendas, sua forma pode ser reta, arqueada ou recurvada (SILVA; COSTA, 2003) e a coloração pode oscilar de verde uniforme a arroxeadada ou quase negra, conforme a cultivar (SANTOS; GAVILANES, 2006). A morfologia das sementes não difere de forma significativa no formato dos cotilédones, sistema radicular e a distribuição das folhas ao redor do caule (FERREIRA, 2008).

A germinação ocorre de forma epígea, na qual o hipocótilo tem condições de expor os cotilédones acima do solo. Ferreira (2008) afirma que as principais divergências podem ser vistas na forma, tamanho e coloração do tegumento e hipocótilo, sendo estas características importantes na diferenciação de cultivares. O ciclo da cultura do feijão normalmente é completado em 70 a 110 dias, porém, esse valor pode variar conforme a cultivar e o clima em que está implantada a lavoura (BARBOSA, 2001).

O feijão tem uma boa adaptabilidade a diferentes ambientes de cultivo, porém, estes devem apresentar solos soltos, friáveis e com pouca probabilidade de encharcamentos, já que as raízes se encontram em maior quantidade nos primeiros 20 cm do solo (BARBOSA; GONZAGA, 2012).

No Brasil, o feijoeiro comum é cultivado durante todo o ano, sob diferentes sistemas de cultivo e usando distintos níveis tecnológicos, em três épocas de semeadura: “águas”, 47% da produção; “seca”, 38% da produção; e “outono-inverno”, 15% da produção (SOUZA, 2013). No ano de 2012, o Brasil produziu 2.794.854 toneladas e ocupa a terceira posição em nível mundial (FAO, 2014). A ocorrência de períodos de escassez de chuvas já é uma realidade nas diversas regiões de cultivo. Isto pode afetar a produção em todas as fases do ciclo do feijão, devido ao sistema radicial superficial, que é característico da planta (BALARDIN, 2010).

Um elemento climático de extrema importância para a cultura do feijoeiro é a temperatura, já que esta variável interfere na porcentagem de vingamento de vagens, florescimento e frutificação da cultura (BARBOSA; GONZAGA, 2012). O déficit hídrico também deve ser levado em consideração, pois pode comprometer a resistência estomática e por conseguinte a área foliar. O período de floração é um dos mais críticos e se submetido a falta de água pode causar redução no porte da planta, no tamanho das vagens e a quantidade de sementes por vagem, o que, conseqüentemente, diminui o rendimento total da cultura (BARBOSA; GONZAGA, 2012).

### 3.1.3 Genética do feijoeiro

*P. vulgaris* é uma espécie diploide que apresenta seu número básico 22 cromossomos ( $n=x=11$ ). Seu genoma totaliza 521.1 Mb e 27.197 locos contendo 31.638 transcritos codificadores de proteínas (SCHMUTZ et al., 2014). O feijão é uma planta autógama, isto é, ocorre a autopolinização e a autofecundação, constituindo-se, assim, linhas puras ou uma mistura de várias linhas puras. Do ponto de vista genético é homozigótico em todos os seus loci, a menos que ocorra uma mistura mecânica ou mutação (VIEIRA et al., 2006).

Várias linhas de pesquisas tem demonstrado que, geneticamente, o gênero *Phaseolus* tem dois centros de origem distintos e isolados, um mesoamericano e outro andino. Os genótipos desses centros de origem

provavelmente divergiram de um ancestral comum há 100.000 anos atrás. Porém, há 8.000 anos o feijão foi domesticado nesses dois centros de origem, resultando em variedades locais com características distintas advindas de adaptações referentes à sua localização (SCHMUTZ et al. 2014). Santos e Gavilanes (2006) citam um terceiro centro de origem intermediário baseado nos estudos relacionados à proteína faseolina, localizado na região da Colômbia.

Devido a grande diversidade de ambientes em que o feijão foi domesticado e cultivado, existe uma grande variabilidade de caracteres agrônômicos, como hábito de crescimento, tamanho e cor de grãos e ciclo. Disto resultou o agrupamento do feijoeiro em seis raças ou grupos gênicos considerando caracteres morfológicos, adaptativos, evolucionários e também referentes a marcadores moleculares (Anexo A) (SANTOS; GAVILANES, 2006, P. 43).

Conhecer os recursos genéticos disponíveis é uma importante ferramenta para o desenvolvimento sustentável da agricultura. A escassez de recursos genéticos e consequente perda da variabilidade genética tem implicância direta no meio ambiente, na produção de alimentos, economia, e agronomicamente, implica em perda de constituições genéticas que contribuem para o melhoramento das culturas.

Os programas de melhoramento genético do feijoeiro, até então realizados, normalmente fazem uso de linhas e cultivares provenientes do mesmo grupo genético, resultando em fraco aproveitamento da variabilidade genética da espécie e em poucos ganhos significativos, principalmente na produção de grãos. Esta prática vem sendo alterada em função da busca por maior produtividade da cultura associada a outros caracteres de interesse em cada região (SANTOS; GAVILANES, 2006, P. 44).

### 3.1.4 Variedades locais

As variedades locais, conhecidas também como *landraces* ou crioulas, normalmente mantidas por pequenos e médios agricultores, caracterizam-se por serem sementes muitas vezes passadas de pai para filho sendo parte da cultura de um povo (COSTA; SANTIAGO; PEREIRA, 2010; SANTOS, 2014). As variedades

locais podem não ser fonte de grande produtividade, mas tendem a ser excelente fonte de recursos genéticos. Seu cultivo sucessivo possibilita a ocorrência de mutações que tornam essas variedades mais adaptadas ao ambiente, fato que muitas vezes é percebido e aproveitado por seus guardiões. As cultivares locais ou crioulas são formadas, na maioria das vezes por uma mistura de genótipos e podem servir de base para adição de características de interesse em programas de melhoramento genético, pois mantém, eventualmente, características de tolerância e/ou resistência a estresses bióticos e abióticos e, ainda, podem possuir características agronômicas desejáveis (COSTA; SANTIAGO; PEREIRA, 2010).

Para uma variedade ser considerada local ou crioula, um genótipo não pode ter passado pelo processo de seleção ou melhoramento formal. Essas cultivares podem derivar de variedades melhoradas e após várias gerações podem se combinar com outras variedades locais (SANTOS, 2014).

### 3.2 MARCADORES MOLECULARES

Com o avanço do mapeamento do DNA de várias espécies, estudo da estrutura de genes e suas funções, surge um novo ramo da ciência, a genômica, revolucionando, assim, a área da genética. O sequenciamento do DNA de plantas modelo como *Oryza sativa* L. e *Arabidopsis thaliana*, gerou enorme quantidade de informação disponível para pesquisa. Juntamente ao avanço das pesquisas, novas técnicas de desenvolvimento de marcadores genéticos moleculares surgiram. Estas técnicas só foram passíveis de criação devido ao surgimento de tecnologias que permitiram os estudos sobre DNA recombinante, reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento automático do DNA (FALEIRO, 2011 p. 31).

As características de DNA herdadas geneticamente e que diferenciam dois ou mais indivíduos são consideradas marcadores moleculares. Estas sequências características de DNA são baseadas no dogma central da biologia molecular e na pressuposição de que diferenças genéticas significam na maioria das vezes, diferenças nas proteínas codificadas, as quais em conjunto, levam a diferenças no fenótipo (FALEIRO, 2011, p 32; MILACH, 1998). Estes marcadores podem ser diferenciados pela tecnologia, habilidade, custo, facilidade de uso,



consistência e repetibilidade utilizada para revelar a variabilidade genética (MILACH, 1998).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: a) hibridização: marcadores RFLP (*Restriction fragment length polymorphism* - “Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição”) e minissatélites; ou b) amplificação de DNA: AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*), REMAP (*Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), SSR (*Simple Sequence Repeat*), SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), entre outros (MILACH, 1998; CAIXETA et al., 2009; FALEIRO, 2011) (Figura 1).

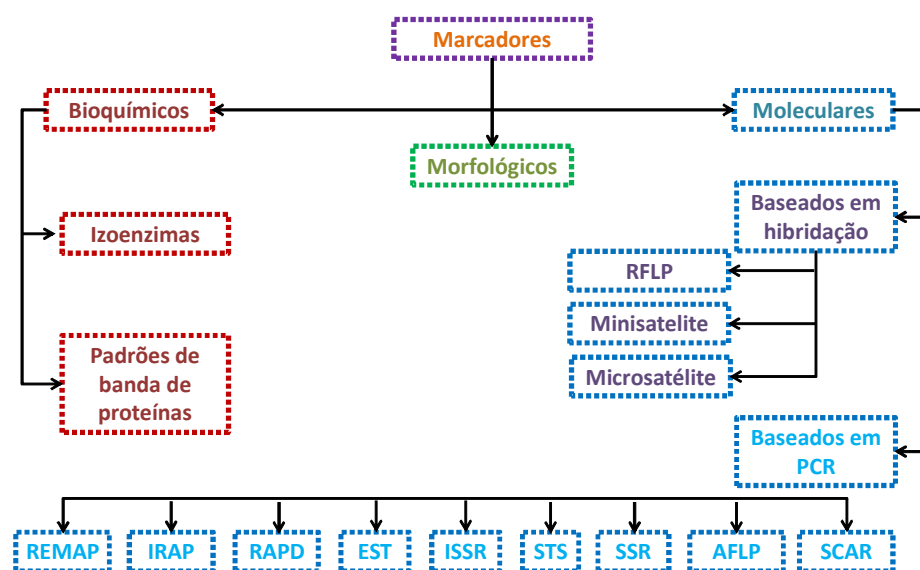


Figura 1: Fluxograma demonstrando a divisão dos marcadores moleculares em bioquímicos (izoenzimas e padrões de banda de proteínas) e moleculares que são subdivididos em marcadores baseados em hibridação (RFLP, Minissatélite e Microsatélite) e Baseados em PCR (REMAP, IRAP, RAPD, EST, ISSR, STS, SSR AFLP e SCAR). UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2015.

O desenvolvimento de marcadores moleculares se iniciaram com os RFLPs. Estes marcadores quando clivados por enzimas de restrição, durante a eletroforese, expressam as diferenças de comprimento de fragmentos de DNA. A

ocorrência de RFLPs se dá por rearranjo de DNA, mudanças de pares de bases, inserção e/ou deleção ou diversidade natural na sequência de nucleotídeos. Os marcadores RFLPs permitem identificar um maior número de locos polimórficos, sendo, dessa forma, uma ferramenta eficaz para a seleção assistida por marcadores. Esta técnica tem a dificuldade de necessitar muita mão de obra e um grande tempo para que seja feita a análise genômica (BRAMMER, 2000; CAIXETA et al., 2009).

Com o advento da reação em cadeia da polimerase (PCR) houve a possibilidade de ampliar pequenas sequências de nucleotídeos, possibilitando, assim, sua análise e aumentando as opções de uso dos marcadores moleculares. A PCR baseia-se na síntese enzimática *in vitro* de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase e de iniciadores específicos ou não. Esses iniciadores delimitam a sequência de DNA de fita dupla a ser amplificada, cujos resultados são milhões de cópias idênticas (BRAMMER, 2000).

Marcadores baseados na técnica de PCR ocorrem em vários locais do genoma, gerando padrões de bandas multiloco, sendo úteis para resolver uma série de problemas que podem ter abordagem difícil usando métodos do loco único. Também não há necessidade prévia de qualquer informação sobre a sequência a partir do organismo analisado (POCZAI et al., 2013). RAPD, SSR, ISSR, AFLP, IRAP e REMAP são alguns exemplos de marcadores baseados na técnica de PCR.

Os marcadores moleculares são fundamentais na caracterização de espécies e em programas de melhoramento, permitindo explorar a biodiversidade, reconstruir relações filogenéticas e compreender a estrutura, evolução das espécies de plantas, microrganismos e suas populações (A MANUAL, 2002). Os marcadores moleculares possibilitam a geração de informação em diversas fases de caracterização e uso de recursos genéticos em bancos de germoplasma, pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento (FALEIRO, 2011, p. 55). O desenvolvimento de marcadores moleculares ligados aos genes responsáveis por características de interesse econômico permite a seleção indireta dessas características podendo reduzir o tempo necessário para a obtenção de resultados em programa de melhoramento (CAIXETA, et al., 2009 p. 11).

Um bom marcador molecular não afeta o fenótipo, é codominante na expressão, é uma cópia única, é econômico, altamente polimórfico, analisado facilmente, multifuncional, não tem uso restrito, pode ser automatizado e multiplexado (A MANUAL, 2002). A escolha de um marcador molecular depende de vários fatores iniciando-se pelo conhecimento dos vários marcadores existentes, suas vantagens e desvantagens; conhecer a genética, evolução e reprodução da espécie estudada; pesquisar se os marcadores escolhidos são aplicáveis à espécie estudada; avaliar a disponibilidade de recursos (humanos, financeiros, equipamentos e estrutura física); e analisar o objetivo do projeto a ser implantado (CAIXETA et al., 2009).

### 3.2.1 IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*)

Considerando que a maior parte do DNA não é composta por genes, e sim por sequências de bases nitrogenadas consideradas “sequências lixo”, os elementos transponíveis são sequências de DNA que podem mudar de posição no genoma e foram descritos pela primeira vez, na década de 40, por Barbara McClintock (PRAY; ZHAUROVA, 2008).

Grande parte do DNA são elementos transponíveis e que podem ser inseridos em novas localizações dentro de um cromossomo, por vezes replicados e inseridos em outros locais. E é justamente essa transposição que classifica esses elementos transponíveis.

Os retrotransposons, considerados classe I se movem pelo genoma e são intermediados pelo RNA. Neste sistema, os elementos transponíveis produzem transcritos de RNA que então são convertidos novamente em DNA pela enzima transcriptase reversa. Esta nova cópia se insere por si só em outro ponto do genoma num mecanismo conhecido como “copiar e colar” e produz mutações estáveis e aumento do tamanho do genoma (PRAY, 2008a; SANTOS 2013). Os retrotransposons ainda são divididos em dois grupos: presença e ausência de regiões delongas repetições terminais (LTR) (SMÝKAL, 2006). Em plantas, os retrotransposons são observados em regiões próximas aos genes e são formados

por longas sequências repetidas com região terminal altamente conservada (FALEIRO, 2007).

Os retrotransposons-LTR (*long terminal repeat*) que pertencem à classe I, são os principais componentes da maioria dos genomas vegetais (MA et al., 2004). As regiões de longas repetições terminais(LTR) dos retrotransposons são sequências que tendem a ser altamente conservadas e são essenciais para a integração e expressão de sinais promotores e de processamento. Essa região é, geralmente, utilizada para o anelamento de iniciadores específicos e desenvolvimento de marcadores baseados em retrotransposons (FALEIRO, 2007). Os transposons, considerados classe II, fazem a transposição via mecanismo de “recortar e colar”, na qual os elementos são excisados e reintegrados em uma nova posição no genoma, ocasionando mutações instáveis (PRAY, 2008; SANTOS, 2013).

O desenvolvimento de marcadores baseados em retrotransposons partem do princípio da existência de uma relação entre os retrotransposons e os genes que podem ser detectados, durante a reação de PCR, por um iniciador localizado próximo ao retrotransposon e um iniciador localizado próximo à região dos genes (SMÝKAL, 2006). As características da atividade de integração, persistência, dispersão, estrutura conservada, motivos das sequências de DNA, e alto número de cópias no genoma sugerem que as sequências de retrotransposons são muito apropriadas para a construção de sistemas de marcadores moleculares (KALENDAR; SCHULMAN, 2006).

Dentre os tipos de marcadores moleculares associados a elementos transponíveis, podemos exemplificar os mais utilizados: IRAP, REMAP, RBIP (*Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism*), S-SAP (*Sequence-Specific Amplification Polymorphism* – para BARE-1, retrotransposons *Ty1-copia* e *Ty3-gypsy*) e IMP (*Inter-MITE Polymorphism* – específico para *MITE-like*).

Sharma e Nandineni (2014) utilizaram iniciadores IRAP e REMAP para identificação e caracterização da diversidade genética de 47 variedades de batata (*Solanum tuberosum* L.). Ambos marcadores moleculares foram capazes de demonstrar através de um dendrograma as similaridades e divergências genéticas

entre as variedades, sendo que os marcadores do tipo IRAP foram os mais eficientes no estudo.

Marcadores IRAP avaliam o polimorfismo retrotransposons, considerando que estes se multiplicam, integrando-se em qualquer sentido dentro do genoma. Os marcadores IRAP detectam estes sítios de inserção dos retrotransposons. Estes marcadores são capazes de amplificar fragmentos de DNA via PCR. Essa amplificação é feita na sequência de DNA entre as LTRs de dois retrotransposons, usando iniciadores que se anelam a partir das LTRs (KALENDAR, et al., 1999; KALENDAR; SCHUMAN, 2006; FALEIRO, 2007) (Figura 2). Espera-se que marcadores moleculares baseados em retrotransposons sejam codominantes (KALENDAR, et al., 1999).

#### IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism)

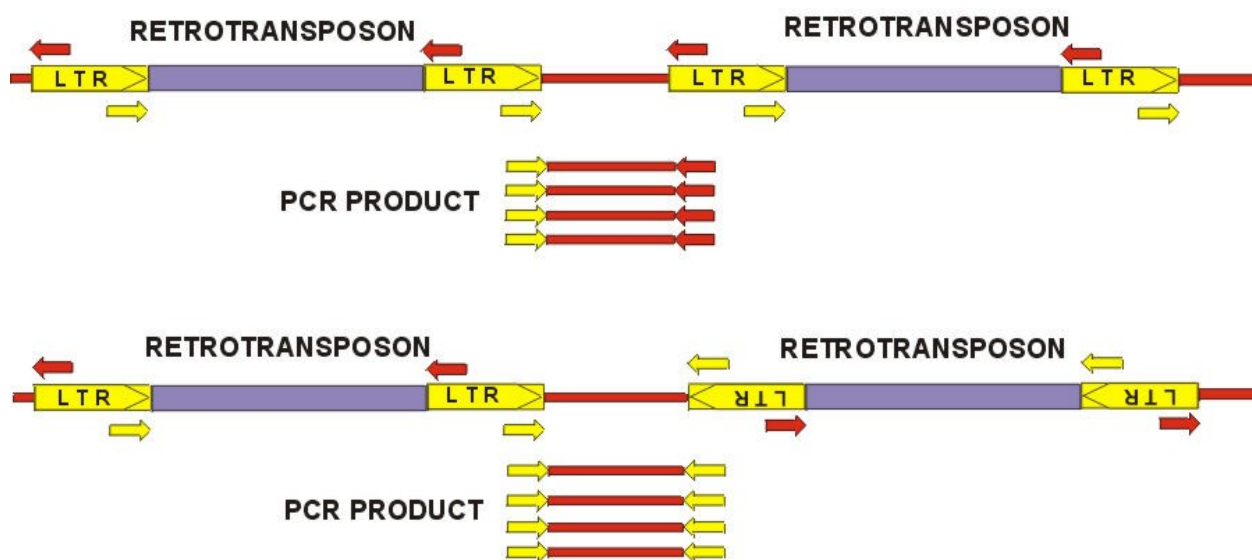


Figura 2: Representação gráfica da amplificação das sequências polimórficas entre retrotransposons.  
Fonte: Schulman

A intenção de utilizar os marcadores IRAP na análise de diversos genótipos de feijão, exige que sejam utilizados iniciadores ou *primers*. Estes iniciadores são pares de oligonucleotídios sintéticos de fita simples, utilizados para iniciar a síntese de um segmento de DNA-alvo. A confecção dos iniciadores exige várias etapas: definição da sequência de base de oligonucleotídios, desenho e validação dos iniciadores (CAIXETA, et al., 2009). Faleiro (2007) especifica os iniciadores como oligonucleotídios de DNA ou RNA capazes de se hibridizar com

uma cadeia de DNA molde e fornecendo uma extremidade 3'-OH livre onde é iniciada a síntese e amplificação de uma sequência de DNA pela DNA polimerase.

### 3.3 Genotipagem para caracterização do germoplasma

O patrimônio genético ou germoplasma de uma espécie pode ser conservado através de bancos, sendo este um recurso potencial para o uso desta espécie em estudos e programas de melhoramento vegetal nos dias atuais e no futuro.

A formação de um banco de germoplasma abrange a conservação de parentes silvestres de plantas cultivadas, variedades crioulas, cultivares obsoletas, cultivares atuais e linhas avançadas de programas de melhoramento, sendo que as amostras coletadas e armazenadas devem representar o indivíduo ou a população em questão. A criação e manutenção de um banco de germoplasma atua na conservação, caracterização e uso do material genético acumulado (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2011).

Segundo Faleiro e Junqueira (2011) existem três formas de conservação de germoplasma: *in situ*, *ex situ* e *on farm*. A conservação *in situ* visa preservar a integridade genética preservando estas espécies dentro de seus ecossistemas habituais ou originais (VICENTE; FULTON, 2003).

A conservação *ex situ* consiste na retirada dos recursos de germoplasma (semente, pólen, organismos individuais, etc) de seu habitat original ou ambiente natural, ou ainda manter os componentes da biodiversidade fora de seu habitat (VICENTE; FULTON, 2003). Este tipo de conservação é especialmente importante para estudos e programas de melhoramento genético. A conservação *ex situ* permite a reunião de recursos genéticos de diversas origens e procedências, assegura a conservação e a disponibilidade contínua e imediata dos recursos genéticos, preservando espécies originadas de locais ameaçados, podendo diminuir a erosão genética das espécies, e por fim, conserva recursos genéticos com importância atual ou potencial.

A conservação *ex situ* pode ser feita usando-se câmaras frias, conservação *in vitro*, criopreservação, conservação a campo ou em laboratório. Esta

estratégia mantém os recursos genéticos em um pequeno espaço sob cuidados intensivos, facilitando a caracterização e uso dos mesmos, além de garantir a sobrevivência e segurança do material por longos períodos (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2011). Segundo Faleiro e Junqueira (2011), a conservação *ex situ* impediria a continuação da evolução das espécies sob esses cuidados, geraria instabilidade genética em sementes ortodoxas, e em alguns casos poderia reduzir a viabilidade devido a perda aleatória de genes por multiplicação de amostras muito pequenas (deriva genética) e por exigir alta demanda financeira.

Conservação *on farm* é uma estratégia complementar à conservação *in situ*, pois permite a continuação do processo evolutivo mesmo em locais onde há condições climáticas diferentes de seu local de origem. Esses recursos genéticos são cultivados principalmente por agricultores, comunidades tradicionais e populações indígenas detentoras de grande diversidade de espécies e conhecimento sobre esses recursos fitogenéticos. Em geral, esses recursos são essenciais para a segurança alimentar da comunidade (MMA, 2015).

A genotipagem é o processo pelo qual se determina as diferenças genéticas de um indivíduo. Este processo pode ser efetuado com diferentes metodologias conforme os recursos disponíveis ou as variáveis de interesse. Este método revela os alelos específicos herdados por um indivíduo e se mostra útil quando uma combinação genotípica apresenta o mesmo fenótipo (PAGON et al., 2015).

A análise de identidade genética ou *fingerprint*, se baseia na detecção de diferenças entre sequências de nucleotídeos que compõe o DNA. Os polimorfismos de fragmentos de DNA podem detectar diferenças entre essas sequências de nucleotídeos sendo portanto utilizados na identificação de indivíduos (FALEIRO, 2011) possibilitando desta forma, eliminar redundâncias em uma coleção ou banco de germoplasma, já que muitas vezes os indivíduos apresentam características fenotípicas muito semelhantes que não permitem a sua diferenciação.

Dados sobre a identidade genética, ou informações moleculares, complementam as informações ecológicas, morfológicas e agronômicas dos recursos genéticos. Estes dados auxiliam no aumento da eficiência dos processos

de coleta, direcionando o enriquecimento da base genética e ajudando a formar e validar coleções nucleares e de trabalho. Essas informações moleculares também possibilitam analisar a diversidade e a pureza genética, além de identificar acessos duplicados e redundantes, auxiliam trabalhos de classificação botânica e filogenia. Dentro dos programas de melhoramento, as informações moleculares subsidiam a seleção de genitores, o planejamento dos cruzamentos e a seleção de genótipos com características desejadas nestes programas (FALEIRO, 2007).

A manutenção da integridade e da estabilidade genética dos recursos genéticos é um dos motivos dos programas de conservação. Os marcadores moleculares podem ser uma forma de analisar esta estabilidade genética de uma determinada coleção de germoplasma após certo período de armazenamento ou ciclo de rejuvenescimento de sementes, já que podem ocorrer perdas por causa da seleção, mutação, erosão genética ou contaminação (FALEIRO, 2007).

Uma estratégia para reduzir o número de acessos de uma coleção-base, ou banco de germoplasma, sem a perda significativa da variabilidade genética, é a criação de uma coleção nuclear. Esta coleção possui entre 10% a 15% do tamanho da coleção original, e representa mais de 70% de sua diversidade genética. Esta coleção objetiva facilitar o trabalho de caracterização e de avaliação de um banco de germoplasma, além de estimular o uso dos recursos genéticos existentes, facilita a montagem de experimentos com repetições em vários ambientes. A coleção nuclear é composta por acessos que representam a variabilidade genética de outros acessos que pertençam ao mesmo grupo de similaridade. Caso seja descoberto potencial em um acesso, este pode ser extrapolado para todo o grupo o qual este acesso representa. A validação das coleções nucleares é feita através da análise da variabilidade genética da coleção base e da coleção nuclear, verificando a porcentagem de variabilidade presente nas duas coleções. Os marcadores moleculares baseados no polimorfismo do DNA possibilitam calcular a distância entre os acessos, auxiliando nesta validação (FALEIRO, 2007).

Adicionalmente, esta análise de identidade genética pode ser essencial na identificação de diferentes cultivares de plantas de importância econômica, contribuindo de forma efetiva para a diferenciação entre cultivares já registradas no Registro Nacional de Cultivares (RNC), podendo fazer parte dos testes de



distinguiabilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE) exigidos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (COSTA, 2007).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 GENÓTIPOS ESTUDADOS

Para este trabalho foram utilizados 22 genótipos de feijão comum pertencentes ao banco de germoplasma da UTFPR, Câmpus Pato Branco. Este grupo foi composto por 11 variedade locais, 7 cultivares comerciais, duas variedades de feijão muito similares às variedades locais que são comercializadas para consumo e variedade F2 resultante do cruzamento entre as cultivares IPR Andorinha e BRS Estilo.

Para fins de análise foram anotadas as características das sementes como vemos na tabela 1. As cultivares ANFC9, IAC Imperador, IPR Andorinha, IPR Siriri, IPR tangará, BRS Estilo, Pérola e F2 possuem tegumento da semente característico do grupo carioca.. Já os genótipos ANFP10, Land5 e Land6 possuem tegumento preto. As variedades locais foram denominadas Land e numeradas de 1 a 11.

Tabela 1: Descrição de características morfológicas das sementes e grupo comercial dos genótipos comerciais e locais de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) usados para genotipagem com marcadores moleculares IRAP. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2015.

Genótipo	Grupo	Sementes		Informações adicionais
		Tegumento	Tamanho	
ANFC 9	Comercial	Bege clara a cinza, com listras marrons	Pequena	
ANFC 10	Comercial	Preto	Pequena	
IPR Andorinha	Comercial	Bege clara a cinza, com listras marrons	Pequena	A cultivar IPR Andorinha originou-se, provavelmente, do cruzamento natural entre a linhagem SEL 37-20, irmã da cultivar IPR 139, de ciclo normal, e a cultivar IPR Colibri, de ciclo precoce.
BRS Estilo	Comercial	Bege clara a cinza, com listras marrons	Pequena	A cultivar BRS Estilo originou-se do cruzamento EMP 250 /4/ A 769 /// A 429 / XAN 252 // V 8025 /PINTO VI 114, realizado em 1991, no Centro Internacional de Agricultura tropical (CIAT), localizado em Cali, Colômbia.

Continuação Tabela 1

Genótipo	Grupo	Sementes		Informações adicionais
		Tegumento	Tamanho	
F2	Cruzamento	Bege clara a cinza, com listras marrons	Pequena	Este genótipo é a segunda geração do cruzamento entre a cultivar IPR Andorinha e BRS Estilo
Land1	Crioulo	Bege com listras roxas	Grande	
Land2	Crioulo	Amarelo	Pequena	
Land3	Crioulo	Vermelho	Média	
Land4	Crioulo	Vermelho com manchas pretas	Média	
Land5	Crioulo	Cinza/roxo com listras pretas	Média	
Land6	Crioulo	Bege	Pequena	Semente originada do genótipo Land7, o qual possui tegumento preto.
Land7	Crioulo	Preto	Pequena	
Land8	Crioulo	Cinza com listras pretas	Média	Semente originada do genótipo Land7, o qual possui tegumento preto.
Land9	Crioulo	Bicolor – Preto e Branco	Pequena	
Land10	Crioulo	Bege com listras pretas	Grande	
Land11	Crioulo	Marrom com listras bege	Pequena	
IAC Imperador	Comercial	Bege clara a cinza, com listras marrons	Pequena	Originada de Cruzamentos múltiplos entre as cultivares de IAC Carioca Eté e Carioca precoce, retrocruzamentos da F1 com IAC Carioca Eté.
Pérola	Comercial	Bege clara a cinza, com listras marrons	Pequena	A cultivar de feijão Pérola (linhagem LR 720982 CPL53) é proveniente de trabalho de seleção de linhas puras da cultivar Aporé, realizado pela Embrapa Arroz e Feijão
Rajado Comercial	Grão Comercial	Bege rajado de marrom	Grande	Grão para alimentação. Adquirida por ser semelhante em tamanho aos genótipos Land1 e Land 10.

Continuação Tabela 1

Genótipo	Grupo	Sementes		Informações adicionais
		Tegumento	Tamanho	
Bolinha	Grão Comercial	Amarelo	Pequena	Sementes morfologicamente idêntica ao genótipo Land2, sendo que foram adquiridas como grãos para consumo alimentar.
IPR Siriri	Comercial	Bege clara a cinza, com listras marrons	Pequena	A PR Siriri é uma cultivar de feijão, grupo comercial carioca, desenvolvida pelo IAPAR em 1995, resultado do cruzamento entre IAPAR 31 e IAC Akitã.
IPR Tangará	Comercial	Bege clara a cinza, com listras marrons	Pequena	Originou-se do cruzamento realizado em casa de vegetação do IAPAR, em Londrina em 1998, entre a linhagem melhorada LP95-92, desenvolvida pelo IAPAR, descendente de IAPAR 31, e a cultivar 31, e a cultivar Pérola.

#### 4.2 DESENHO DOS INICIADORES

O desenho dos iniciadores IRAP teve início com a pesquisa *in silico* dos retrotransposons foi realizada na base de dados Phytozome (GOODSTEIN et al., 2012), que contém as sequências de DNA de *P. vulgaris* (SCHMUTZ et al., 2014), onde foram buscadas as sequências, contendo elementos móveis e DNA repetitivo, localizadas nas regiões intergênicas. As sequências específicas de cada cromossomo foram salvas em um único arquivo formato FASTA, compondo desta forma um total de 11 arquivos.

Os iniciadores IRAP foram desenhados a partir do programa RJPrimer (YOU et al., 2010) analisando as sequências selecionadas para cada cromossomo. Após encontrar a sequência de iniciadores em cada cromossomo, foi feito um alinhamento local no Phytozome.net v 10.1 contra o genoma de *P. vulgaris* para verificar a ocorrência de alinhamentos múltiplos nos cromossomos de feijão. Após o desenho dos iniciadores, as informações foram enviadas para a empresa Síntese

Brasil para que fossem confeccionados os iniciadores conforme as especificações encontradas.

#### 4.3 ISOLAMENTO DO DNA

A extração e isolamento do DNA genômico foram realizados a partir de folhas jovens, de acordo com a metodologia de Doyle & Doyle (1987), com modificações de Lodhi et al. (1994) e Lefort & Douglas (1999).

O material biológico consistiu de folhas jovens (primeiro par de folhas simples) previamente coletadas e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  de cada um dos 22 genótipos descritos na Tabela 1. O DNA foi extraído individualmente de cada planta a partir de 1 g de tecido vegetal. O precipitado de DNA foi ressuspenso em tampão Tris-EDTA, pH 8,0. A qualidade/integridade do DNA foi analisada em gel de agarose 0,8% corado com GelRed (Biotium), visualizado em transiluminador sob luz ultravioleta e fotografado em equipamento de fotodocumentação. A concentração do DNA foi estimada espectrofotometricamente por leitura de absorbância a 260nm, sendo que cada unidade de absorbância corresponde à concentração de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de DNA fita dupla (SAMBROOK et al., 1989).

#### 4.4 AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR

A amplificação do DNA utilizando iniciadores IRAP foi realizada com volume final de reação de 12,5  $\mu\text{L}$ , contendo 12,5 mM de Tris-HCL (pH 8,3), 62,5 mM de KCl, 2,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 75 M de cada um dos deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4  $\mu\text{M}$  de cada par de iniciador, uma unidade da enzima Taq DNA polimerase e 75ng de DNA.

As condições de amplificação passaram por uma etapa inicial de 5 minutos a  $94^{\circ}\text{C}$ , seguida de 30 ciclos de 1 minuto a  $94^{\circ}\text{C}$ , 1 minuto a  $57^{\circ}\text{C}$  e 1 minuto a  $72^{\circ}\text{C}$ . Por fim, uma etapa de 10 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.5 ELETROFORESE

Os produtos da PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2% a 80 V durante 4 horas. Os produtos das ampliações (bandas) foram estimados manualmente por comparação com o marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder). A partir desta análise, os pares de iniciadores foram classificados em presença (1) e ausência (0) de bandas nos genótipos, gerando uma matriz de dados binários.

#### 4.6 ANÁLISE DE DISSIMILARIDADE GENÉTICA

Foi realizado o cálculo do PIC (*Polymorphic information Content*) para quantificar o polimorfismo genético dos locos em análise segundo Botstein et al. (1980) baseado na seguinte fórmula:

$$PIC = 2 * \frac{N1}{Ng * Nb} * 1 - \frac{N0}{Ng * Nb}$$

Onde:

N0= número de ausência de bandas.

N1= número de presença de bandas.

Nb= quantidade de bandas com diferentes pesos moleculares.

Ng= quantidade de genótipos analisados.

O PIC permite quantificar o polimorfismo genético dos locos em análise sendo que os marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, com valores entre 0,25 e 0,5 medianamente informativos e valores inferiores a 0,25 são considerados pouco informativo.

A similaridade entre os genótipos foi analisada utilizando o software NTSYS-PC (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System for personal computers, Version 2.1, Applied Biostatistics, Inc.*) (ROHLF, 2000). A similaridade média dos genótipos foi utilizada como um valor de corte para a definição dos grupos. Para a estimativa da dissimilaridade genética, foi utilizado o coeficiente de Dice (Dice, 1945) gerando um dendrograma a partir da análise de agrupamento UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic means*). Para verificar o

ajuste da matriz de dissimilaridade e o respectivo dendrograma gerado pela matriz, foi estimado o coeficiente de correlação cofenética ( $r$ ) (SOKAL; ROHLF, 1962). Para estimar o grau de correlação da matriz de dissimilaridade obtida foi realizado teste de Mantel com 1000 permutas (MANTEL, 1967), utilizando NTSYS-PC (ROHLF, 2000).

Para a análise dos resultados foram gerados dois dendrogramas. O primeiro gerado com todos os iniciadores IRAP, e o segundo dendrograma apenas com os iniciadores com PIC acima de 0,5 (muito informativo).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram construídos doze iniciadores IRAP para análise de dissimilaridade de vinte e dois genótipos de *P. vulgaris* (Tabela 1). Na Tabela 2 constam os dados sobre o tamanho dos iniciadores, sua sequência de nucleotídeos, tipo de inserção, tamanho do produto esperado na PCR, resultado do alinhamento local e posição no cromossomo. A maioria dos marcadores IRAP, apesar de terem sido desenhados para sequências oriundas de cada um dos cromossomos do feijão, quando foi realizado alinhamento, observou-se que poderiam amplificar diferentes regiões do genoma, característica esperada, por serem baseados em retrotransposons e por esses elementos transponíveis terem a capacidade de se replicar (via mecanismo de transposição “copia” e “cola”) e se inserir em qualquer parte do genoma.

Os marcadores moleculares forneceram informações sobre a variabilidade genética dos genótipos em estudo, identificando diferenças e similaridades a partir dos resultados obtidos com a amplificação por PCR dos fragmentos de interesse, ou iniciadores desenhados. A visualização dos produtos da PCR foi possível através da eletroforese unidimensional, que por sua vez revelou bandas (Figura 3), que permitiram comparar os genótipos quanto à sua presença ou ausência dos referidos fragmentos amplificados.

As bandas reveladas pelos marcadores geraram variáveis qualitativas binárias, sendo que a presença foi codificada pelo número 1, e a ausência pelo número 0. Isso permitiu gerar uma matriz retangular, cujas colunas identificam os genótipos e as linhas, por sua vez, indicam as regiões do DNA em que foram avaliadas as diferenças de dados, aos quais foram aplicados métodos estatísticos.

O número de fragmentos amplificados evidenciado pelos iniciadores em conjunto totalizou 437, sendo que o número de bandas polimórficas foi de 371, atingindo um percentual de 84,9 de polimorfismo. Houve variação de uma a vinte e uma bandas por genótipo. O número de fragmentos amplificados variou de 8 (Pv\_IRAP\_4) a 1 (PV\_IRAP\_1, PV\_IRAP\_9 E PV\_IRAP\_10).

Para o agrupamento dos genótipos, primeiro foi obtida uma matriz de similaridade, para então calcular a distância genética entre indivíduos. Em seguida,



esta matriz foi convertida a uma matriz de dissimilaridade, calculada para gerar um dendrograma onde o coeficiente mais próximo a zero, indica maior proximidade entre os genótipos. Isso se justifica pelo fato de que os coeficientes podem ser divididos em duas categorias: medidas de similaridade e medidas de dissimilaridade. Na similaridade, quanto maior o valor do coeficiente observado, mais parecidos são os indivíduos. Na dissimilaridade, quanto maior o valor observado, menos parecidos são os indivíduos (MEYER, 2002).

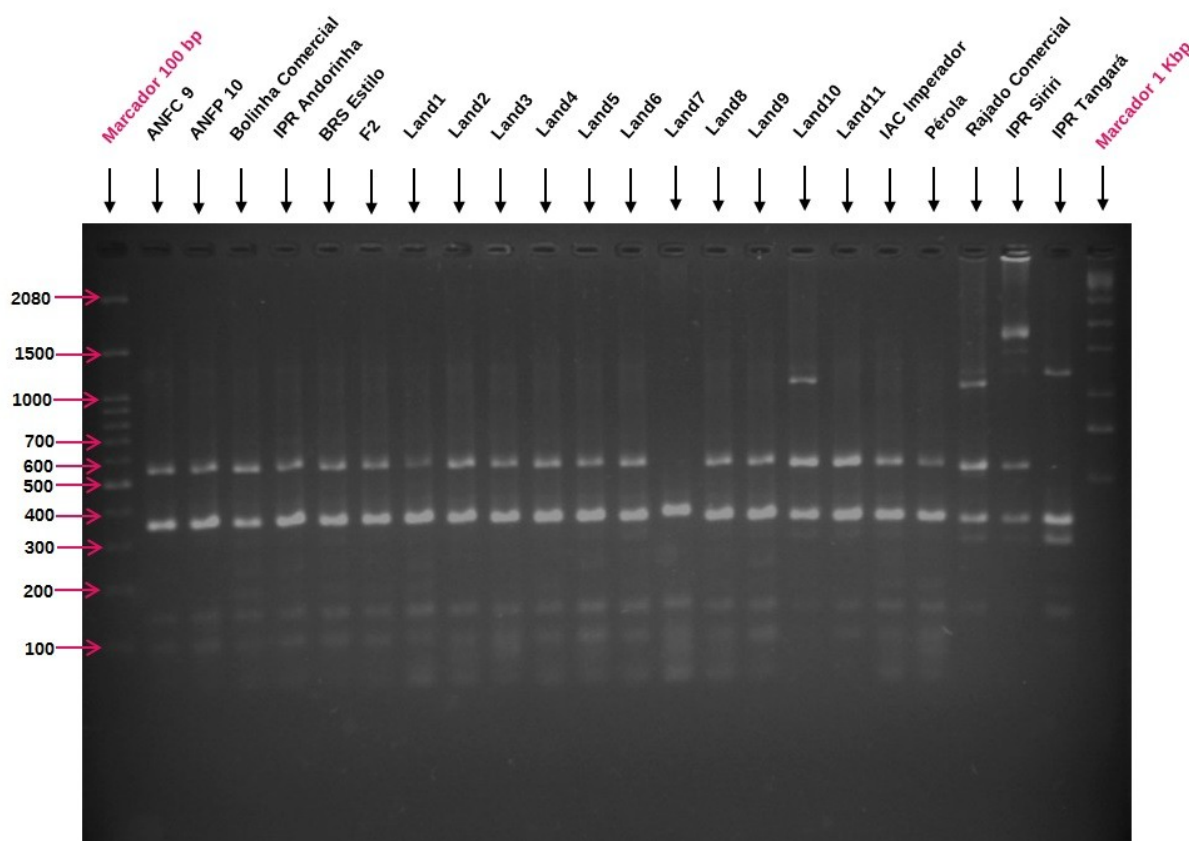


Figura 3: Gel de agarose 2% visualizado sob luz ultravioleta. As bandas representam os produtos da PCR dos 22 genótipos de feijão amplificados com iniciador Pv\_IRAP\_3 que contém 20 pares de bases. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2015

Tabela 2: Características dos iniciadores desenvolvidos para análise da dissimilaridade genética em genótipos de *Phaseolus vulgaris* L. A tabela contém a localização do fragmento de DNA contendo Retrotransposons LTRs no genoma do feijão, sequência e tamanho do iniciador em pares de bases (pb), temperatura de anelamento, tamanho do produto amplificado em pares de bases (pb), porcentagem de Guanina e Citosina (GC %), e as cromossomos em que o iniciador poderá se anelar no genoma do feijão. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2015

Iniciador	Região de origem do fragmento de DNA no Cromossomo	Sequência do iniciador	Tamanho do iniciador (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do produto amplificado	Conteúdo GC (%)	Cromossomos de <i>P. vulgaris</i> em que o iniciador poderá anelar
Pv_IRAP_1_F	Chr09:8260000..8282999	TATCGAACGTTACAAGGCC	20	59,96	386	50	Todos os cromossomos
Pv_IRAP_1_R	Chr09:8260000..8282999	CCATTGCCTAGAAGCCTGTT	20	59,34		50	Todos os cromossomos
Pv_IRAP_2_F	Chr05:10103000..10187999	CCAAGCCTTCAACATCCTTC	20	59,67	329	50	Todos os cromossomos
Pv_IRAP_2_R	Chr05:10103000..10187999	TGGGTTTTTCAGGAACAAGCT	20	59,71	386	45	Todos os cromossomos
Pv_IRAP_3_F	Chr09:8260000..8282999	TATCGAACGTTACAAGGCC	20	59,96		50	Todos os cromossomos
Pv_IRAP_3_R	Chr09:8260000..8282999	CCATTGCCTAGAAGCCTGTT	20	59,34	694	50	Todos os cromossomos
Pv_IRAP_4_F	Chr08:46878000..47009999	GCCAGAAGGATGCAAAAGAG	20	59,96		50	Todos os cromossomos
Pv_IRAP_4_R	Chr08:46878000..47009999	TGGAACAAGAGATGCTGAACA	21	59,43	314	42,86	Chr 02, 08
Pv_IRAP_5_F	Chr10:37197000..37229999	CCGTGAAGAAAGGCATTATTG	21	59,59		42,86	Chr 01, 02, 03, 05, 06, 07, 08, 09, 10
Pv_IRAP_5_R	Chr10:37197000..37229999	GGTGGTGGCAAGTGCTCTAT	20	60,14	513	55	Chr 01, 02, 03, 06, 08, 09, 10, 11
Pv_IRAP_6_F	Chr11:12718000..	GACAATTGGGTGAAAATGGG	20	60,03		45	Chr 11

12787999

Continuação da tabela 2

Iniciador	Região de origem do fragmento de DNA no Cromossomo	Sequência do iniciador	Tamanho do iniciador	Temperatura de anelamento °C	Tamanho do produto	CG%	Cromossomos em que os iniciadores poderão amplificar
Pv_IRAP_6_R	Chr11:12718000..12787999	TGTCAATCTCAACTTGGCTCTT	22	58,98	211	40,91	Todos os cromossomos
Pv_IRAP_7_F	Chr06:8169000..8308999	CTTGGAGCTTGCTTCAGTCC	20	60,13		55	Todos os cromossomos
Pv_IRAP_8_R	Chr04:10902000..10947999	CCTCACATCATAATGTTGGCACT	23	61,16	329	43,48	Todos os cromossomos
Pv_IRAP_9_F	Chr05:10103000..10187999	TGGGTTTTTCAGGAACAAGCT	20	59,71		45	Múltiplos todos os cromossomos
Pv_IRAP_9_R	Chr05:10103000..10187999	CTTGGAGCTTGCTTCAGTCC	20	60,13	499	55	Múltiplos todos os cromossomos
Pv_IRAP_10_F	Chr05:10103000..10187999	TGGATGTCAAAAGTGCCTTCT	21	59,73		42,86	Chr 05, 07,08, 09, 10,11
Pv_IRAP_10_R	Chr05:10103000..10187999	TAACAGCTTGATGGCATTGG	20	59,69	700	45	Todos os cromossomos
Pv_IRAP_11_F	Chr05:10103000..10187999	TTGTGGCATAAACGTTTGAGTC	22	60,04		40,91	Múltiplos Chr 01 a 10
Pv_IRAP_11_R	Chr05:10103000..10187999	CCAAGCCTTCAACATCCTTC	20	59,67	700	50	Todos os cromossomos
Pv_IRAP_12_F	Chr06:14516000..14621999	ACACCCCAACAAAATGGTGT	20	59,99		45	Todos os cromossomos
Pv_IRAP_12_R	Chr06:14516000..14621999	TTGCTGCTATCCAGTTGCTG	20	60,16		50	Chr 10, 06 04

A correlação cofenética mede o grau de ajuste entre a matriz de similaridade original e a matriz resultante da simplificação proporcionada pelo método de agrupamento, sendo assim, quanto mais próxima de 1, menor será a distorção provocada pelo agrupamento dos indivíduos com o método UPGMA (MEYER, 2002). Partindo dessas análises, o dendrograma gerado com os iniciadores que obtiveram conteúdo de informação polimórfica muito informativo (Figura 5) foi o que apresentou a menor distorção pois apresentou um coeficiente de correlação cofenética de 0,82968.

O PIC (Polymorphic information Content) permite quantificar o polimorfismo genético dos locos em análise e de acordo com Botstein et al. (1980), os marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, com valores entre 0,25 e 0,5 medianamente informativos e valores inferiores a 0,25 são considerados pouco informativo. Na Tabela 3 são indicados os valores de PIC obtidos pelos iniciadores analisados.

Tabela 3: Conteúdo de informação polimórfica (PIC) dos iniciadores IRAP desenvolvidos. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2015.

<b>Iniciador</b>	<b>Conteúdo de informações polimórficas (PIC)</b>
Pv_IRAP_1	1,194
Pv_IRAP_2	0,441
Pv_IRAP_3	0,243
Pv_IRAP_4	0,256
Pv_IRAP_5	0,073
Pv_IRAP_6	0,202
Pv_IRAP_7	0,232
Pv_IRAP_8	0,456
Pv_IRAP_9	1,822
Pv_IRAP_10	0,5
Pv_IRAP_11	0,254
Pv_IRAP_12	0,121

A partir da análise integral dos dados feita com todos os iniciadores desenvolvidos, obteve-se uma correlação cofenética de valor 0,69447 possibilitando

a construção de um dendrograma (Figura 4) onde há uma maior distância genética entre dois grupos.

O primeiro grupo contém os dois genótipos ANFC9 E ANFP 10, os quais são sementes comerciais e pertencentes à mesma empresa de melhoramento genético, os genótipos Bolinha e Land2 que são fenotipicamente parecidos para as características de semente ficaram agrupados, demonstrando que são similares.

As variedades locais Land1, Land3 e Land4 permaneceram no grupo superior do dendrograma, sendo que os genótipos Land3 e Land4 se mostram mais próximos geneticamente, não só no nível molecular, mas também em função de suas características (tegumento vermelho) darem um indício de que já fossem próximas. Os genótipos IPR Andorinha e BRS Estilo foram cruzados, dando origem ao genótipo F2, que tem maior similaridade com o genótipo IPR Andorinha. Contudo se espera máxima heterozigose por se tratar de uma semente da geração F2 (CHEDIAK, 2007). O fato da cultivar BRS Estilo ter sido gerada através de vários cruzamentos na Colômbia e estando este País localizado próximo a um dos centros de origem do *P. vulgaris*, facilita o entendimento de seu posicionamento entre as variedades locais.

O segundo grande grupo observado contempla a maior parte dos genótipos comerciais de feijão utilizados no experimento. Agrupando genótipos como o IPR Siriri, IPR Tangará e Pérola com um coeficiente de 0,54 de distância do outro grupo. Os genótipos IPR Siriri e IPR Tangará apresentaram uma distância euclidiana de aproximadamente 0,35 demonstrando certa similaridade, pois as duas cultivares têm como genitor a cultivar IPR 31. A distância euclidiana entre a cultivar Pérola e a cultivar IPR Tangará foi de aproximadamente 0,37, ficando localizadas num mesmo grupo gênico.

Nesse grupo também ficaram agrupados, muito próximos, os genótipos Land5, Land7 e Land6, que aparentemente está segregando naturalmente. O genótipo Land8, que também é descendente do genótipo Land7, ficou agrupado com as variedades locais, com fenótipos bem distintos de sua planta mãe, sugerindo que pode ter havido um cruzamento espontâneo durante seu cultivo. Os genótipos Land6 e Land8 foram colhidos de plantas utilizadas em experimento, ou seja, os riscos de

mistura física das sementes eram muito baixos. Os dois genótipos são provenientes de sementes de feijão crioulo, aqui denominado Land7.

Os marcadores IRAP indicaram uma grande similaridade entre os genótipos Land9 e Land10, contudo, estes dois genótipos possuem características fenotípicas bastantes distintas conforme a descrição da tabela 1.

O agrupamento dos genótipos com PIC muito informativo resultou num dendrograma com coeficiente de correlação cofenética média de 0,8296, sendo a análise mais confiável entre os dendrogramas analisados (Figura 5). Os iniciadores avaliados para a construção do dendrograma foram Pv\_IRAP\_1, Pv\_IRAP\_9 e Pv\_IRAP\_10. Este dendrograma formou dois grandes grupos geneticamente diferentes com subgrupos coerentes de acordo com a origem e fenótipo. A formação destes dois grupos pode vir a reforçar a separação dos grupos pelo seu centro de origem – Mesoamericano e Andino. Um dos fatores indicativos é a presença da cultivar Pérola que tem por base genética feijões de origem mesoamericana, bem como a maior parte da base genética do melhoramento de feijão no Brasil. Outro ponto a ser observado é que cultivares com características descritas como carioca foram também consideradas como mesoamericanas (CARVALHO, 2008; GEPTS et al., 1988)

No grupo superior no dendrograma, observou-se o isolamento do genótipo Land8. Este genótipo é descendente do genótipo Land7, porém, originou sementes com tegumento cinza com listras pretas bastante distinta de sua linhagem materna que apresenta tegumento inteiramente preto. Chediak et al. (2007) encontraram caso similar, onde houve variação genética detectada pelos marcadores e visualmente pelo padrão fenotípico da semente. Chediak et al. (2007) indica ocorrência de cruzamento natural no processo de obtenção de semente genética. Isto corrobora a hipótese inicial para que tenha havido um cruzamento natural no momento da produção de sementes do genótipo Land7 originando sementes com padrões distintos de seu progenitor materno.

O genótipo Land4, apesar de estar mais próximo dos demais subgrupos, também apresentou um isolamento. Os genótipos Bolinha, Land2, Land3, Land5, Land6 e Land7 foram reunidos em um único grupo, indicando similaridade entre as variedades locais. A variedade Bolinha, vendida comumente

como grãos para alimentação, mostrou-se geneticamente próxima do genótipo crioulo Land2. Ambas possuem o mesmo aspecto de sementes amarelas, pequenas e com formato mais arredondado. Aqui há necessidade de uma investigação mais apurada para verificar se é um genótipo crioulo vendido comercialmente já que seu agrupamento se deu muito próximo às demais variedades, ou se é uma cultivar comercial que está sendo guardada pelos agricultores.

Outro grupo com grande similaridade foi composto pelos genótipos ANFC9, ANFP10, IPR Andorinha, BRS Estilo, F2 e Land1. A maior característica deste grupo é o grande número de membros pertencentes ao grupo carioca. À exceção do genótipo ANFP10 que apresenta coloração preta no tegumento. O genótipo Land1 é um genótipo crioulo, cultivado pelos agricultores da região, porém sua manutenção no banco de germoplasma é feita concomitantemente a genótipos comerciais, possibilitando algum cruzamento espontâneo fazendo que haja variação genética, porém não fenotípica. Ou ainda, há a possibilidade deste genótipo também ser uma cultivar comercial que é guardada pelos agricultores.

O genótipo crioulo Land9, que possui tegumento bicolor, aparece, neste dendrograma com alta similaridade com um genótipo comercial IAC Imperador com tegumento de característica carioca. Isso pode indicar que há uma transmissão de caracteres genéticos por cruzamentos durante a multiplicação de sementes.

Os genótipos IPR Siriri e IPR Tangará mostraram-se similares confirmando seu parentesco por parte da cultivar IPR 31, bem como a distância genética relativamente pequena entre o genótipo IPR Tangará e seu parental Pérola.

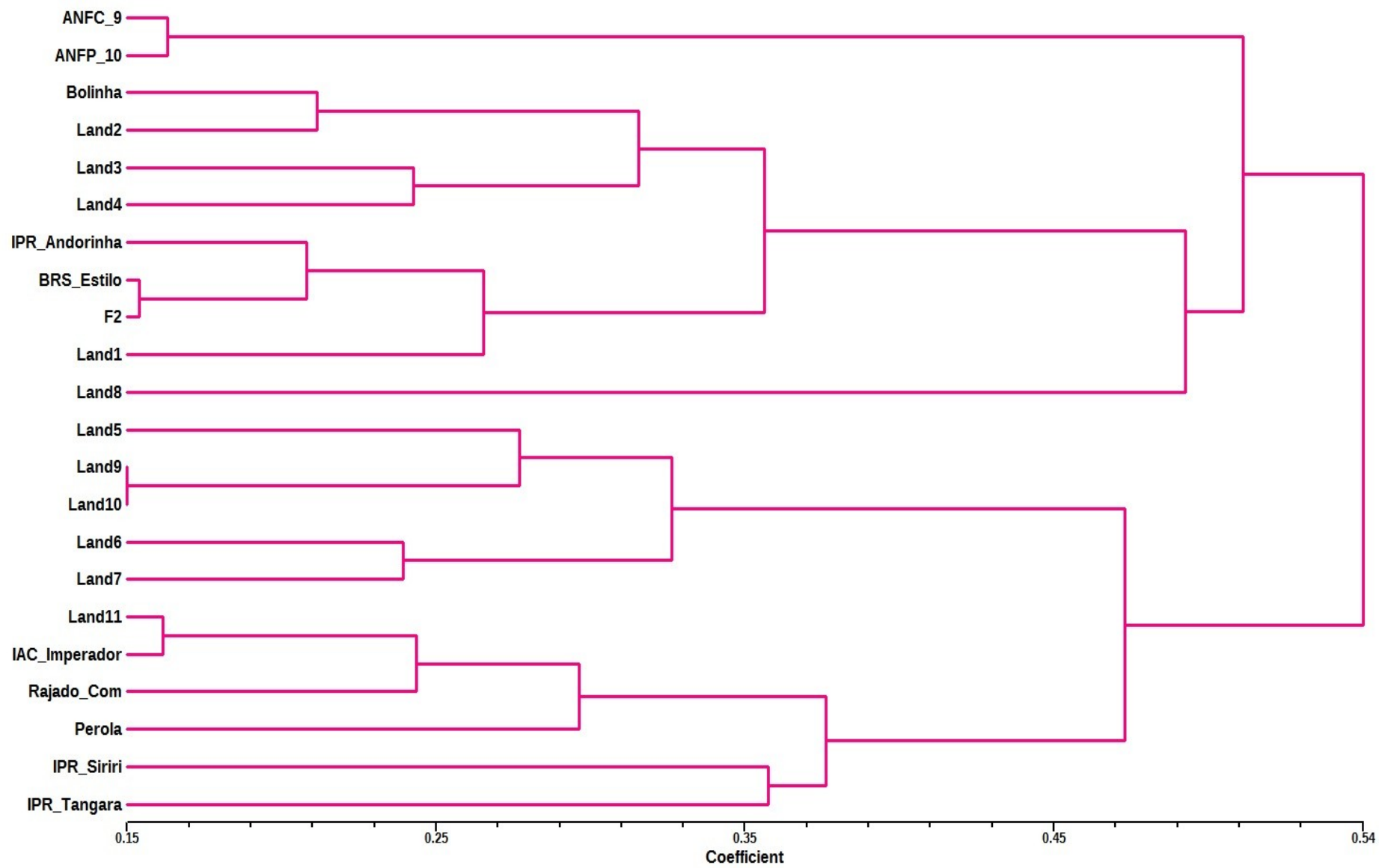


Figura 4: Dendrograma de dissimilaridade genética gerado a partir da matriz de distância Euclidiana, com agrupamento pelo método UPGMA mostrando as relações genéticas entre os 22 genótipos a partir dos resultados de 12 pares de iniciadores IRAP desenvolvidos e analisados. UTFPR, Câmpus Pato; Branco, 2015.



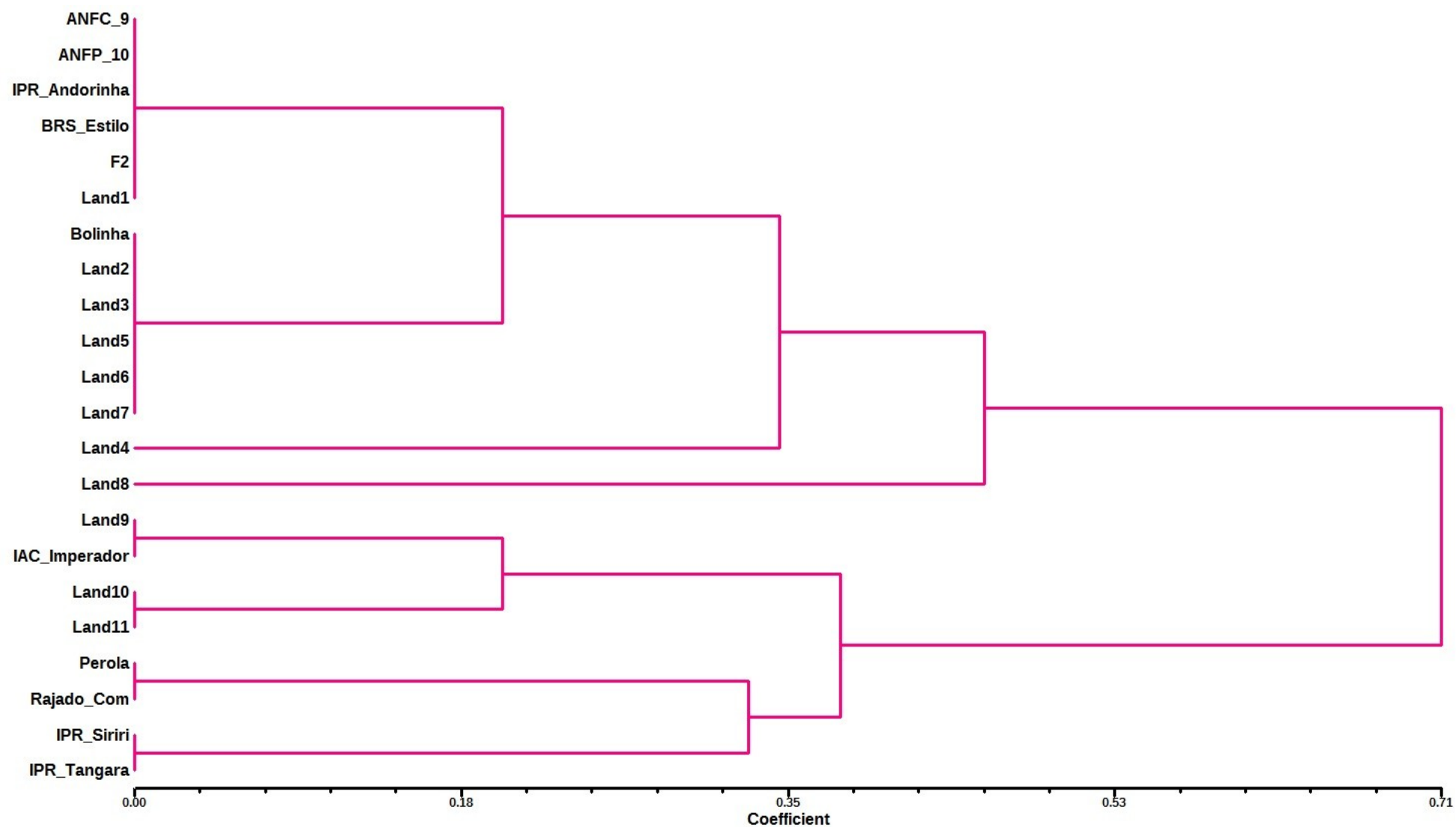


Figura 5: Dendrograma de dissimilaridade genética gerado a partir da matriz de distância Euclidiana, com agrupamento pelo método UPGMA mostrando as relações genéticas entre os 22 genótipos a partir dos resultados dos pares de iniciadores IRAP com conteúdo de informação polimórfica (PIC) muito informativo. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2015.

## 6 CONCLUSÕES

Os marcadores IRAP confeccionados se mostraram eficientes na identificação da dissimilaridade genética entre os genótipos avaliados.

Os iniciadores Pv\_IRAP\_1, Pv\_IRAP\_9 e Pv\_IRAP\_10 são os mais informativos no quesito de conteúdo de informação polimórfica (PIC). A análise de agrupamento resultante da amplificação dos iniciadores IRAP resultou num dendrograma com coeficiente de correlação cofenética de 0,8296, sendo este um valor que aumenta a confiabilidade dos resultados da genotipagem devido à menor distorção provocada pelo agrupamento dos indivíduos pelo método UPGMA.

O uso de marcadores moleculares IRAP possibilita caracterizar a variabilidade genética, e possibilita otimizar bancos de germoplasma, estabelecimento de coleções nucleares, na seleção assistida por marcadores moleculares em programas de melhoramento e identificação de mistura varietal.

## REFERÊNCIAS

AFONSO, Silvia. M. E. Caracterização Físico-Química e Actividade Antioxidante de Novas Variedades de Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Dissertação** (Mestrado) - Escola Superior Agrária de Bragança. Portugal, Bragança, 2010. Disponível em: < <https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/4083/1/tese%20feijao.pdf> > Acesso em: 20 julho 2014.

A MANUAL. Mutant Germoplasm Characterization using molecular markers. IAEA, VIENNA, 2002

VICENTE, M. Carmen. de.; FULTON, Theresa.; Glossary. In **Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity. IPGRI and Cornell University, 2003.** Disponível em: <[http://croptgenebank.sgrp.cgiar.org/images/file/learning\\_space/molecular\\_markers/volume1/Glossary.pdf](http://croptgenebank.sgrp.cgiar.org/images/file/learning_space/molecular_markers/volume1/Glossary.pdf) > Acesso em Abr. 2015

BARBOSA, Flávia. R. et al. **Manejo da mosca-branca na cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Nordeste do Brasil.** Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2001. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPATSA/26988/1/CTE72.pdf> >. Acesso em: 04 dez. 2014.

BARBOSA, Flávia. R.; GONZAGA, Augusto. C. O.; **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014.** Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2012. Disponível em: < [http://www.cnpaf.embrapa.br/transferecia/informacoestecnicas/publicacoesonline/seriedocumentos\\_272.pdf](http://www.cnpaf.embrapa.br/transferecia/informacoestecnicas/publicacoesonline/seriedocumentos_272.pdf) >. Acesso em: 20 jul. 2014.

BALARDIN, Ricardo. S. CEPEF - **Comissão Estadual de Pesquisa de Feijão: recomendações técnicas para cultivo no Rio Grande do Sul.** Santa Maria: UFSM, 2000. 80 p. Disponível em: <<http://w3.ufsm.br/nppce/disciplinas/recomenda.pdf> > Acessado em agosto de 2015.

BEEBE, Stephen, Successes and Challenges in Improving common Bean Productivity. In **Tropical Agriculture.** Disponível em: <<http://www.cgiar.org/www-archive/www.cgiar.org/pdf/Beebe-SummaryChallengesinBeanimprovement.pdf> > Acessado em 17 de abr. 2015.

BORÉM, Aluízio; CARNEIRO, José E. S. A cultura. **Feijão.** Viçosa: Editora UFV, 2006.

BOTSTEIN, David; WHITE, Raymond. L.; SKOLMICK, Mark.; DAVIS, Ronald W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisn. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.

Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1686077/pdf/ajhg00189-0020.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1686077/pdf/ajhg00189-0020.pdf)> Acessado em setembro de 2015.

BRAMMER, Sandra Patussi, Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal. **Documentos online** Passo Fundo: 2000. Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p\\_do03.pdf](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do03.pdf)> Acessado em Abr. 2015.

CAIXETA, Eveline T., OLIVEIRA, Antônio Carlos B., BRITO, Giovani G., SAKIYAMA, Ney S. Tipos de Marcadores Moleculares. **Marcadores Moleculares**. Viçosa: UFV, 2009.

CARVALHO, Márcio. F.; CRESTANI, Maraisa; FARIAS, Francine L.; COIMBRA, Jefferson L.M.; BOGO, Amauri; GUIDOLIN, Altamir F. Caracterização da diversidade genética entre acessos crioulos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) coletados em Santa Catarina por marcadores RAPD. **Ciência Rural**, v.38, n.6, p.1522-1528, set, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v38n6/a05v38n6.pdf>> Acessado em outubro de 2015.

CGIAR. Leveraging legume to combat poverty, hunger, malnutrition and environmental degradation. **Research Program on Grain Legume**. 2012, Disponível em <[http://library.cgiar.org/bitstream/handle/10947/2559/CGIAR\\_Research\\_Program\\_on\\_Grain\\_Legumes\\_Proposal\\_2012-08-15.pdf?sequence=4](http://library.cgiar.org/bitstream/handle/10947/2559/CGIAR_Research_Program_on_Grain_Legumes_Proposal_2012-08-15.pdf?sequence=4)> Acessado em Abr. 2015.

CHEDIAK, Giselle L. C.; BRONDANI Rosana P. V.; DEL PELOSO, Maria José; MELO, Leonardo C.; BRONDANI, Cláudio. Análise de Pureza genética de sementes de feijoeiro comum utilizando marcadores microssatélites em sistema de genotipagem multiplex. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento 28**. Santo Antonio de Goias, GO: Embrapa, 2007. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/bolpesq\\_28\\_000fmxki1a802wyiv\\_8065610dqt931bi.pdf](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/bolpesq_28_000fmxki1a802wyiv_8065610dqt931bi.pdf)> Acessado em outubro de 2015.

COSTA, Ezenildo Xavier. Orientações e Informações Técnicas in: **Registro Nacional de cultivares**. Brasília – DF: 2007. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arg\\_editor/file/vegetal/Sementes\\_e\\_mudas/Registro\\_Nacional\\_de\\_Cultivares.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arg_editor/file/vegetal/Sementes_e_mudas/Registro_Nacional_de_Cultivares.pdf)> Acessado em Abr. 2015.

COSTA, Joaquim G.C. SANTIAGO, Carlos. M., PEREIRA Ronair.J. Coleta de variedades tradicionais (crioulas) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) na região norte do Rio Grande do Sul. **Documentos 260**. Santo Antônio de Goiás, GO, 2010. Disponível em: <[http://www.cnpaf.embrapa.br/transferecia/informacoestecnicas/publicacoesonline/seriedocumentos\\_260.pdf](http://www.cnpaf.embrapa.br/transferecia/informacoestecnicas/publicacoesonline/seriedocumentos_260.pdf)> Acessado em outubro de 2015.

DICE Lee R.; Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26: 297–307, 1945. Disponível em <[http://www.jstor.org/stable/1932409?origin=crossref&seq=1#page\\_scan\\_tab\\_contents](http://www.jstor.org/stable/1932409?origin=crossref&seq=1#page_scan_tab_contents)> Acessado em outubro de 2015.

DOYLE, Jeffrey J.; DOYLE, Jane. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.

FALEIRO, Fábio Gelape. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/download/1368/t>> Acessado em outubro de 2015.

FALEIRO, Fábio Gelape. Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal. In **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011.

FALEIRO, Fábio Gelape; JUNQUEIRA, Nilton Tadeu Vilela. Recursos genéticos: conservação, caracterização e uso. In **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011.

FALEIRO, Fábio Gelape. Princípio científico e análises genéticas utilizando marcadores moleculares. **Biotecnologia, estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011.

FALEIRO, Fábio Gelape. Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal. In **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011.

FAO: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS DIVISION – **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 20 de out.. 2014.

FERREIRA, Agmar Gonçalves. Caracterização morfológica, citogenética e palinológica de genótipos de feijão-vagem *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae). **Dissertação** (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, 2008. Disponível em: <<http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/gmp/m/3470.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2014.

GEPTS P.; KMIECIK, K., BLISS, F.A. Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability: I. The Americas. **Economic Botany**, New York, v.42, p.73–85, 1988. Disponível em:

<<http://link.springer.com/journal/12231/42/1/page/1#page-1>> Acessado em outubro de 2015.

GIOIA, Tania; LOGOZZO, Giuseppina; ATTENE, Giovanna; BELLUCCI, Elisa; BENEDETTELLI, Stefano; NEGRI, Valéria; PAPA, Roberto; ZEULI, Pierluigi S. Evidence for Introduction Bottleneck and Extensive Inter-Gene Pool (Mesoamerica x Andes) Hybridization in the **European Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Germplasm**. **PLoS ONE** 8(10): e75974. doi:10.1371/journal.pone.0075974 Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3788063/pdf/pone.0075974.pdf>>

Acessado em Abr. 2015

GOODSTEIN, David M.; SHU, Shengqiang; HOWSON, Russell; NEUPANE, Rochak; HAYES, Richard D.; FAZO, Joni; MITROS, Therese; DIRKS, William; HELLSTEN, Uffe; PUTNAM, Nicholas; ROKHSAR, Daniel S. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics, **Nucleic Acids Research**. 2012 40 (D1): D1178-D1186 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3245001/>> Acessado em Abr. 2015.

KALENDAR, R.; GROB, T.; REGINA, M.; SUONIEMI, A.; SCHULMAN Alan. IRAP and REMAP two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. **Theoretical and Applied Genetics**. April 1999, Volume 98, Issue 5, pp 704-711. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs001220051124>> Acessado em setembro de 2014.

KALENDAR, R., SCHULMAN, Alan H.; IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. **Nature Protocols** 1:2478–2484, 2006. Disponível em : <<http://www.nature.com/nprot/journal/v1/n5/full/nprot.2006.377.html>> Acessado em Abril de 2015.

KALENDAR, R.; FLAVELL, A.J.; ELLIS, T. H. N.; SJAKSTE, T.; MOISY, C.; SCHULMAN, Alan H. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. **Heredity**, 106(4), p.520–530, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/hdy.2010.93>>. Acessado em Abril 2015.

LEFORT, François; DOUGLAS, Gerard C. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species Acer, Fraxinus, Prunus and Quercus. **Annals of Forest Science**, v. 56, p. 259-263, 1999. Disponível em: <<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00883270/document>> Acessado em Abril 2014.

LODHI, Muhammad. A.; YE, Guang-Ning; WEEDEN, Norman, F.; REISCH Bruce, I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, Vitis species and Ampelopsis. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 12, p. 6-13, 1994. Disponível em: <[http://www.researchgate.net/publication/226634013\\_A\\_simple\\_and\\_efficient\\_metho](http://www.researchgate.net/publication/226634013_A_simple_and_efficient_metho)

[d\\_for\\_DNA\\_extraction\\_from\\_grapevine\\_cultivars\\_andVitis\\_species.\\_Plant\\_Mol\\_Biol\\_Rep\\_12\\_6-13](#)> Acessado em Abril de 2014.

MA, Jianxin, DEVOS, Katrien M., BENNETZEN, Jeffrey L. 2004. Analyses of LTR retrotransposon structures reveal recent and rapid genomic DNA loss in rice. **Genome**. 14(5):860-869. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC479113/pdf/0140860.pdf>> Acessado em Abril de 2015.

MAIA, Luciano C., PALMIERI, Dario A., DE SOUZA, Velci Q., KOPP, Mauricio M., DE CARVALHO, Fernando I., COSTA DE OLIVEIRA, Antonio. SSR Locator: tool for simple sequence repeat discovery integrated with primer design and PCR simulation. **Int. J. Plant Genomics** 2008: 412696. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2486402/pdf/IJPG2008-412696.pdf>> Acessado em Abril de 2015.

MANTEL, Nathan; The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, 27:209–220, 1967. Disponível em: <[http://cancerres.aacrjournals.org/content/27/2\\_Part\\_1/209.long](http://cancerres.aacrjournals.org/content/27/2_Part_1/209.long)> Acessado em Abril de 2015.

MEYER, Andréia S. Comparação de coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes. **Dissertação** - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11134/...24072002.../andreaia.pdf>> Acessado em outubro de 2015.

MILACH, Sandra C.K. Marcadores de DNA. In **Biotecnologia Ciência e desenvolvimento**. Ano 1, Número 5. Março/Abril de 1998. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio05/marcadoresdna.pdf>> Acesso em: 03 abr. 2015.

MMA, Ministério do Meio Ambiente, 2015. **Conservação in situ, ex situ e on farm**. (613), p.1–4. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/conservacao-e-promocao-do-uso-da-diversidade-genetica/agrobiodiversidade/conservacao-c3a7c3a3o-in-situ.-ex-situ-e-on-farm> > Acessado em Abril de 2015.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. Illustrate **Glossary**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5191/#IX-G>> Acesso em: 18 abril de 2015.

PAGON RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/NBK1116/>

PELOSO, Maria José D.; COSTA, Joaquim G.C.; RAVA, Carlos A.; FARIA, Luis C.; **Sistemas de Produção, 2: Cultivo do Feijoeiro Comum**. Embrapa Arroz e Feijão, versão eletrônica Jan/2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/cultivares.htm>>. Acesso em: 20 jul. 2013.

POCZAI, Péter; VARGA, Ildikó; LAOS, Maarja; CSEH, András; BELL, Neil; VALKONEN, Jari P. T.; HYVÖNEN, Jaakko. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. **Plant Methods**. 2013. Disponível em: <<http://www.plantmethods.com/content/9/1/6>> Acessado em outubro de 2015.

PRAY, Leslie. Transposons, or jumping genes: Not junk DNA? **Nature Education** 1(1):32, 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/scitable/topicpage/transposons-or-jumping-genes-not-junk-dna-1211>>. Acessado em outubro de 2015.

PRAY, Leslie. Transposons: The jumping genes. **Nature Education** 1(1):204 2008). Disponível em: <<http://www.nature.com/scitable/topicpage/transposons-the-jumping-genes-518>> Acessado em outubro de 2015.

PRAY, Leslie; ZHAUROVA, Kira. Barbara McClintock and the discovery of jumping genes (transposons). **Nature Education** 1(1):169, 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/scitable/topicpage/barbara-mcclintock-and-the-discovery-of-jumping-34083>> Acessado em outubro de 2015.

ROHLF F. James; NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. **Exeter Software**, New York. 2000. Disponível em: <[http://www.researchgate.net/publication/246982444\\_NTSYS-pc\\_Numerical\\_Taxonomy\\_and\\_Multivariate\\_Analysis\\_System\\_Version\\_2.20k](http://www.researchgate.net/publication/246982444_NTSYS-pc_Numerical_Taxonomy_and_Multivariate_Analysis_System_Version_2.20k)> Acessado em Abril de 2015.

SAMBROOK, Joseph, FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular cloning a laboratory manual, 2nd Ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, V. 3, 1989.

SANTOS, João Bosco; GAVILANES, Manuel Losada. Botânica. **Feijão**. Viçosa: Editora UFV, 2006.

SANTOS, Gabriela G. Transposons e retrotransposons como marcadores moleculares em plantas. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2013. Disponível em: <<http://repositorio.ufpel.edu.br/handle/123456789/1208>>. Acessado em Outubro de 2015.



SANTOS, Monique. Qualidade fisiológica e bioquímica de sementes de feijão crioulo em condições de estresse por frio. **Dissertação** (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2014. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/129261>> Acessado em outubro de 2015.

SCHMUTZ, Jeremy; MCCLEAN, Phillip E; MAMIDI, Sujana; WU, G Albert; CANNON, Steven B; GRIMWOOD, Jane. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. **Nature Genetics**. Nature Publishing Group. Jun.2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/ng/journal/v46/n7/full/ng.3008.html>> Acessado em 03 Jan. 2015.

SHARMA, Vishakha.; NANDINENI, Madhusudan.R.. Assessment of genetic diversity among Indian potato (*Solanum tuberosum* L.) collection using microsatellite and retrotransposon based marker systems. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 2014. 73(1), p.10–17. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2014.01.003>> Acessado em Abr. 2015

SCHULMAN, Alan H. IRAP and REMAP. **Development of retrotransposons into practical molecular markers**. Disponível em: <<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/genomedynamics/markers.html>> Acessado em outubro de 2015.

SILVA, Heloísa T.; COSTA, Aline O.; **Caracterização botânica de espécies silvestres do gênero Phaseolus L. (Leguminosae)**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2003. Disponível em: <[http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAF/21629/1/doc\\_156.pdf](http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAF/21629/1/doc_156.pdf)>. Acesso em: 20 jul. 2013.

SOKAL, Robert R, ROHLF F. James. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon** 11:30–40, 1962. Disponível em: <[http://www.jstor.org/stable/1217208?seq=1#page\\_scan\\_tab\\_contents](http://www.jstor.org/stable/1217208?seq=1#page_scan_tab_contents)>. Acessado em Outubro de 2015.

SOUZA, Thiago L. P. O; PEREIRA, Helton; FARIA, Luís; WENDLAND Adriane; COSTA, Joaquim; ABREU, Ângela; DIAS, José; MAGALDI, Mariana; SOUZA, Nilda; DEL PELOSO, Maria José; MELO, Leonardo. Cultivares de feijão comum da Embrapa e parceiros disponíveis para 2013. **Comunicado Técnico 211**. Embrapa Arroz e Feijão. P.6-11, Santo Antônio de Goiás, GO, 2013. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/97404/1/comunicadotecnico-211.pdf>> Acessado em outubro de 2015

SMÝKAL, Peter. Development of an efficient retrotransposon-based fingerprinting method for rapid pea variety identification. **Journal of applied genetics**,

47(3),p.221–230, 2006. Disponível em 56  
<<http://link.springer.com/article/10.1007%2F03194627> > Acessado em Abril 2015.

VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T.J.;BORÉM, A. **Feijão**. 2 ed. Atualizada – Viçosa Ed UFV, 2006.

YOU, Frank M.; WANJUGI, Humphrey; HUO, Naxin; LAZO, Gerard R.; LUO, Ming-Cheng; ANDERSON, Olin D.; DVORAK, Jan; GU, Yong Q. RJPrimers: unique transposable element insertion junction discovery and PCR primer design for marker development. **Nucleic Acids Research**, 2010, Web Server Issue. doi:10.1093/nar/gkq425. Disponível em:  
<<http://nar.oxfordjournals.org/content/early/2010/05/23/nar.gkq425.full>> Acessado em Abril de 2015.

**ÍNDICE DE APÊNDICES E ANEXOS**

ANEXO A - Tabela de Raças e grupos gênicos de feijão comum cultivado (adaptado de SINGH, 1993 apud. SANTOS E GAVILANES, 2006).....	59
--	----

**ANEXOS**

ANEXO A - Tabela de Raças e grupos gênicos de feijão comum cultivado (adaptado de SINGH, 1993 apud. SANTOS E GAVILANES, 2006)

Origem/Raça	Grupo gênico	Cultivares	Sementes		Hábito de crescimento	Ciclo (dias)	Faseolina
			Tamanho	Cor			
<b>Mesoamericana</b>							
Mesoamericana	1	Brazil2, Sanilac	pequena	preta, branca, creme	determinado, prostrado ou ereto, tipo I	0	S
	2	Rio tibagi	pequena	preta, branca, creme	indeterminado, semitrepador, tipo II	0	S,B
	3	Carioca mulatinho, Rosinha	pequena	preta, creme, vermelha, rosa, marrom, branca	indeterminado, semitrepador, tipo III	0	S, Sb
	4	Puebla 152	pequena	preta, vermelha, rosa, creme	indeterminado, semitrepador, tipo IV	30	S
Durango	5	Flor de Mayo	média	bege, creme, rosa, branca	indeterminado, semitrepador, tipo IV	10	S, Sd
Jalisco	6	Apetito, Frijola	média	bege, rosa, amarela, preta, vermelha	indeterminado, semitrepador, tipo IV	40	S
<b>Andina</b>							
Nova Granada	7	Calima, Pampadour, Canário	média, grande	vermelha, rosa, creme, branca, bege, amarela	determinado, prostrado ou ereto, tipo I	90	T
	8	Jalo, Pintado	média, grande	vermelha, rosa, creme, bege, creme, branca	indeterminado, semitrepador, tipo II	110	T
	9	Tórtola, Bolita	média, grande	vermelha, bege, creme, rosa, branca	indeterminado, semitrepador, tipo III	90	T
Chile	10	Overitos	média, grande	vermelha, rosa, bege, cinza, branca	indeterminado, semitrepador, tipo III	120	C, H
Peru	11	Cargamanto	média, grande	vermelha, rosa, bege, creme	indeterminado, semitrepador, tipo IV	150	C, H
	12		média	bege, vermelha, creme, branca	indeterminado, semitrepador, tipo IV	250	T, C, H, A