

Christiane Luiza Belele

**Análise Bioquímica e Molecular da  
Diversidade Genética entre Cultivares  
Mesoamericanas e Andinas de Feijoeiro Comum  
(*Phaseolus vulgaris* L.).**

Uberlândia - Minas Gerais  
Junho - 1997

Universidade Federal de Uberlândia  
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

1000  
501.152  
2017  
T. 1011111111

**Análise Bioquímica e Molecular da  
Diversidade Genética entre Cultivares  
Mesoamericanos e Andinos de Feijoeiro Comum  
(*Phaseolus vulgaris* L.).**

Christiane Luiza Belele

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Uberlândia como parte das  
exigências para obtenção do título de Mestre  
em Genética e Bioquímica, área de  
concentração Genética.

**DIRBI/UFU**



1000182653

Uberlândia - MG  
Junho - 1997



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Campus Umuarama Bloco 2E Sala 37  
38.400-902, UBERLÂNDIA - MG

## ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

1 - TÍTULO DA TESE: Análise bioquímica e molecular da diversidade genética entre cultivares mesoamericanos e andinos de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.)

2 - ALUNO: Christiane Luiza Belele

3 - PROFESSOR ORIENTADOR: Luiz Ricardo Goulart Filho

4 - DATA: 13/ 06/ 97

5 - BANCA EXAMINADORA:

Titular Luiz Ricardo Goulart Filho

Titular Foued Salmen Espindola

Titular Siu Mui Tsai

Suplente Julio Cesar Viglione Penna

Suplente João Bosco dos Santos

6 - APRESENTAÇÃO: Início - 15:00 Término - 15:50

7 - TEMPO DE ARGUIÇÃO: Início - 15:50 Término - 17:20

8 - CONCEITO ATRIBUÍDO POR EXAMINADOR:

1º Membro da Banca A

2º Membro da Banca A

3º Membro da Banca A

Conceito Final: A

9 - OBSERVAÇÕES: \_\_\_\_\_

10 - ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA:

Luiz Ricardo Goulart Filho

Foued Salmen Espindola  
Siu Mui Tsai

11 - RESERVADO AO COLEGIADO

Universidade Federal de Uberlândia  
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**Análise Bioquímica e Molecular da  
Diversidade Genética entre Cultivares  
Mesoamericanos e Andinos de Feijoeiro Comum  
(*Phaseolus vulgaris* L.).**

Christiane Luiza Bebele  
Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Bioquímica, área de concentração Genética.

Uberlândia - MG  
Junho - 1997

*Aos meus pais,*

*Que durante toda as suas vidas jamais deixaram de compartilhar dos meus ideais, incentivando-me e ajudando-me a transpor os obstáculos com suas orações, seus conselhos e experiência de vida. Responsáveis pela minha formação, o fizeram com muito amor. Agradeço a Deus pelos pais que tenho e pelos quais tenho a mais profunda admiração e respeito.*

*Com muito amor, dedico este trabalho*

*Ao meu orientador*

*Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho,*

*Que apesar de seus inúmeros afazeres,  
sempre estava pronto para me atender e  
orientar. Apesar de profundo  
conhecedor do assunto, sempre me deu  
total liberdade para trabalhar,  
corrigindo-me nos momentos certos. Sua  
compreensão durante a realização deste  
trabalho e a conversa amiga nos  
momentos difíceis fizeram aumentar  
minha admiração.*

*Ao meu namorado*

*Gustavo Gehrke Hardt*

*Uma pessoa criativa, inteligente,  
dinâmica e acima de tudo um grande  
companheiro. Estando ao meu lado  
em todos os momentos, sempre me  
ajudou com muita disposição,  
paciência e amor.*

*Meus agradecimentos especiais*

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Siu Mui Tsai, pela atenção e gentileza com que sempre me recebeu, por seu interesse, sua disposição em me ajudar e pelas sugestões apresentadas na avaliação deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola, por ter aceitado prontamente o convite para participar da banca examinadora e por suas sugestões e críticas, que com certeza contribuíram para enriquecer este trabalho;

Aos colegas: Terezinha, Gismar, César, Warlei, Adailton, Robson, Marcelo, Cristina, Juliana, Wânia, Cleber e Juarez, companheiros de laboratório com os quais compartilhei muitos momentos alegres que deixarão saudade;

A todos os colegas do curso de pós-graduação, pela amizade e companherismo;

Aos Docentes do Departamento de Genética e Bioquímica, com os quais direta e indiretamente, tive a oportunidade de conviver durante estes anos de estudo;

À Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade oferecida;

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

## ÍNDICE

ABREVIACÕES.....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xiii
RESUMO .....	xiv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISO DE LITERATURA.....	3
2.1. Marcadores Bioquímicos.....	4
2.2. Marcadores Moleculares .....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Material Biológico .....	20
3.2. Análise Bioquímica .....	21
3.2.1. Extração de Proteínas .....	21
3.2.1.1. Faseolina .....	21
3.2.1.2. Albumina.....	21
3.2.1.3. Proteínas Solúveis em NaCl 0,5M.....	22
3.2.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante (SDS-PAGE)....	22
3.2.3. Determinação da Massa Molecular.....	23
3.3. Análise Molecular .....	23
3.3.1. Extração de DNA Genmico de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	23
3.3.2. Dosagem do DNA em Espectrofotmetro .....	24
3.3.3. Amplificação ao Acaso de DNA Polimórfico (RAPD).....	24
3.3.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Não-Desnaturante.....	25
3.3.5. Análise dos Resultados RAPD .....	26

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
4.1. Análise Bioquímica .....	27
4.1.1. Faseolina.....	27
4.1.2. Albumina .....	34
4.1.3. Proteínas Solúveis em NaCl 0,5M.....	38
4.2. Análise Molecular .....	43
5. CONCLUSÕES .....	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57

## ABREVIACOES

ABS	absorbância
CTAB	alquiltrimetilbrometo de amônio
dATP	5'-desoxiadenosina trifosfato
dCTP	5'-desoxicitosina trifosfato
dGTP	5'-desoxiguanosina trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
dTTP	5'-desoxitimidina trifosfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetra acético sal dissódico
g	grama (s)
g	gravidade
h	hora (s)
HCl	ácido clorídrico
IEF-SDS-PAGE	eletroforese bi-dimensional
KCl	cloreto de potássio
kDa	kilodaltons
M	molar
mA	miliampere (s)
mg	miligrama (s)
MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio
min.	minuto (s)
ml	mililitro (s)
mM	milimolar
mtDNA	DNA mitocondrial
NaCl	cloreto de sódio
ng	nanograma (s)
nm	nanometro (s)
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante
SDS	lauril sulfato de sódio
tris	tris (hidroximetil amino metano)
U	unidade (s) de enzima
V	volts
µl	microlitro (s)

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	<p>Eletroforese em SDS-PAGE 8% dos padrões de faseolina encontrados entre os cultivares de feijão Mesoamericanos. A - (1) Sanilac; (2) Seafarer; (3) Brasil 2; (4) Rio Tibagi; (5) Jamapa; (6) Porrillo; (7) Ica Pijão. B - (8) Rojo de Seda; (9) Safira; (10) Mulatinho; (11) Carioca; (12) Rosinha G2; (13) Ipa 6; (14) Zamorano; (15) Michelite; (16) Small White. C - (17) Puebla 152; (18) Compuesto Negro; (19) Pinto; (20) Great Northern; (21) Red Mexican; (22) Flor de Mayo; (23) Garbancillo; (24) Apetito Blanco.....</p>	29
2	<p>Eletroforese em SDS-PAGE 8% dos padrões de faseolina encontrados entre os cultivares de feijão Andinos. A - (1) Pompadour; (2) Canario; (3) Diacol Calima; (4) Mayo Coba; (5) Antioquia 8; (6) Jalo; (7) Manteigão Fosco. B - (8) Cramberry; (9) Barbunya; (10) Overitos 7634; (11) Overitos 7635; (12) Mortino.....</p>	32
3	<p>Eletroforese em SDS-PAGE 8% dos diferentes padrões de faseolina encontrados entre os cultivares de feijão de origem Mesoamericana e Andina. (PM) Padrão de Peso Molecular SDS-6H; (1) Sanilac - tipo "S"; (2) Brasil 2 - tipo "Sb"; (3) Rojo de Seda - tipo "Sr"; (4) Ipa 6 - tipo "Si"; (5) Apetito Blanco - tipo "Sa"; (6) Jalo - tipo "T"; (7) Cramberry - tipo "H"; (8) Barbunya; (9) Mortino - tipo "C" .....</p>	33
4	<p>Eletroforese em SDS-PAGE 16% dos padrões de albumina encontrados entre os cultivares de feijão analisados. (PM) Padrão de Peso Molecular SDS-7H; (1) Brasil 2; (2) Jamapa; (3) Carioca; (4) Puebla 152; (5) Great Northern; (6) Apetito Blanco; (7) Pompadour; (8) Antioquia 8; (9) Jalo; (10) Barbunya; (11) Mortino.....</p>	35
5	<p>Representação esquemática dos sete padrões de albumina identificados entre os cultivares de feijão analisados. Os padrões encontrados foram denominados: (1) Alb 1; (2) Alb 2; (3) Alb 3; (4) Alb 4; (5) Alb 5; (6) Alb 6 e (7) Alb 7 .....</p>	37

- 6 Eletroforese em SDS-PAGE 12% de proteínas solúveis em NaCl 0,5 M dos cultivares de feijão Mesoamericanos. (PM) Padrão de Peso Molecular SDS-7H. A - (1) Sanilac; (2) Seafarer; (3) Brasil 2; (4) Rio Tibagi; (5) Jamapa; (6) Porrillo; (7) Ica Pijão. B - (8) Rojo de Seda; (9) Safira; (10) Mulatinho; (11) Carioca; (12) Rosinha G2; (13) Ipa 6; (14) Zamorano; (15) Michelite; (16) Small White. C - (17) Puebla 152; (18) Compuestro Negro; (19) Pinto; (20) Great Northern; (21) Red Mexican; (22) Flor de Mayo; (23) Garbancillo; (24) Apetito Blanco ..... 39
- 7 Eletroforese em SDS-PAGE 12% de proteínas solúveis em NaCl 0,5 M dos cultivares de feijão Andinos. (PM) Padrão de Peso Molecular SDS-7H. A - (1) Pompadour; (2) Canario; (3) Diacol Calima; (4) Mayo Coba; (5) Antioquia 8; (6) Jalo; (7) Manteigão Fosco. B - (8) Cramberry; (9) Barbunya; (10) Overitos 7634; (11) Overitos 7635; (12) Mortino..... 40
- 8 Representação esquemática dos seis padrões de lectina encontrados entre os cultivares de feijão avaliados. Os padrões de lectina foram denominados: (1) Lec 1; (2) Lec 2; (3) Lec 3; (4) Lec 4; (5) Lec 5 e (6) Lec 6..... 41
- 9 Exemplo do padrão de amplificação selecionado para caracterização da diversidade genética entre os cultivares de feijoeiro analisados. Os produtos de amplificação são derivados do *primer* OPA-10 e foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida à 6%. P - Padrão de DNA. A - (1) Sanilac; (2) Seafarer; (3) Brasil 2; (4) Rio Tibagi; (5) Jamapa; (6) Porrillo; (7) Ica Pijão; (8) Rojo de Seda; (9) Safira; (10) Mulatinho; (11) Carioca; (12) Rosinha G2; (13) Ipa 6; (14) Zamorano; (15) Michelite; (16) Small White; (17) Puebla 152; (18) Compuestro Negro. B - (19) Pinto; (20) Great Northern; (21) Red Mexican; (22) Flor de Mayo; (23) Garbancillo; (24) Apetito Blanco; (25) Pompadour; (26) Canario; (27) Diacol Calima; (28) Mayo Coba; (29) Antioquia 8; (30) Jalo; (31) Manteigão Fosco; (32) Cramberry; (33) Barbunya; (34) Overitos 7634; (35) Overitos 7635; (36) Mortino. 44
- 10 Eletroforese em gel de poliacrilamida à 6% dos produtos de amplificação obtidos do *primer* OPG-18. P - Padrão de DNA. A - (1) Sanilac; (2) Seafarer; (3) Brasil 2; (4) Rio Tibagi; (5) Jamapa; (6) Porrillo; (7) Ica Pijão; (8) Rojo de Seda; (9) Safira; (10) Mulatinho; (11) Carioca; (12) Rosinha G2; (13) Ipa 6; (14) Zamorano; (15) Michelite; (16) Small White; (17) Puebla 152; (18) Compuestro Negro. B - (19) Pinto; (20) Great Northern; (21) Red Mexican; (22) Flor de Mayo; (23) Garbancillo; (24) Apetito Blanco; (25) Pompadour; (26) Canario; (27) Diacol Calima; (28) Mayo Coba; (29)

- Antioquia 8; (30) Jalo; (31) Manteigão Fosco; (32) Cramberry; (33) Barbunya; (34) Overitos 7634; (35) Overitos 7635; (36) Mortino..... 46
- 11 Eletroforese em gel de poliacrilamida à 6% dos produtos de amplificação obtidos do *primer* OPD-19. P - Padrão de DNA. A - (1) Sanilac; (2) Seafarer; (3) Brasil 2; (4) Rio Tibagi; (5) Jamapa; (6) Porrillo; (7) Ica Pijão; (8) Rojo de Seda; (9) Safira; (10) Mulatinho; (11) Carioca; (12) Rosinha G2; (13) Ipa 6; (14) Zamorano; (15) Michelite; (16) Small White; (17) Puebla 152; (18) Compuestro Negro. B - (19) Pinto; (20) Great Northern; (21) Red Mexican; (22) Flor de Mayo; (23) Garbancillo; (24) Apetito Blanco; (25) Pompadour; (26) Canario; (27) Diacol Calima; (28) Mayo Coba; (29) Antioquia 8; (30) Jalo; (31) Manteigão Fosco; (32) Cramberry; (33) Barbunya; (34) Overitos 7634; (35) Overitos 7635; (36) Mortino..... 47
- 12 Dendrograma representativo da divergência genética calculada a partir de RAPD entre os 36 cultivares de feijoeiro comum. Agrupamento feito pelo método de UPGMA, a partir da porcentagem de desacordo..... 49
- 13 Dendrograma representativo da divergência genética calculada a partir de RAPD e padrões de faseolina, Spa, Spb e lectina encontrados entre os 36 cultivares de feijoeiro comum. Agrupamento feito pelo método de UPGMA, a partir da porcentagem de desacordo ..... 52

## LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Identificação dos 36 cultivares de feijão comum avaliados neste estudo.....	20
2	Sequência de nucleotídeos dos <i>primers</i> testados.....	25
3	Relação do número total de bandas amplificadas e polimórficas por <i>primer</i> testado .....	45
4	Agrupamento dos cultivares dentro dos <i>pools</i> gênicos Mesoamericano e Andino de acordo com a análise de RAPD, considerando uma distância genética limite de 20%.....	50
4	Agrupamento dos cultivares dentro dos <i>pools</i> gênicos Mesoamericano e Andino de acordo com as análises bioquímicas e de RAPD, considerando uma distância genética limite de 18%.....	56

## RESUMO

BELELE, Christiane Luiza. **Análise Bioquímica e Molecular da Diversidade Genética entre Cultivares Mesoamericanos e Andinos de Feijoeiro Comum (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Uberlândia, UFU, 1997. 68 p. Dissertação de Mestrado em Genética e Bioquímica.

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é caracterizado por uma extensa variabilidade genética. Evidências bioquímicas, fisiológicas e morfológicas sugerem que esta variabilidade não está distribuída ao acaso entre os genótipos, mas está associada a dois centros distintos de diversidade, conhecidos por *pools* gênicos Mesoamericano e Andino (Gepts *et al.*, 1986). Os cultivares pertencentes a cada um destes *pools* gênicos têm sido subdivididos em 12 *pools* gênicos (Singh *et al.*, 1989 citado por Singh, 1991) ou 6 raças (Singh *et al.*, 1991c) por meio de análises morfológicas, agronômicas e bioquímicas. Entretanto, alguns dos caracteres morfológicos considerados nas divisões dos cultivares Mesoamericanos e Andinos são de natureza quantitativa e por isso, estão sujeitos a um complexo controle genético e a uma grande influência do ambiente, tornando-os inadequados para uma avaliação correta da diversidade genética. Em vista destes aspectos, este estudo teve por objetivo reavaliar a distribuição da diversidade genética em feijoeiro a nível molecular e bioquímico, por meio das técnicas de RAPD e eletroforese em SDS-PAGE de faseolina, albumina e frações protéicas solúveis em NaCl 0,5 M. A análise dos padrões eletroforéticos destas frações protéicas mostrou a existência de variabilidade destes padrões entre os cultivares avaliados. Esta variabilidade não ocorreu de forma aleatória entre os cultivares e permitiu que os mesmos fossem separados em dois grupos distintos, conforme o seu centro de origem. De um modo geral, o nível de polimorfismo detectado por análise bioquímica foi maior entre os *pools* gênicos do que dentro deles. A técnica de RAPD, por outro lado, mostrou maior capacidade de identificação de polimorfismo entre indivíduos próximos. A análise de *cluster* dos padrões RAPD gerados por 13 *primers*, permitiu a diferenciação de dois

grupos de cultivares, separados por uma distância genética de 23 a 30%. Um dos *primers* testados, OPG-18, gerou um padrão de amplificação com duas bandas denominadas OPG18-1.3 e OPG18-1.0, capazes de discriminar os cultivares Mesoamericanos e Andinos, com uma porcentagem de acerto em torno de 96 e 100%, respectivamente. Os resultados da análise molecular e bioquímica indicaram uma possível origem Mesoamericana do cultivar Barbunya. Considerando-se uma distância genética limite de 20% foi possível identificar subgrupos de cultivares dentro de cada *pool* gênico: 6 Mesoamericanos e 2 Andinos. Estas subdivisões dentro dos grupos Mesoamericano e Andino não corresponderam àquelas feitas anteriormente para estes mesmos cultivares (Singh *et al.*, 1989 citado por Singh, 1991 e Singh *et al.*, 1991c) com base em caracteres morfológicos e bioquímicos. Foram observadas diferenças tanto com relação ao número de subgrupos identificados dentro dos *pools* gênicos quanto à organização dos cultivares nestes subgrupos. Quando os dados da avaliação bioquímica foram incluídos aos dados de RAPD, a análise de *cluster* mostrou um aumento na distância genética calculada entre os *pool* gênicos (32%) e uma diminuição da distância genética limite para identificação dos mesmo número de subgrupos dentro destes *pools* gênicos (18%). Isto no entanto não alterou o arranjo destes cultivares nos respectivos subgrupos identificados por RAPD. Os dados obtidos neste estudo demonstram a necessidade de avaliação da diversidade genética entre os cultivares de feijoeiro de diferentes origens por meio de técnicas mais acuradas, que permitam uma análise da diversidade genética entre genótipos a nível de sequência de DNA. Com base nos resultados obtidos neste estudo, propõe-se uma nova divisão dos genótipos de feijoeiro dentro dos *pools* gênicos Mesoamericano e Andino.

## 1. INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das leguminosas mais consumidas pelas populações da América Central, América do Sul e África. Nestas regiões o feijão representa um alimento de importância econômica e social, pois se constitui na fonte mais acessível de proteína.

Por se tratar de uma espécie com grande capacidade de adaptação, o feijoeiro é cultivado em praticamente todos os continentes, sob as mais variadas formas de cultivo e condições ambientais.

A grande capacidade adaptativa desta planta deve-se ao alto nível de variabilidade genética existente entre os germoplasmas de feijão. Esta variabilidade está relacionada com grupos distintos de germoplasma que se originaram e evoluíram, tornando-se adaptados a regiões geográficas específicas.

Os primeiros estudos baseados em caracteres morfológicos, agronômicos, achados arqueológicos e dados históricos, indicaram que os cultivares de feijão comum resultam de domesticações múltiplas nas Américas. A análise destes dados sugeriu a existência de dois centros primários de domesticação: um na América Central e outro no centro e sul dos Andes, denominados Mesoamericano e Andino, respectivamente.

Resultados obtidos dos estudos de evolução em feijoeiro pelo uso de marcadores bioquímicos, como isoenzimas (Koenig & Gepts, 1989; Singh *et al.*, 1991a, 1991b) e faseolina (Gepts *et al.*, 1986; Gepts & Bliss, 1986; Gepts, 1988; Koenig *et al.*, 1990) e marcadores moleculares, RFLP (Khairallah *et al.*, 1992; Llaca *et al.*, 1994; Becerra Velásquez & Gepts, 1994), RAPD (Haley *et al.*, 1994; Vasconcelos *et al.*, 1996) e AFLP (Tohme *et al.*, 1996), confirmam a existência de mais de um centro de origem para o feijoeiro comum. Todas estas técnicas apontam a América Central e sul dos Andes como principais centros de origem do feijoeiro, porém algumas delas têm indicado também outras regiões como possíveis centros de domesticação do feijoeiro comum.

Os germoplasmas de origem Mesoamericana e Andina apresentam uma grande diversidade quanto a caracteres morfológicos, agronômicos e bioquímicos. A existência desta variabilidade levou alguns autores a agrupar os germoplasmas dentro de cada um destes centros em *pools* gênicos ou raças (Singh, 1989; Singh *et al.*, 1989 citado por Singh 1991; Singh *et al.*, 1991c).

Por meio das diferenças observadas com relação a aspectos morfológicos, agronômicos e bioquímicos, os cultivares de cada uma destas regiões foram agrupados em 12 *pools* gênicos, 6 Mesoamericanos (1, 2, 3, 4, 5 e 6) e 6 Andinos (7, 8, 9, 10, 11 e 12) (Singh *et al.*, 1989 citado por Singh, 1991) ou ainda em 6 raças, 3 Mesoamericanas (Mesoamerica, Durango e Jalisco) e 3 Andinas (Nova Granada, Chile e Peru) (Singh *et al.*, 1991c).

Entretanto, alguns dos caracteres morfológicos considerados nestas subdivisões são de natureza quantitativa. Como a expressão de caracteres quantitativos é controlada por mais de um gene, estes caracteres normalmente estão sujeitos a um complexo controle genético e a uma grande influência do ambiente, tornando-os inadequados para a avaliação da diversidade genética.

Por outro lado, os marcadores bioquímicos e moleculares não apresentam tais problemas, já que representam o resultado direto da expressão de um gene ou ainda frações do próprio genoma. Tais marcadores não estão sujeitos a influência do ambiente, o que os tornam excelentes ferramentas para análises de diversidade genética.

Em vista destes aspectos, este estudo foi desenvolvido com o objetivo de reavaliar, em nível bioquímico e molecular, a distribuição da diversidade genética em feijoeiro comum dentro dos *pools* gênicos Mesoamericano e Andino e comparar os resultados aqui obtidos com aqueles de estudos anteriores feitos por análises morfológicas, bioquímicas e moleculares.

A técnica de RAPD foi escolhida para a análise molecular por sua rapidez, facilidade e confiabilidade de seus dados. A nível bioquímico, a diversidade genética foi avaliada por meio da análise eletroforética em SDS-PAGE da principal proteína de reserva, a faseolina, bem como da albumina e frações protéicas solúveis em NaCl 0,5 M.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Apesar de se tratar de uma das mais antigas plantas cultivadas pelo homem, a origem do feijoeiro comum era desconhecida até o final do século passado, quando a descoberta de sementes, vagens e até plantas inteiras (Wittmack, 1880; Kaplan, 1967; Kaplan & Macneish, 1960 citados por Gepts & Debouck, 1991) em achados arqueológicos feitos nos Andes, América Central e América do Norte, provaram que o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) havia se originado nas Américas.

Populações silvestres, identificadas como os ancestrais do feijoeiro comum, foram encontradas pela primeira vez na América do Sul (Andes) por Burkhart (1941, 1943 e 1952), MacBride (1947), Burkhart & Brücher (1953) citados por Berglund-Brücher & Brücher (1976) e posteriormente na América Central (México) por Miranda Colin (1967) e Gentry (1969). De acordo com estes autores, estas populações eram morfológicamente distintas e quando cruzadas com feijões cultivados de mesma origem geográfica, produziam indivíduos férteis que apresentavam bom desenvolvimento.

Estas populações silvestres foram encontradas dispersas dentro de uma ampla área geográfica, tanto na região dos Andes (Berglund-Brücher & Brücher, 1976) como também no México e Guatemala (Kaplan, 1981).

A existência destas duas populações silvestres morfológicamente distintas, separadas geograficamente e compatíveis geneticamente com feijões cultivados, levou ao questionamento de onde ocorreu a domesticação do feijoeiro (Kaplan, 1981).

O padrão de distribuição geográfica da diversidade genética encontrado em feijoeiro comum não ajustava-se ao modelo proposto por Vavilov (1951) citado por Harlan (1971), para identificação de centros de domesticação, o qual se baseava na identificação de regiões limitadas de alta diversidade genética da cultura sob consideração. Por outro lado, Harlan (1971) propôs um modelo de domesticação não-

cêntrico para o feijoeiro comum, onde os ancestrais silvestres encontram-se distribuídos em uma ampla faixa geográfica.

Baseados em estudos comparativos da morfologia das formas silvestres e cultivadas e de achados arqueológicos, Gentry (1969), Harlan (1971), Evans (1976) e Kaplan (1981) entre outros, sugeriram a possibilidade de domesticações independentes do feijoeiro comum nas Américas Central e do Sul.

Gentry (1969) sugeriu a ocorrência de múltiplas origens nas Américas, baseado na distribuição geográfica dos tipos de sementes encontrados entre formas silvestres e cultivadas de feijoeiro.

Evans (1976), considerando as diferenças observadas no tamanho das sementes, sugeriu a existência de dois centros de domesticação para o feijoeiro, sendo que os cultivares com sementes pequenas teriam se originado na América Central e os cultivares com sementes grandes nos Andes.

Segundo Kaplan (1981), as diferenças observadas entre feijões silvestres e cultivados quanto ao tamanho e cor de sementes mostram que estes não foram transportados ou trocados entre a América Central e América do Sul e sugerem a existência de um centro difuso, com domesticações independentes ocorrendo nestas duas áreas.

## 2.1. Marcadores Bioquímicos

Nos últimos 25 anos, os métodos tradicionais utilizados para identificar cultivares de plantas e para avaliar a variabilidade genética entre genótipos têm sido enriquecidos pela utilização de caracteres fisiológicos e bioquímicos. Um dos métodos bioquímicos mais usados para este propósito tem sido a análise eletroforética de proteínas (isoenzimas ou proteínas de reserva) (Echeverrigaray *et al.*, 1993).

A comparação e análise dos padrões de proteínas de reserva, proteínas totais e isoenzimas têm sido utilizados para inferir a relação entre as espécies (Derbyshire *et al.*, 1976) e entre genótipos dentro de uma espécie (Ladizinsky, 1979; Gepts *et al.*, 1986; Gepts & Bliss, 1986), já que estas representam o produto de um gene e são fisiologicamente estáveis e fáceis de serem manuseadas (Ladizinsky & Hymowitz, 1979).

Segundo Derbyshire *et al.* (1981), Hussein *et al.* (1986) e Echeverrigaray *et al.* (1993) a análise eletroforética unidimensional de proteínas de sementes tem grande valor para a caracterização e identificação de cultivares de *P. vulgaris*, podendo ser empregada para a identificação de genótipos dentro de um complexo geneticamente aparentado.

Um marcador bioquímico bastante utilizado nos estudos genéticos em feijoeiro comum é a faseolina. A faseolina é a principal proteína de reserva da semente de feijoeiro comum (*P. vulgaris* L.) e representa entre 36-46% do total de proteína da semente (Ma & Bliss, 1978).

Como principal fração protéica do feijão, a faseolina tem sido objeto de estudos para sua caracterização a nível de perfil eletroforético (McLeester *et al.*, 1973; Romero *et al.* 1975, Padhye & Salunkhe, 1977; Brown *et al.*, 1981, 1982; Hussein *et al.*, 1986; Lioi, 1989), localização subcelular (Bollini & Chrispeels, 1978); mRNA e sequências genômicas (Sun *et al.*, 1981; Hall *et al.*, 1983; Talbot *et al.*, 1984; Slightom *et al.*, 1985).

Os estudos de caracterização do perfil eletroforético da faseolina por SDS-PAGE e IEF-SDS-PAGE em *P. vulgaris*, revelaram a existência de uma grande variabilidade desta proteína com relação ao número e peso das subunidades (Romero *et al.*, 1975, Brown *et al.*, 1982; Gepts *et al.*, 1986).

Entre os feijões cultivados, os primeiros padrões de faseolina identificados por meio de SDS-PAGE e IEF-SDS-PAGE foram denominados "S", "T" e "C", em função do nome dos cultivares Sanilac, Tendergreen e Contender, respectivamente, onde estes padrões foram caracterizados pela primeira vez (Brown *et al.*, 1981). Desde então, os diferentes padrões de faseolina encontrados em feijões cultivados e silvestres têm sido comumente identificados por uma ou duas letras, que representam as iniciais do nome do cultivar ou da região geográfica, respectivamente, onde estes padrões foram encontrados originalmente.

A faseolina do tipo "T" consiste de 5 polipeptídeos, enquanto que os tipos "S" e "C" apresentam 8 polipeptídeos cada. Os padrões "S" e "T" não possuem nenhum polipeptídeo em comum, enquanto que o tipo "C" apresenta um padrão intermediário, com todos os polipeptídeos da faseolina "T", dois polipeptídeos da faseolina "S" e um polipeptídeo único (Brown *et al.*, 1981). De acordo com Hall *et al.* (1977) e Brown *et*

*al.* (1981), os polipeptídeos das faseolinas “S”, “T” e “C” apresentam peso molecular variando entre 45 e 52 kDa.

Estudos genéticos envolvendo cruzamentos mostraram que os genes que codificam os diferentes polipeptídeos de cada padrão de faseolina estão intimamente ligados e são herdados como uma única unidade Mendeliana com os alelos sendo codominantes (Romero *et al.*, 1975; Brown *et al.*, 1981; Brown *et al.*, 1982).

Talbot *et al.* (1984) demonstraram que a faseolina é codificada por uma família multigênica consistindo de 7, 8 e 9 genes para os tipos “T”, “S” e “C”, respectivamente. A sequência de nucleotídeos de diversos clones de cDNA demonstraram que esta família multigênica consiste de 2 sub-famílias distintas, denominadas  $\alpha$  e  $\beta$ , que apresentam 98% de homologia. Estas sub-famílias diferem em suas regiões codificadoras pela presença (subfamília  $\alpha$ ) ou ausência (subfamília  $\beta$ ) de duas sequências de 15 e 27 pb (faseolina “T”) ou de uma sequência de 27 pb (faseolina “S”) e também pela presença de substituições de nucleotídeos nos genes da faseolina  $\alpha$  (Hall *et al.*, 1983; Slightom *et al.*, 1985, Kami & Gepts, 1994). De acordo com Slightom *et al.* (1985) estes dados indicam que estas subfamílias podem ter se originado por duplicações sucessivas de um ancestral comum, seguida por um processo de divergência, que incluiu inserções, duplicações, deleções bem como substituições de nucleotídeos.

Segundo Hall *et al.* (1983) e Slightom *et al.* (1985) as diferenças observadas entre o peso molecular destes polipeptídeos parecem ser resultado da glicosilação diferencial dos mesmos.

Em feijoeiro, a faseolina provou ser bastante útil como marcador para o estudo de sua origem, domesticação, evolução e dispersão.

Em um estudo comparativo entre a variabilidade dos padrões de faseolina de feijões silvestres e cultivados provenientes da América Central e Andes, Gepts *et al.* (1986) fizeram observações importantes com relação ao grau de diversidade existente entre os acervos silvestres e cultivados, a distribuição geográfica dos padrões de faseolina e a associação entre tamanho das sementes e padrões específicos de faseolina.

Nos genótipos cultivados da América Central, Gepts *et al.* (1986) encontraram faseolina “S” e entre os feijões cultivados dos Andes, encontraram faseolinas “T” e “C”. Além destes três padrões de faseolina já descritos anteriormente em cultivares por

Brown *et al.* (1981), Gepts *et al.* (1986) identificaram dois novos tipos de faseolina entre os feijões cultivados, denominados tipo "H" (Huevo de Huanchaco) e "A" (Ayacucho). Entre os feijões silvestres da América Central, além do tipo "S", estes autores identificaram uma variedade de padrões bastante similares que agruparam como tipo "M" (Middle America) enquanto que entre os feijões silvestres provenientes dos Andes foi encontrada apenas faseolina do tipo "T".

Gepts *et al.* (1986) demonstraram haver uma correspondência na distribuição geográfica dos tipos de faseolina entre feijões silvestres e cultivados. Eles observaram que o tipo "S", encontrado apenas em formas silvestres da América Central, era o padrão predominante entre os feijões cultivados desta região, enquanto que no sul dos Andes, o tipo "T" encontrado entre as formas silvestres, era o mais abundante entre os cultivares daquela região.

Estes autores onseguiram estabelecer uma associação entre tipos de faseolina e o tamanho da semente dos feijões cultivados. Cultivares com faseolina "T", "C", "A" e "H", apresentavam sementes médias ou grandes enquanto que os cultivares com faseolina "S" apresentavam sementes pequenas.

Baseados nestes resultados, Gepts *et al.* (1986) sugeriram a existência de dois centros de domesticação para o feijoeiro: um na América Central (Mesoamericano), que originou cultivares com sementes pequenas e faseolina "S" e outro no sul dos Andes (Andino), que originou cultivares com sementes grandes e faseolina "T", "C", "H" e "A". Segundo estes autores, cada um destes centros representaria um *pool* gênico, definido por eles como sendo um grupo de genótipos caracterizados por frequências alélicas específicas, associações similares de alelos, adaptação diferencial às condições ambientais e uma distribuição geográfica definida.

Gepts & Bliss (1986) estenderam a análise da variação dos padrões de faseolina para os feijões silvestres e cultivados da Colômbia. Entre os feijões silvestres, eles encontraram dois padrões ainda não descritos, que foram denominados "CH" (Chibcha) e "B" (Boyacá). Entre os genótipos cultivados foram encontrados os padrões "S", "T" e "C", descritos anteriormente, e também o padrão "B" identificado nos feijões silvestres. Eles observaram que os cultivares com faseolina "B" também apresentavam sementes pequenas.

A presença de faseolina "B" apenas entre os genótipos silvestres e cultivados da Colômbia, sugeriu a estes autores que este país pudesse ser um centro adicional de domesticação do feijoeiro. Devido a baixa frequência de faseolina "B" entre os genótipos cultivados, a Colômbia provavelmente representaria um centro de domesticação menor ou mais recente, comparado ao Mesoamericano e Andino (Gepts & Bliss, 1986).

De acordo com Gepts & Bliss (1986) a Colômbia pareceu ser também um local de encontro para os feijões de origem Mesoamericana e Andina, devido à presença de faseolina "C", a alta frequência dos tipos "S" e "T" e pela presença de um gradiente geográfico de distribuição dos padrões "S" e "T" de faseolina neste país. Estes autores notaram que na região próxima ao centro Mesoamericano, a grande maioria dos cultivares apresentavam faseolina "S" e apenas uma pequena porcentagem delas apresentava faseolina "T". Já na região próxima ao centro Andino, a frequência do tipo "T" aumentava consideravelmente e o tipo "C", que era ausente na região próxima ao centro Mesoamericano, ocorria a uma frequência de 10%.

Koenig *et al.* (1990) avaliaram por SDS-PAGE e IEF-SDS-PAGE a diversidade de padrões de faseolina em feijões silvestres e cultivados das Américas do Sul e Central. Eles encontraram entre os feijões silvestres da região Andina, os padrões "H" e "C", descritos por Gepts *et al.* (1986) apenas em formas cultivadas. Koenig e colaboradores também identificaram dois novos padrões de faseolina entre os feijões silvestres, que eles denominaram de tipo "I" (Inca) e "J" (Jujuy). Entre os feijões cultivados que apresentavam semente pequena, estes autores identificaram duas variantes do tipo "S": "Sb" (S Brasil) encontrado em cultivares do Brasil e "Sd" (S Durango 222) encontrado em cultivares das regiões altas do México. A faseolina do tipo "B", encontrada anteriormente apenas em feijões silvestres e cultivados da Colômbia (Gepts & Bliss, 1986), também foi identificada entre cultivares da América Central.

Debouck *et al.* (1993) investigando de forma mais detalhada as populações silvestres e cultivadas da Colômbia, Equador e Peru, conseguiram demonstrar que, como na Colômbia, os feijões silvestres encontrados no Equador e norte do Peru também apresentavam padrões intermediários de faseolina e isoenzimas. Eles sugeriram duas explicações para a natureza intermediária destes feijões: estes poderiam ser híbridos entre os *pools* gênicos Mesoamericano e Andino ou representariam um ancestral de *P.*

*vulgaris* do qual os dois principais ramos, Mesoamericano e Andino, gradualmente divergiram e se dispersaram.

O tamanho aumentado das sementes de cultivares de origem Andina e a sua associação com o tipo de faseolina tem sido atribuído a fatores de natureza genética, ecológica, culturais ou a combinação dos mesmos (Kaplan, 1981; Silvertown, 1982; Gepts & Debouck, 1991).

Segundo Silvertown (1982) plantas que crescem em ambientes abertos tendem a ter sementes menores do que plantas que crescem em ambientes fechados. Diferenças entre os *habitats* de crescimento de feijões silvestres nas regiões Mesoamericana e Andina têm sido documentadas. Gentry (1969) observou que os feijões silvestres no México cresciam em meio a vegetações arbustivas, enquanto que nos Andes, Burkart & Brücher (1953), citado por Berglund-Brücher & Brücher (1976) encontraram feijões silvestres crescendo em meio a vegetação de floresta. Além disto, os solos Andinos são de origem vulcânica e portanto apresentam uma alta fertilidade (Gepts & Debouck, 1991).

O sistema de cultivo de plantas adotado na América do Sul também poderia ter sido um fator de favorecimento de sementes maiores: enquanto que na América Central predomina o plantio de sementes em grupo, nos Andes, as sementes são plantadas individualmente. Estes sistemas de plantio individualizados poderiam ter favorecido a seleção de genótipos com sementes maiores, já que estas poderiam ser manipuladas mais facilmente (Gepts & Debouck, 1991).

Freytag (1955), citado por Kaplan (1981), sugeriu que o tamanho aumentado das sementes do feijão comum domesticado poderia ter se originado de cruzamentos interepecíficos entre *P. vulgaris* e *P. coccineus*. Dados em favor desta hipótese foram fornecidos por análise de isoenzimas de espécies de *Phaseolus*. Bassiri & Adams (1978) observaram que o padrão de bandas de *P. vulgaris* parecia ser composto dos padrões de *P. vulgaris* silvestre e *P. coccineus* silvestre. Eles atribuíram este fato a uma possível introgressão de *P. coccineus* em *P. vulgaris*, mas não excluíram a existência de um ancestral comum como causa desta similaridade.

Segundo Kaplan (1981), esta teoria não explica qual a origem do tamanho aumentado das sementes de feijões domesticados nos Andes, já que *P. coccineus* não é encontrado na América do Sul e não está presente em achados arqueológicos nesta

região. Além disto, a ocorrência de cruzamento entre *P. vulgaris* com outras espécies de *Phaseolus* encontradas na região Andina, parece ser improvável, já que estas espécies não se cruzam com *P. vulgaris* em condições naturais.

Kaplan (1981) sugeriu que cruzamentos naturais entre indivíduos da mesma população ou de populações diferentes de feijões silvestres, seguidos de seleção de recombinantes poderiam também ter levado a um aumento no tamanho da semente. Segundo Wells *et al.* (1988), embora o feijoeiro apresente níveis muito baixos de cruzamento natural, tanto o feijão cultivado quanto silvestre podem apresentar altos níveis de cruzamento dependendo do ambiente e de genótipos específicos.

Outra hipótese apontada por Singh (1989) é que sementes maiores poderiam fornecer mais reserva para ser usada durante a germinação. Desde que a germinação e a emergência das plântulas é mais lenta em baixas temperaturas, uma reserva maior de proteínas poderia ser necessária, de forma que sementes maiores teriam uma vantagem seletiva em regiões mais altas e de clima frio. Isto poderia explicar a predominância de cultivares com sementes grandes também nas partes mais altas e frias da América Central e do Sul.

Alternativamente, alguns autores (Hartana, 1983; Gepts, 1990; Nodari *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1996) sugeriram a ligação do locus da faseolina a um ou mais loci determinantes de fenótipos cultivados, o que levaria a uma seleção direta do locus da faseolina durante o processo de domesticação.

Hartana (1983) demonstrou que o aumento no peso da semente estava associado à presença da faseolina "T" e "C". Segundo este autor, cultivares com estes tipos de faseolina apresentavam uma maior quantidade de proteína, o que levaria a um tamanho aumentado da semente. Esta associação, observada em vários genótipos, poderia justificar, pelo menos em parte o tamanho observado em feijões Andinos.

Vallejos & Chase (1991) tentaram associar o peso de sementes com marcadores isoenzimáticos e o tipo de faseolina, utilizando uma população segregante obtida pelo cruzamento da linhagem XR-235 e um cultivar Andino, Diacol Calima. Nesta população, eles determinaram que o locus Phs (faseolina) não tinha uma associação significativa com o peso de sementes.

Johnson *et al.* (1996) estudaram a existência de correlação entre o peso de semente e o tipo de faseolina em várias populações segregantes de *Phaseolus vulgaris*.

Neste estudo todas as populações mostraram uma significativa associação entre peso de semente e tipo de faseolina, mesmo sob as mais variadas condições ambientais. Estes autores atribuíram os resultados obtidos por Vallejos & Chase (1991) de não associação entre peso de semente e tipo de faseolina ao uso da linhagem XR-235 como parental para geração de uma população segregante, pois esta linhagem é resultante de um cruzamento interespecífico entre *P. vulgaris* e *P. coccineus*. Como resultado, a população utilizada por eles poderia estar segregando para um número de proteínas de sementes não expressadas normalmente em *P. vulgaris* ou para as quais a espécie é monomórfica.

A ocorrência de domesticações múltiplas a partir de ancestrais divergentes, a natureza autógama e o isolamento geográfico e ecológico devem ter levado à divergência genética entre os grupos Mesoamericano e Andino. Vários trabalhos demonstraram a ocorrência de incompatibilidade de cruzamentos entre genótipos cultivados e também entre genótipos silvestres pertencentes a diferentes centros. Como consequência desta incompatibilidade, vários graus e tipos de problemas híbridos são observados na geração F<sub>1</sub> nas gerações subsequentes (Shii *et al.*, 1980; Singh & Gutiérrez, 1984; Gepts & Bliss, 1985).

O primeiro caso de progênies F<sub>1</sub> anormais oriundas de cruzamentos entre cultivares de feijão foi relatado por Davis & Favre (1964) citado por Singh & Gutiérrez (1984). Posteriormente, Shii *et al.* (1980) descobriram que este desenvolvimento anormal dos híbridos F<sub>1</sub> era devido a presença de dois genes dominantes e complementares que eles designaram DL<sub>1</sub> e DL<sub>2</sub>.

Todos os casos de ocorrência de incompatibilidade envolveram cruzamentos entre cultivares com sementes pequenas e faseolina "S" e cultivares com sementes grandes ou médias e faseolina "T" e "C". Como os dois tipos de cultivares têm origens diferentes, um Mesoamericano e outro Andino, a ocorrência de incompatibilidade de cruzamento pode ser uma consequência do isolamento geográfico entre estes cultivares (Singh & Gutiérrez, 1984; Gepts & Bliss, 1985).

A grande variabilidade existente entre os germoplasmas de feijoeiro Mesoamericanos e Andinos, levou alguns autores a dividirem estes dois *pools* gênicos em subgrupos menores. Embora consistente do ponto de vista evolucionário, esta classificação tinha o inconveniente de agrupar germoplasmas com uma grande

diversidade de tipo de semente, hábito de crescimento, maturidade e outros caracteres morfológicos e agronômicos, dificultando os trabalhos de melhoramento e manejo das fontes de germoplasma (Singh, 1989).

Considerando tais aspectos, Singh (1989), baseado em dados morfológicos e agronômicos, como hábito de crescimento, características de sementes, vagens e folha, e adaptação à regiões ecológicas, sugeriu a separação do feijão cultivado em 10 *pools* gênicos: seis Mesoamericanos (1, 2, 3, 4, 5 e 6) e quatro Andinos (7, 8, 9 e 10).

Em uma nova avaliação destes germoplasmas feita por Singh *et al.* (1989) citado por Singh (1991), estes autores reuniram aos dados morfológicos e agronômicos, dados referentes ao tipo de faseolina e reagruparam os germoplasmas de feijoeiro em 6 *pools* gênicos Mesoamericanos (1, 2, 3, 4, 5 e 6) e 6 *pools* gênicos Andinos (7, 8, 9, 10, 11 e 12).

Posteriormente, Singh *et al.* (1991c) acrescentaram a análise de isoenzimas aos dados morfológicos, agronômicos e de faseolina, e reorganizaram os germoplasmas de feijoeiro em raças. Cada raça consistiu de um ou mais *pools* gênicos definidos anteriormente por Singh *et al.* (1989). Os genótipos de origem Mesoamericana e Andina foram divididos em 3 raças cada: Mesoamerica, Durango e Jalisco na América Central e Nova Granada, Chile e Peru nos Andes. Entre os Mesoamericanos, a raça Mesoamerica incluiu os *pools* gênicos 1, 2, 3 e 4, enquanto que as raças Durango e Jalisco incluíram os *pools* gênicos 5 e 6, respectivamente. Entre as raças Andinas, Nova Granada correspondeu aos *pools* gênicos 7, 8 e 9, Chile, ao *pool* gênico 10 e Peru, *pools* gênicos 11 e 12.

## 2.2. Marcadores Moleculares

Até o início da década de 90, grande parte dos avanços conseguidos nos estudos genéticos eram devidos à avaliação indireta do genótipo por meio da análise do fenótipo (Tingey *et al.*, 1992). Desde que a eficiência da análise genética baseada em fenótipo é uma função da herdabilidade de uma característica, fatores como ambiente, herança quantitativa e dominância parcial ou incompleta, frequentemente confundem a expressão de uma característica genética (Tanksley *et al.*, 1989).

Muitos dos problemas gerados pelos métodos de avaliação fenotípica podem ser evitados pela avaliação direta do genótipo, através de métodos de análise baseados em DNA (Tingey *et al.*, 1992). A análise de polimorfismos de DNA tem se mostrado particularmente útil para caracterização genética de fontes biológicas, pois estes polimorfismos são fenotipicamente neutros e não sujeitos aos efeitos do ambiente (Fairbanks *et al.*, 1993).

Várias técnicas para estudos de polimorfismos a nível molecular têm sido desenvolvidas e entre as mais utilizadas estão as técnicas de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphic) e RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

A técnica de RFLP baseia-se na digestão do DNA por endonucleases de restrição, seguido pela hibridização com sondas marcadas. O polimorfismo é detectado pela hibridização destas sondas com fragmentos de restrição: aqueles fragmentos de diferentes genótipos com mesmo tamanho são interpretados como similaridade genética, enquanto que fragmentos de diferentes tamanhos são interpretados como diferenças genéticas.

Os marcadores RFLP são codominantes, de forma que tanto homozigotos quanto heterozigotos podem ser distinguidos. Esta técnica, porém, é trabalhosa e demorada, além de requerer uma quantidade relativamente grande de DNA de alta qualidade (Williams *et al.*, 1990). Em feijoeiro esta técnica foi utilizada para estudo de diversidade a nível de DNA mitocondrial (Khairallah *et al.*, 1992), DNA de cloroplasto (Llaca *et al.*, 1994) e DNA genômico (Becerra Velásquez & Gepts, 1994).

Khairallah *et al.* (1992) examinando a diversidade mitocondrial (mtDNA) intraespecífica em feijoeiro, encontraram 5 RFLPs que distinguiam o genoma mitocondrial dos dois *pools* gênicos, o Mesoamericano e o Andino. Eles utilizaram o mtDNA para comparar o grau de diversidade genética encontrado em feijões cultivados com aquele encontrado em feijões silvestres. Todos os feijões silvestres apresentaram o mesmo padrão de mtDNA para quatro dos cinco RFLPs encontrados entre os *pools* gênicos, indicando que este polimorfismo surgiu após a domesticação: dois nos cultivares do *pool* gênico Mesoamericano e dois nos cultivares do *pool* gênico Andino. O quinto RFLP deve ter ocorrido antes da domesticação já que todos os locus foram polimórficos nos feijões silvestres. A distribuição dos RFLPs de mtDNA entre feijões silvestres sustenta o conceito de dois eventos distintos de domesticação.

Becerra Velásquez & Gepts (1994) estudaram a diversidade genética existente entre feijões silvestres e cultivados representantes dos centros de domesticação por meio de RFLP. Os genótipos cultivados e silvestres puderam ser divididos em dois grupos principais: um na América Central e outro nos Andes, separados por uma distância genética calculada de 80%. As formas silvestres relacionaram-se com as formas cultivadas de seu grupo, dando suporte à hipótese de domesticações múltiplas do feijoeiro. De acordo com estes autores, a grande distância genética calculada entre as formas cultivadas dos dois *pools* gênicos sugerem que a divergência em *P. vulgaris* tenha alcançado o nível de subespécie.

Uma alternativa para estudos genéticos surgiu pelo desenvolvimento da tecnologia de Reação em Cadeia da Polimerase (Polimerase Chain Reaction - PCR). Os métodos derivados desta tecnologia têm se mostrado muito úteis para estudos em várias áreas da genética (Schierwater, 1995).

A técnica de PCR baseia-se na amplificação *in vitro* de um segmento de DNA, por uma DNA polimerase. A reação de amplificação ocorre em ciclos que envolvem três etapas: (1) desnaturação; (2) anelamento e (3) extensão. Na primeira etapa, as fitas do DNA molde são separadas por um aumento da temperatura. Em seguida, a temperatura é diminuída para que pequenas moléculas de DNA de fita simples (*primers*), que são complementares as sequências que flanqueiam a região alvo, hibridizem com as fitas do DNA molde. A DNA polimerase inicia então a síntese de um segmento, que tem início na extremidade 3' de cada *primer*, e que é uma cópia da região alvo. Estas etapas são repetidas por várias vezes, de forma que o número de cópias dobra ao final de cada ciclo, aumentando em progressão geométrica.

Durante alguns anos, entretanto, a aplicação desta técnica foi bastante limitada devido à necessidade de conhecimento prévio das sequências flanqueadoras da região a ser amplificada.

Este problema foi contornado quando Welsh & McClelland (1990), Williams *et al.* (1990) e Caetano-Anollés *et al.* (1991) desenvolveram metodologias similares baseadas na PCR, que caracterizavam-se pela utilização de *primers* com sequência arbitrária, dispensando então o conhecimento de qualquer sequência do genoma de interesse. Estas técnicas, denominadas de Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) (Welsh & McClelland, 1990), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Williams *et al.*,

1990) e DNA-Amplified Fingerprinting (DAF) (Caetano-Anollés *et al.*, 1991) baseavam-se na amplificação de DNA por meio de um único oligonucleotídeo com sequência arbitrária e tamanho de 20 pb, 10 a 12 pb e 5 pb, respectivamente.

Entre estas, a técnica de RADP especificamente, vem sendo usada com sucesso para estudos em diversas áreas da genética, tais como: identificação de cultivares (Hu & Quiros, 1991), geração de fingerprinting (Welsh & McClelland, 1990), mapeamento genético (Williams *et al.*, 1990), geração de marcadores genéticos para características de interesse econômico (Young & Kelly, 1996), identificação de híbridos (Alzate-Marin *et al.*, 1996), monitoramento da variabilidade genética em vários níveis, desde populações até gêneros (Vasconcelos *et al.*, 1996), entre outros.

A técnica de RAPD apresenta várias vantagens em relação aos demais métodos utilizados para análise de variabilidade genética como: simplicidade, facilidade e rapidez em gerar altos números de marcadores, necessidade de pequenas quantidades de DNA para análise, aplicação em estudos de qualquer espécie, facilidade em detectar os polimorfismos por fluorescência, não sofrem influência ambiental e não requerem conhecimento de sequência do genoma estudado (Welsh & McClelland, 1990; Williams *et al.* 1990; Hu & Quiros, 1991; Caetano-Anollés *et al.* 1991; Stiles *et al.* 1993; Schierwater, 1995; Petersen *et al.*, 1996).

Outra importante vantagem desta técnica é que ela permite uma “busca” por todo o genoma, permitindo a análise de regiões codificadoras e não codificadoras e de sequências repetitivas ou de cópia única (Rafalski & Tingey, 1993; Schierwater, 1995).

O mecanismo de amplificação dos *primers* RAPD não é completamente entendido, mas é baseado nos princípios comuns de uma reação normal da PCR. A amplificação difere pela complexidade introduzida por *primers* curtos bem como pela amplificação simultânea de muitos fragmentos (Grattapaglia *et al.* 1992).

Os fragmentos gerados por RAPD geralmente apresentam de 200 até 2000 pb. O polimorfismo é reconhecido como a presença de um fragmento específico amplificado em um genótipo e não amplificado em outro genótipo. Tais polimorfismos comportam-se como marcadores genéticos dominantes, de forma que não é possível a identificação de heterozigotos (Williams *et al.*, 1990).

O polimorfismo nos produtos de amplificação gerado por RAPD pode ser resultado de deleções ou inserções que alteram o sítio de ligação do *primer* impedindo

uma associação estável com o DNA molde ou ainda de inserções que mudam o tamanho de um segmento levando a amplificação de um fragmento maior ou ainda prevenindo a sua amplificação (Williams *et al.*, 1990, Welsh & McClelland, 1990). Williams *et al.* (1990) sugerem que a alteração de uma única base no genoma pode prevenir a amplificação.

A principal desvantagem do uso da técnica de RAPD é que os padrões gerados são bastante sensíveis às condições de reação, podendo levar a uma baixa reprodutibilidade dos resultados de amplificação (Weeden *et al.*, 1992). Diversos fatores, incluindo a concentração do DNA molde e do *primer* (Kernodle *et al.*, 1993), a qualidade do DNA molde (Weeden *et al.*, 1992), o tipo de polimerase utilizada (Schierwater & Ender, 1993; Meunier & Grimont, 1993), a concentração de magnésio, a temperatura de anelamento do *primer*, o tamanho e composição de bases do *primer* (Ellsworth *et al.*, 1993) e até os termocicladores usados (Meunier & Grimont, 1993) afetam a reação e devem ser cuidadosamente controlados.

Segundo Weeden *et al.* (1992) outro problema associado a esta técnica é a amplificação de bandas fracas em análises rotineiras, além das bandas intensas. Por outro lado, segundo estes autores, este problema não é limitante para a aplicação desta técnica, já que as bandas intensas e bem definidas, representam marcadores genéticos bastante confiáveis.

Portanto, erros derivados do uso dos marcadores RAPD podem ser minimizados por meio do controle das condições de reação e da análise cuidadosa dos marcadores RAPD, onde apenas bandas bem definidas e reproduzíveis são consideradas. De fato, Weeden *et al.* (1992) investigaram a reprodutibilidade dos padrões de RAPD em diferentes espécies de plantas e concluíram que os marcadores RAPD refletiam a verdadeira variação genética dentro das espécies.

Vários estudos de comparação da técnica de RAPD com outras técnicas moleculares ou bioquímicas para avaliação da diversidade genética e estimativa de parentesco, têm demonstrado que esta técnica produz resultados consistentes e confiáveis e pode portanto ser utilizada para estes fins.

Halward *et al.* (1991) usaram 3 métodos para detectar variabilidade genética em amendoim: RFLP, RAPD e restrição enzimática de produtos amplificados. A técnica de RAPD mostrou um resultado semelhante às demais técnicas testadas.

Kazan *et al.* (1992) investigaram a relação genética entre espécies de *Stylosanthes* usando RAPD. O agrupamento das espécies pela análise de *cluster* confirmou as descrições anteriores de parentesco entre estas espécies baseadas em características morfológicas, agronômicas, citológicas e padrão de proteínas.

Wilkie *et al.* (1993) usaram RAPD para estudar o grau de polimorfismo dentro do gênero *Allium*. Estes autores ressaltaram a vantagem da utilização desta técnica em relação a técnica de RFLP para acessar regiões de cópia única em espécies que apresentam genomas muito grandes, como é o caso do gênero *Allium*. A geração de sondas a partir de fragmentos RAPD amplificados destas regiões de cópia única facilita o estudo das mesmas devido a pequena proporção do genoma representada por elas.

Puterka *et al.* (1993) analisaram a variação genética existente em populações de *Diuraphis noxia* de diferentes locais por isoenzimas e RAPD. A técnica de RAPD detectou uma variação genética entre as populações muito maior do que aquela encontrada por isoenzimas, demonstrando então ser superior para discriminar populações de uma mesma espécie.

Heun *et al.* (1994) fizeram um estudo comparativo entre RAPD e isoenzimas quanto a estimativa de parentesco entre 24 acervos de aveia silvestre hexaplóide (*Avena sterilis* L.). Eles concluíram que estas duas técnicas foram eficientes em agrupar os 24 acervos em dois grupos distintos, entretanto elas diferiram em descrever as exatas relações entre os acervos dentro deste grupos, sendo que a análise por RAPD resultou em uma separação mais definida entre os grupos. Os autores ressaltam a importância da utilização de técnicas de marcadores moleculares para a determinação mais acurada das relações de parentesco entre acervos que são muito próximos, pois estes dificilmente são diferenciados corretamente por isoenzimas.

Ahmad & McNeil (1996) analisaram germoplasmas do gênero *Lens* (lentilha) por diferentes técnicas: RAPD, SDS-PAGE de proteínas totais, estudos morfológicos e relações de cruzamento em espécies deste gênero. Os marcadores RAPDs e bioquímicos mostraram-se os mais consistentes e confiáveis para determinação da relação genética entre estes germoplasmas, sugerindo a utilização destes métodos em conjunto para análises taxonômicas deste gênero.

Devido à rapidez e eficiência em detectar polimorfismos em um grande número de loci em comparação com outras técnicas, a técnica de RAPD tem sido amplamente utilizada para estudos de diversidade genética e taxonomia em várias espécies.

Hu & Quiros (1991) utilizando marcadores gerados por apenas 4 *primers* RAPD foram capazes de discriminar 14 cultivares de brócolis e 12 cultivares de couve-flor (*Brassica oleracea* L.).

Demeke *et al.* (1992) investigaram o uso de RAPDs para estudos taxonômicos em *Brassica*, *Raphanus* e *Sinapis*. Eles conseguiram discriminar espécies dentro de cada gênero e até indivíduos dentro de cada espécie, demonstrando a aplicabilidade desta técnica para estudos taxonômicos a diferentes níveis, desde populações até espécies e gêneros.

Coppenolle *et al.* (1993) avaliaram a utilidade da técnica de RAPD para identificação e análise filogenética em *Azolla*. Foram avaliados representantes de todas as espécies conhecidas dentro do gênero *Azolla*. Em uma análise inicial, utilizando 22 *primers*, as espécies foram separadas em 3 grupos distintos que poderiam ser facilmente distinguidos uns dos outros. Estes autores demonstraram também que com apenas 3 *primers*, acervos individuais poderiam ser identificados rotineiramente e que com 10 *primers* uma filogenia idêntica aquela derivada de 22 *primers* poderia ser construída, indicando que o uso de 10 *primers* poderia ser ideal para o começo de um estudo similar com outros organismos, especialmente quando espécies estão envolvidas.

Haley *et al.* (1994) avaliaram o grau de diversidade genética por RAPD entre e dentro de classes comerciais representantes dos *pools* gênicos Mesoamericano e Andino de feijoeiro. Estes autores observaram um padrão de polimorfismo em série, onde o polimorfismo entre *pools* gênicos >entre raças> dentro das raças. O nível de polimorfismo entre os *pools* gênicos foi de 83,4% e entre raças do mesmo *pool* gênico foi similar entre Mesoamericanos (61,7%) e Andinos (60,4%). Estes autores ressaltaram a utilização desta técnica na construção de mapas genéticos de ligação, devido a sua simplicidade, eficiência da análise e polimorfismo detectável entre genótipos comerciais

Demeke *et al.* (1996), em seus estudos de diversidade genética entre cultivares de batata, compararam os resultados obtidos por RAPD e o pedigree destas variedades. Estes autores ressaltaram que, embora exista uma tendência onde genótipos aparentados

sejam geneticamente similares, podem existir exceções, onde variedades aparentadas diferem geneticamente tanto quanto variedades não aparentadas.

Vasconcelos *et al.* (1996) analisaram a diversidade genética de vinte oito cultivares de feijão utilizando a técnica de RAPD e análise de faseolina. Os cultivares foram divididos em dois grandes grupos com base no tipo de faseolina. A análise dos produtos de amplificação também agrupou os cultivares em dois grupos e além disto, possibilitou uma distinção mais precisa entre e dentro destes grupos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética e Bioquímica (DEGEB) da Universidade Federal de Uberlândia.

#### 3.1. Material Biológico

Foram avaliados 36 cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), sendo 24 do grupo Mesoamericano e 12 do grupo Andino (Tabela 1). Os cultivares utilizados neste estudo foram gentilmente cedidos pelo Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP) e Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA).

As sementes de cada cultivar foram divididas em dois lotes de quatro sementes cada, sendo que um deles foi utilizado para análise eletroforética das frações protéicas e o outro foi plantado em casa de vegetação.

Tabela 1. Identificação dos 36 cultivares de feijão comum avaliados neste estudo.

MESOAMERICANOS			
Sanilac	Ica Pijão	Ipa 6	Pinto
Seafarer	Rojo de Seda	Zamorano	Great Northern
Brasil 2	Safira	Michelite	Red Mexican
Rio Tibagi	Mulatinho	Small White	Flor de Mayo
Jamapa	Carioca	Puebla 152	Garbancillo
Porrillo	Rosinha G2	Compuesto Negro	Apetito Blanco
ANDINOS			
	Canario	Antioquia 8	Barbunya
	Pompadour	Jalo	Overitos 7634
	Diacol Calima	Manteigão Fosco	Overitos 7635
	Mayo Coba	Cramberry	Mortino

## 3.2. Análise Bioquímica

### 3.2.1. Extração de Proteínas

Inicialmente, foram retirados o tegumento e o embrião das sementes, e os cotilédones foram triturados até a formação de um fino pó. Este macerado foi utilizado para a extração das frações protéicas, que uma vez obtidas foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para uma posterior análise eletroforética.

#### 3.2.1.1. Faseolina

O procedimento utilizado para a extração de faseolina foi aquele descrito por Romero *et al.* (1975) com modificações no tempo para extração e centrifugação. Sessenta miligramas do macerado foram colocados em microtubo juntamente com 1,2 ml de solução de NaCl 0,5 M contendo ácido ascórbico 0,25 M, pH 2,4. A proteína foi extraída com agitação intermitente por 1h e em seguida centrifugada a 10.000 xg por 20 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi coletado e a ele foram adicionados cinco vezes o volume de água desionizada gelada, sendo a faseolina precipitada por centrifugação a 10.000 xg por 20 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ . Esta etapa foi repetida para a eliminação do ácido ascórbico e o precipitado final obtido foi solubilizado em 1 ml de NaCl 0,5 M.

#### 3.2.1.2. Albumina

A albumina das sementes foi extraída segundo metodologia descrita por Ma & Bliss (1978), com modificações nos tempos para extração. Sessenta miligramas do macerado foram tratados três vezes com 1,2 ml de solução de NaCl 0,5 M e ácido ascórbico 0,25 M, sendo o tempo dos três tratamentos de 24, 5 e 5 h, respectivamente. Em cada um dos tratamentos, macerado e solução de extração eram mantidos em agitação constante. Ao final de cada tratamento, o sobrenadante era separado por centrifugação a 10.000 xg por 20 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ . Os sobrenadantes obtidos dos 3 tratamentos foram misturados e a eles foi acrescentado cinco vezes o volume de água desionizada gelada a fim de precipitar as globulinas. A albumina, que é mantida em solução em baixas concentrações salinas, foi separada por centrifugação a 10.000 xg por 20 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante obtido contendo a albumina foi dializado contra água desionizada em membrana de celulose por 24 h, com 4 trocas a cada 6 h. O dializado foi

centrifugado a 10.000 xg por 20 min. a 4°C, o sobrenadante foi liofilizado e a proteína obtida foi solubilizada em 100 µl de água desionizada.

### 3.2.1.3. Proteínas Solúveis em NaCl 0,5 M

As proteínas foram extraídas de acordo com protocolo descrito por Echeverrigaray *et al.* (1993). Dez miligramas de macerado foram incubados com 100 µl de solução de NaCl 0,5 M por uma hora a 4°C, com agitação constante. Os extratos foram centrifugados a 10.000 xg por 20 min. e o sobrenadante recolhido em microtubo.

### 3.2.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante (SDS-PAGE)

Amostras das proteínas extraídas foram dissociadas em seus constituintes polipeptídeos pelo aquecimento a 100°C por 5 min. em presença de tampão da amostra 1X (Tris-HCl 0,187 M pH 6,8; SDS 6%; EDTA 6 mM; glicerol 27,6%, azul de bromofenol) e β-mercaptoetanol, nas proporções de 1:0,5:0,1, respectivamente.

As subunidades foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970) nas concentrações de 8% para a faseolina e 12 e 16% para fração solúvel em NaCl e albumina, respectivamente. As dimensões dos géis de poliacrilamida variaram de 21 cm x 19 cm x 0,75 mm para faseolina e 9,5 cm x 10,5 cm x 0,75 mm para albumina e fração solúvel em NaCl 0,5 M.

A solução de Trizma base 0,1 M; EDTA 7,8 mM; glicina 0,77 M e SDS 0,3% pH 8,3, foi utilizada como solução eletrodo para ânodo e cátodo.

As eletroforeses foram conduzidas a 20 mA por aproximadamente 4 h para faseolina e 2 h para albumina e fração solúvel em NaCl 0,5 M.

Após a corrida eletroforética, os géis foram corados por 12 h com solução de Coomassie Brilliant Blue R 250 a 0,1% em água-metanol-ácido acético (40:50:10) e o excesso do corante retirado com água-etanol-ácido acético (60:30:10).

A secagem dos géis foi baseada no método de Popescu (1983), adaptado para secagem em bastidores. Os géis foram mantidos em uma solução de ácido acético a 7% e glicerol a 10% por 12 h e em seguida prensados entre duas folhas de papel celofane poroso e deixados à temperatura ambiente por 24 h para a secagem.

### 3.2.3. Determinação da Massa Molecular

A massa molecular dos produtos dissociados foi determinada segundo Laemmli (1970), a partir de uma curva de calibração obtida pelos logaritmos dos pesos moleculares dos polipeptídeos padrões (coordenada) por suas respectivas migrações relativas (Rf) (abscissa). Os padrões de peso molecular utilizados para estimativa das massas moleculares das subunidades dissociadas foram o SDS-6H e SDS-7 (SIGMA). Estes padrões apresentavam as seguintes proteínas marcadoras:

(1) SDS-6H-Miosina (PM 205.000),  $\beta$ -Galactosidase (PM 116.000), Fosforilase b (PM 97.400), Albumina Bovina (PM 66.000), Ovoalbumina (PM 45.000) e Anidrase Carbônica (PM 29.000),

(2) SDS-7-Soroalbumina Bovina (PM 66.000), Ovoalbumina (PM 45.000), Gliceraldeído-3-P Desidrogenase (PM 36.000), Anidrase Carbônica (PM 29.000), Tripsinogênio (PM 24.000), Inibidor de Tripsina (PM 20.000),  $\alpha$ -Lactalbumina (PM 14.200).

## 3.3. Análise Molecular

### 3.3.1. Extração de DNA Genômico de Phaseolus vulgaris

O DNA genômico foi isolado de folhas jovens de acordo com metodologia descrita por Vilarinhos *et al.* (1994), com adaptações para microextração. Duzentos miligramas de folhas novas foram triturados em presença de nitrogênio líquido e rapidamente transferidos para microtubo, onde foi adicionado 1ml de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 50 mM pH 8,0; NaCl 1 M; 1,5% de CTAB; 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol) pré-aquecido a 65°C. A suspensão foi incubada a 65°C por aproximadamente 90 min. com agitação suave e constante e em seguida foi submetida por duas vezes a um processo de desproteinização pela adição de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) na proporção de 1:1 seguido de centrifugação a 700 xg por 15 min. O sobrenadante obtido foi transferido para outro microtubo e os ácidos nucleicos foram então precipitados adicionando-se 2/3 de seu volume de isopropanol gelado e centrifugando a 4.500 xg por 10 min. Os ácidos nucleicos precipitados foram lavados

com etanol 80%, deixados secar a vácuo, resuspendidos em tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0) contendo RNase na concentração de 40mg/ml e mantidos a 37°C por 30 min. O DNA foi então precipitado por etanol a 70%, centrifugado a 4.500 xg por 10 min., deixado secar à vácuo e resuspendido em 250 µl tampão TE. As amostras de DNA foram armazenadas a -80°C.

### **3.3.2. Dosagem do DNA em Espectrofotômetro**

O DNA foi quantificado por leitura de absorbância a 260 nm em espectrofotômetro e sua qualidade avaliada pela razão ABS260/A280 nm e por eletroforese em gel de agarose a 0,7% (Sambrook *et al.*, 1989). Uma alíquota de 10 µl de cada amostra de DNA foi diluída 10 vezes em água ultrapura para leitura em espectrofotômetro e 15 µl da amostra de DNA foram submetidos à eletroforese. Após a quantificação, as amostras de DNA foram diluídas em água ultra pura para uma concentração final de 10 ng/µl.

### **3.3.3. Amplificação ao Acaso de DNA Polimórfico (RAPD)**

Foram utilizados 17 *primers* de sequência arbitrária com 10 pb de comprimento da OPERON Technology (Tabela 2). Cada reação de amplificação continha tampão Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTPs 10 mM cada (dCTP, dATP, dCTP e dGTP), 1U de Taq DNA polimerase, 8 pmoles de *primer* e 20 ng de DNA genômico em um volume final de reação de 25 µl. Cada reação foi coberta com 15 µl de óleo mineral para evitar a evaporação.

Todas as análises incluíram um controle negativo, contendo todos os componentes da reação exceto o DNA genômico, para confirmar se os produtos da amplificação representavam DNA genômico amplificado e não artefato do *primer*.

A reação foi amplificada em termociclador MJ Research INC, modelo PTC-100, por 3 ciclos de 94°C/1 min., 35°C/1 min. e 72°C/2 min.; 34 ciclos de 94°C/10 seg., 40°C/20 seg. e 72°C/2 min. e 1 ciclo de 72°C/5 min., conforme descrito por Young & Kelly (1996).

**Tabela 2.** Sequência de nucleotídeos dos *primers* testados

<i>Primer</i>	Sequência (5' - 3')
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPA-07	GAAACGGGTG
OPA-10	GTGATCGCAG
OPA-11	CAATCGCCGT
OPA-12	TCGGCGATAG
OPA-17	GACCGCTTGT
OPA-19	CAAACGTCGG
OPC-20	ACGGAAGTGG
OPD-19	CTTGGCACGA
OPE-19	GACAGTCCCT
OPG-08	TCACGTCCAC
OPG-18	GGCTCATGTG
OPI-19	AATGCGGGAG
OPS-13	GTCGTTCTTG
OPW-13	CACAGCGACA
B355*	GTATGGGGCT

\*Young & Kelly (1996).

### 3.3.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Não-Desnaturante

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese não-desnaturante em gel de poliacrilamida a 6% nas dimensões de 15 cm x 15 cm x 0,75 mm, em tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 1X, de acordo com Sambrook *et al.* (1989).

Foi acrescentada a cada uma das amostras uma solução contendo 20% de Ficoll, 0,25% de Xileno e 0,25% de Azul de Bromofenol, na proporção de 1:5, respectivamente. A eletroforese foi conduzida a 100 V por 4 h. Após a eletroforese os géis foram corados por 20 min. com brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/ml e os fragmentos visualizados em um transiluminador ultravioleta.

Os géis foram fotografados com Polaroid, filme 667, usando filtro laranja, tempo de exposição de 1/30 de segundo e abertura do diafragma de 5,6.

### 3.3.5. Análise dos Resultados RAPD

As bandas RAPD foram classificadas como 1 (presente) ou 0 (ausente), para gerar uma matriz de valores binários. As bandas de pouca intensidade, que não poderiam ser prontamente distinguidas como presente ou ausente, foram desconsideradas.

A matriz gerada foi analisada pelo programa STATISTICA 4.5 A (1993) para o cálculo das distâncias genéticas e análise de *cluster*. As distâncias genéticas foram calculadas pelo método de Porcentagem de Desacordo, que é dado pela fórmula:

$$N'_{AB} / N_T \text{ (Puterka et al., 1993)}$$

onde,  $N'_{AB}$  é o número total de bandas polimórficas entre os genótipos comparados e  $N_T$  é o número total de bandas. A análise de *clusters* foi feita pelo método não-ponderado de agrupamento aos pares utilizando médias aritméticas (UPGMA), o qual agrupa inicialmente indivíduos mais similares e assim sucessivamente, até os indivíduos ou grupos mais distantes.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Análise Bioquímica

Para a obtenção de resultados seguros, foi fundamental a padronização das técnicas de extração de proteínas e de eletroforese na fase inicial deste trabalho. No primeiro caso, a padronização envolveu algumas modificações dos protocolos originais com relação ao tempo de extração, a fim de tornar este processo mais rápido.

Na eletroforese, duas concentrações de acrilamida foram testadas para cada uma das frações protéicas. No caso da faseolina, as concentrações testadas do gel foram 8 e 10%. A concentração de 8% mostrou-se a mais adequada para a análise das faseolinas por permitir uma melhor separação entre as bandas. Para a avaliação das albuminas testou-se as concentrações de 16 e 18%, sendo que a primeira apresentou os melhores resultados. Para a análise das proteínas solúveis em NaCl 0,5 M foram testadas as concentrações de 10 e 12%, sendo que a concentração de 12% permitiu a avaliação de um maior número de bandas. Em vista destes aspectos, as concentrações de acrilamida de 8, 16 e 12% foram utilizadas para análise em SDS-PAGE dos padrões de faseolina, albumina e proteínas solúveis em NaCl 0,5 M dos cultivares de feijoeiro, respectivamente.

#### 4.1.1. Faseolina:

Os padrões de faseolina mais frequentes entre os cultivares analisados foram os tipos "S" e "T", conforme observado também por Gepts *et al.* (1986), Gepts & Bliss (1986) e Vasconcelos *et al.* (1996), entre outros autores. O padrão "S" estava presente em aproximadamente 80% dos cultivares Mesoamericanos avaliados, enquanto que a faseolina "T" foi encontrada em 75% dos cultivares Andinos. Um total de nove padrões diferentes de faseolina foram encontrados entre os cultivares avaliados.

Em SDS-PAGE, o padrão "S" de faseolina mostrou três bandas, com massas moleculares estimadas de 48, 45 e 44 kDa, enquanto que o padrão "T" apresentou cinco bandas com massas moleculares de 51, 50, 48, 46 e 44 kDa (Figura 1).

Estes resultados diferem parcialmente daqueles obtidos por Brown *et al.* (1981) para estes padrões de faseolina quanto à massa molecular estimada e número de produtos dissociados.

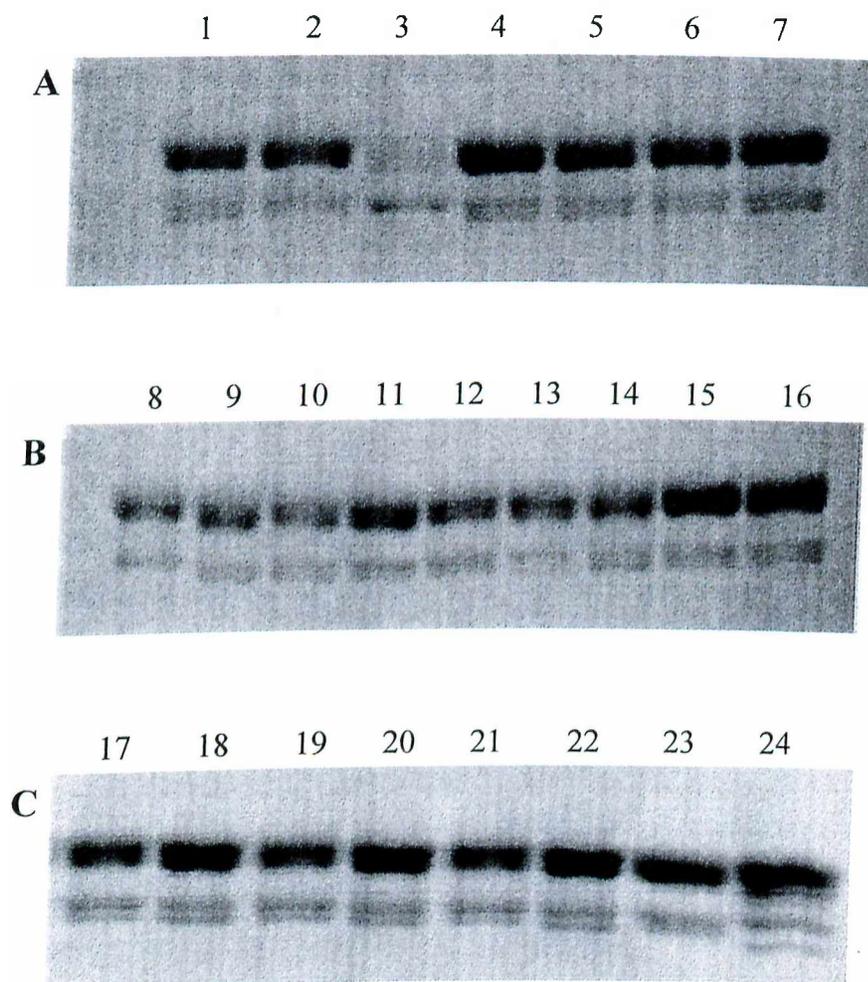
Estas alterações observadas com relação ao número e pesos moleculares das bandas dos tipos "S" e "T" de faseolina devem ter ocorrido em função de diferenças existentes nas condições experimentais utilizadas em cada estudo, como concentração do gel de poliacrilamida, concentração de proteína submetida à eletroforese, tamanho do gel e padrão de peso molecular utilizado para a estimativa dos pesos moleculares.

Em relação ao padrão "S" de faseolina, pode-se observar que a metodologia utilizada para eletroforese por Brown *et al.* (1981) foi mais eficiente para a separação dos produtos dissociados deste padrão.

Por comparação dos perfis eletroforéticos obtidos nestes dois estudos para este padrão de faseolina, é possível afirmar que quatro das seis bandas identificadas por Brown *et al.* (1981), com massas moleculares de 49, 48,5, 48 e 47 kDa, foram detectadas aqui como uma única banda de 48 kDa.

Por outro lado, com relação ao padrão "T" de faseolina observou-se que a metodologia utilizada neste estudo para eletroforese foi a que permitiu melhor separação entre as bandas dissociadas deste padrão. Enquanto Brown *et al.* (1981) identificaram em SDS-PAGE quatro bandas para o padrão "T", aqui foi possível a separação deste padrão em cinco bandas.

Na Figura 1 estão mostrados os padrões de faseolina encontrados entre os cultivares Mesoamericanos avaliados. Como pode-se observar, padrões diferentes do tipo "S" foram encontrados entre os cultivares Brasil 2, Ipa 6, Rojo de Seda e Apetito Blanco. As diferenças observadas entre os padrões de faseolina destes cultivares em relação ao tipo "S" foram de natureza qualitativa e quantitativa, representadas pela presença ou ausência de bandas específicas, bem como pela maior ou menor concentração de determinadas bandas polipeptídicas.



**Figura 1. Eletroforese em SDS-PAGE 8% dos padrões de faseolina encontrados entre os cultivares de feijão Mesoamericanos. A - (1) Sanilac; (2) Seafarer; (3) Brasil 2; (4) Rio Tibagi; (5) Jamapa; (6) Porrillo; (7) Ica Pijão. B - (8) Rojo de Seda; (9) Safira; (10) Mulatinho; (11) Carioca; (12) Rosinha G2; (13) Ipa 6; (14) Zamorano; (15) Michelite; (16) Small White. C - (17) Puebla 152; (18) Compuesto Negro; (19) Pinto; (20) Great Northern; (21) Red Mexican; (22) Flor de Mayo; (23) Garbancillo; (24) Apetito Blanco.**

Entre estes cultivares, *Apetito Blanco* foi o que apresentou o padrão de faseolina mais divergente em relação ao tipo "S". Este padrão mostrou em SDS-PAGE cinco bandas com massas moleculares de 49; 48; 48,5; 44,5 e 43 kDa, diferindo portanto do tipo "S" pela presença de três bandas com massas moleculares estimadas em 44,5; 43,5 e 48,5 kDa e pela ausência da banda de 45 kDa.

Por outro lado, o cultivar *Ipa 6* foi o que apresentou o padrão de faseolina mais similar ao tipo "S", diferindo deste apenas pela maior migração da sua última banda, que apresentou massa molecular de 43,5 kDa.

O padrão de faseolina do cultivar *Brasil 2* identificado neste estudo já havia sido descrito anteriormente neste mesmo cultivar por Koenig *et al.* (1990) como sendo uma variante do tipo "S" composta por três bandas e foi designada por eles de "Sb". Neste estudo, o padrão apresentado por este cultivar também consistiu de três bandas, cujas massas moleculares foram estimadas em 49, 48 e 44,5 kDa.

O padrão de faseolina do cultivar *Rojo de Seda* diferenciou-se do tipo "S" pela ausência da banda de 44 kDa.

Os dados referentes ao número e massa molecular dos produtos dissociados destes padrões, sugerem que estes provavelmente são variantes do tipo "S" de faseolina, que podem ter surgido devido a mutações genéticas (deleções e/ou inserções) ocorridas em suas sequências codificadoras seguidas por seleção. Estas alterações nas sequências codificadoras devem ter ocorrido após a domesticação, já que estes padrões variantes não são encontrados em feijões silvestres.

Estas formas variantes do tipo "S" de faseolina encontradas nos cultivares *Rojo de Seda*, *Ipa 6* e *Apetito Blanco*, aparentemente não correspondem a nenhum padrão descrito na literatura em cultivares Mesoamericanos.

Esta conclusão, no entanto, baseia-se apenas na comparação do perfil eletroforético destes padrões com os perfis dos outros tipos encontrados na literatura, já que esta é a única informação disponível com relação aos padrões diferentes dos tipos "S", "T" e "C". Padrões variantes destes tipos são mostrados apenas em fotos que retratam géis de poliacrilamida, que nem sempre apresentam uma boa resolução e nenhuma informação a respeito da massa molecular dos polipeptídeos dissociados é fornecida. Considerando-se então de que se tratam de padrões não conhecidos de

faseolina, propõe-se a denominação destes três tipos de faseolina de acordo com a inicial de suas cultivares: "Sr" (Rojo de Seda), "Si" (Ipa 6), "Sa" (Apetito Blanco).

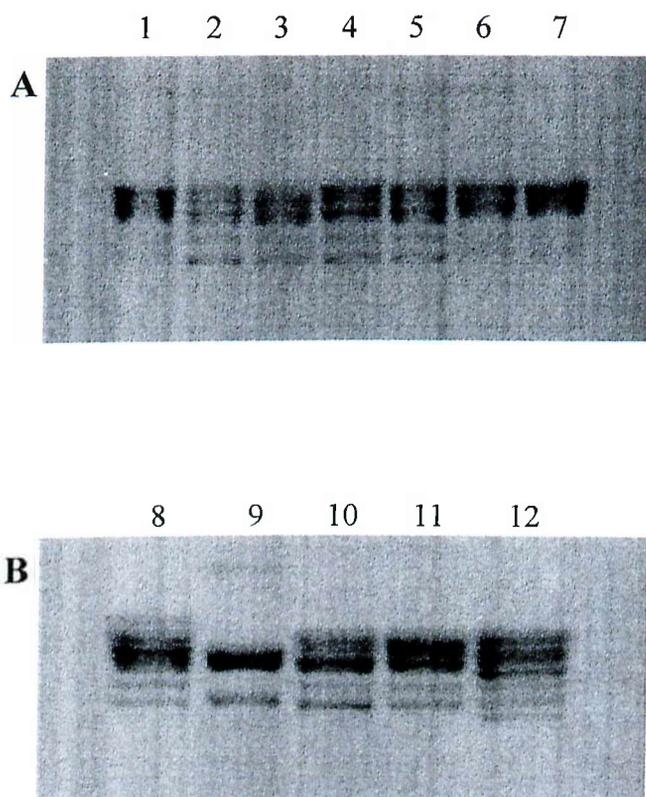
Como relação aos cultivares de origem Andina, pode-se observar pela Figura 2, que todos apresentaram faseolina "T", com exceção de Cramberry, Barbunya e Mortino.

O padrão de faseolina encontrado no cultivar Cramberry foi identificado como sendo do tipo "H", em função de sua semelhança com o padrão de faseolina "H" descrito por Gepts *et al.* (1986). Este padrão foi composto de seis bandas com massas moleculares de 53, 51, 50, 47, 46 e 44 kDa.

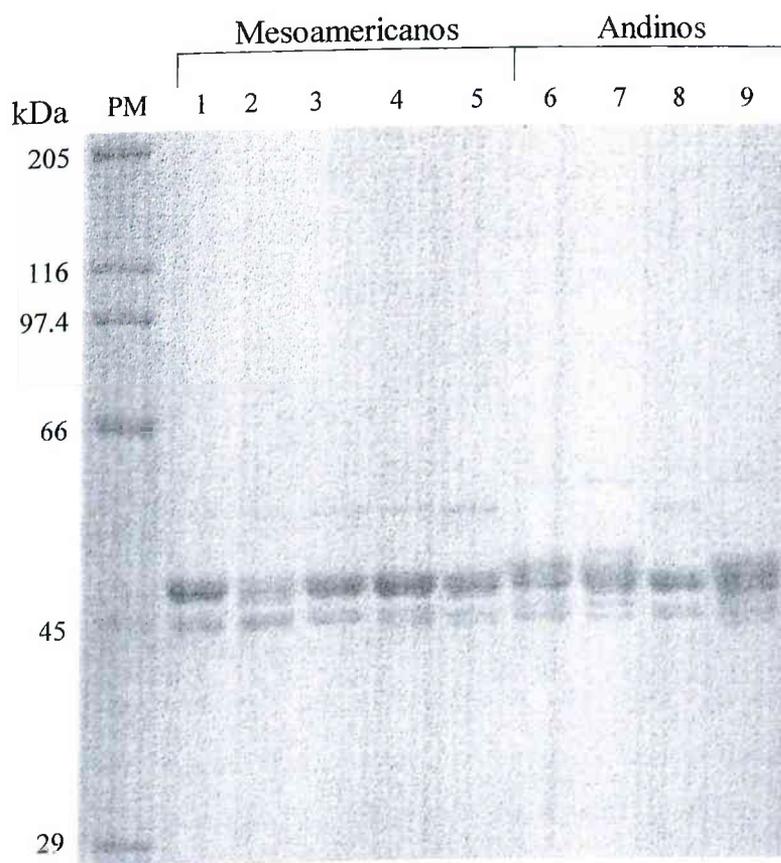
A faseolina do cultivar Mortino foi reconhecida neste estudo como sendo do tipo "C", já que o seu padrão foi muito semelhante aquele descrito por Brown *et al.* (1981) para o tipo "C", apresentando sete bandas das quais seis apresentaram massas moleculares de 51, 50, 48, 46,5, 46 e 44 kDa, além de uma banda única de 43 kDa, também encontrada no padrão "Sa".

Surpreendentemente, o padrão de faseolina do cultivar Barbunya não se enquadrou em nenhum outro tipo descrito para cultivares de origem Andina. Por outro lado, este padrão mostrou-se muito similar ao tipo "S" quanto ao número e peso molecular de suas bandas, apresentando três bandas com massas moleculares de 49, 48 e 45 kDa. Este resultado sugere que este cultivar provavelmente tenha sido classificado incorretamente como sendo de origem Andina e serve como justificativa para uma reavaliação quanto ao seu centro de origem.

Como mostrado na Figura 3, a distribuição dos padrões de faseolina entre os cultivares analisados neste estudo mostrou claramente a existência de dois grupos distintos de cultivares de feijoeiro: os Mesoamericanos e os Andinos. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos também por Gepts *et al.* (1986); Koenig & Gepts (1989), Singh (1989), Singh (1991) e Singh *et al.* (1991c), em estudos envolvendo esta proteína.



**Figura 2.** Eletroforese em SDS-PAGE 8% dos padrões de faseolina encontrados entre os cultivares de feijão Andinos. **A** - (1) Pompadour; (2) Canario; (3) Diacol Calima; (4) Mayo Coba; (5) Antioquia 8; (6) Jalo; (7) Manteigão Fosco. **B** - (8) Cramberry; (9) Barbunya; (10) Overitos 7634; (11) Overitos 7635; (12) Mortino.



**Figura 3. Eletroforese em SDS-PAGE 8% dos diferentes padrões de faseolina encontrados entre os cultivares de feijão de origem Mesoamericana e Andina. (PM) Padrão de Peso Molecular SDS-6H; (1) Sanilac - tipo "S"; (2) Brasil 2 - tipo "Sb"; (3) Rojo de Seda - tipo "Sr"; (4) Ipa 6 - tipo "Si"; (5) Apetito Blanco - tipo "Sa"; (6) Jalo - tipo "T"; (7) Cramberry - tipo "H"; (8) Barbunya e (9) Mortino - tipo "C".**

#### 4.1.2. Albumina:

A metodologia utilizada neste estudo permitiu a extração apenas da fração de albuminas solúveis em condições ácidas (Ma & Bliss, 1978).

A análise desta fração protéica revelou a existência de variabilidade entre os cultivares Mesoamericanos e Andinos quanto ao padrão de albumina mostrado em SDS-PAGE, tanto em relação ao número de bandas quanto a massa molecular das mesmas.

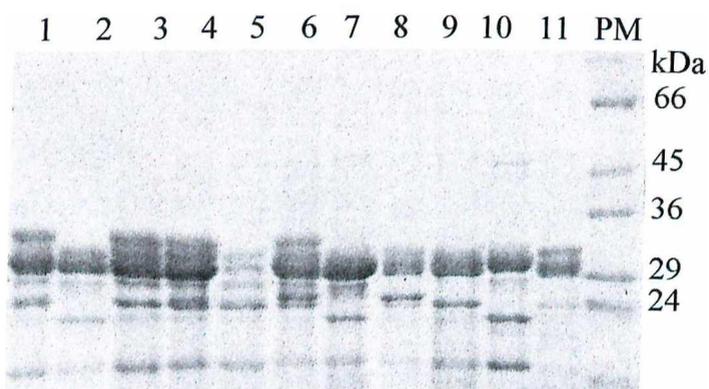
Diferenças entre o padrão eletroforético de albuminas de diferentes cultivares já haviam sido demonstradas por outros autores em feijão comum (Sgarbieri & Galeazzi 1990; Rayas-Duarte *et al.*, 1992; Przybylska & Zimniak-Przybylska, 1993; Zimniak-Przybylska & Przybylska, 1994), *Vigna radiata* (Tomooka *et al.*, 1992), *Vigna umbellata* (Rodriguez & Mendoza, 1989) entre outros.

Os padrões eletroforéticos em SDS-PAGE de albumina encontrados entre os cultivares avaliados estão mostrados na Figura 4. Foram encontradas um total de 8 bandas diferentes entre os padrões de albumina, as quais tiveram suas massas moleculares estimadas em 33, 31, 30, 29, 28, 25, 24 e 23 kDa.

Estes resultados diferem daqueles obtidos por Sgarbieri & Galeazzi (1990) quanto ao número de bandas encontradas para os padrões de albumina em feijoeiro comum. Estes autores conseguiram detectar em PAGE, padrões de albumina que apresentavam um número maior de bandas, com um mínimo de quatro e máximo de onze bandas. Isto pode ter sido devido a utilização por parte destes autores de extratos de proteínas totais em seus estudos, o que levaria a uma fração protéica mais enriquecida em albuminas do que a aquela utilizada no presente estudo.

As diferentes combinações obtidas pela presença ou ausência de bandas específicas geraram sete padrões eletroforéticos, incluindo um tipo raro. O número de bandas destes padrões variou de três até seis bandas.

Em outro estudo em feijoeiro feito por Zimniak-Przybylska & Przybylska (1994) foram encontrados, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante, treze padrões de albumina, incluindo cinco fenótipos raros. O número maior de padrões identificados por eles em comparação com o presente estudo se deve a grande quantidade de genótipos avaliados por estes autores, tanto cultivado quanto silvestre.



**Figura 4. Eletroforese em SDS-PAGE 16% dos padrões de albumina encontrados entre os cultivares de feijão analisados. (PM) Padrão de Peso Molecular SDS-7H. (1) Brasil 2; (2) Jamapa; (3) Carioca; (4) Puebla 152; (5) Great Northern; (6) Apetito Blanco; (7) Pompadour; (8) Antioquia 8; (9) Jalo; (10) Barbunya; (11) Mortino.**

Conforme observado para faseolina, os padrões de albumina não apresentaram uma distribuição aleatória entre os cultivares, de forma que os representantes de cada um destes centros de origem apresentaram padrões distintos de albumina, que permitiram a separação dos mesmos conforme sua origem.

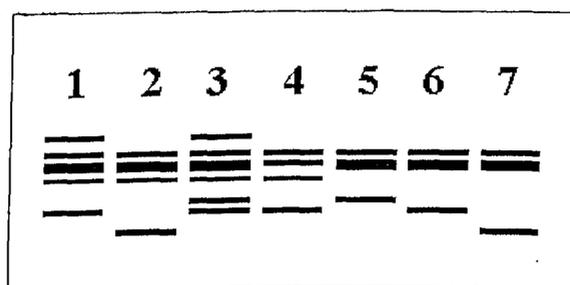
Estes resultados confirmam aqueles obtidos por Zimniak-Przybylska & Przybylska (1994), os quais verificaram que a partir da distribuição de oito padrões de albumina em PAGE era possível a identificação de cultivares dos dois centros de origem.

Na Figura 5 estão esquematizados os diferentes tipos de albumina encontrados nos cultivares avaliados. Como pode ser notado, variações dos padrões de albumina encontrados nos cultivares Mesoamericanos foram mais complexos em comparação com aqueles dos cultivares de origem Andina, em função do maior número de bandas encontradas nestes padrões.

Entre os cultivares Mesoamericanos, os padrões de albuminas característicos foram aqueles que estão representados por Alb1, Alb2 e Alb3. Os cultivares Pinto e Great Northern apresentaram um fenótipo raro, esquematizado por Alb4, bastante diferente dos demais que está. Os padrões de albumina encontrados entre os cultivares Andinos foram aqueles representados por Alb5, Alb6 e Alb7.

Entre os padrões de albumina encontrados nos cultivares Mesoamericanos, foram encontradas duas bandas específicas, com massas moleculares de 28 e 33 kDa, que não apareceram em nenhum dos padrões de cultivares Andinos. Isto sugere que estas bandas, principalmente a de 28 kDa, presente em todos os cultivares Mesoamericanos, possam ser utilizadas como marcadores bioquímicos para diferenciação entre cultivares dos dois centros de origem.

De fato, Przybylska & Zimniak-Przybylska (1993) ao estudar variações existentes entre os padrões de albumina mostrados por 188 acervos de feijoeiro comum sugeriram que estes padrões variantes de albumina poderiam ser úteis como marcadores em investigações genéticas e evolutivas.



**Figura 5. Representação esquemática dos sete padrões de albumina identificados entre os cultivares de feijão analisados. Os padrões encontrados foram denominados: (1) Alb1; (2) Alb2; (3) Alb3; (4) Alb4; (5) Alb5; (6) Alb6 e (7) Alb7.**

#### 4.1.3. Proteínas Solúveis em NaCl 0,5 M:

Entre as frações protéicas extraídas com NaCl 0,5 M, foram avaliadas as glicoproteínas Spa, Spb e lectinas. Este grupo de proteínas foi escolhido em função de relatos de literatura quanto à existência de polimorfismo de seus padrões entre cultivares de feijoeiro comum (Carvalho, 1981; Brown *et al.*, 1982; Osborn *et al.*, 1985; Brelles-Mariño & Boiardi, 1992, Vallejos & Chase, 1991).

As avaliações em SDS-PAGE (Figuras 6 e 7) destas três frações protéicas, mostraram que as lectinas foram aquelas que apresentaram o mais alto grau de polimorfismo quanto ao perfil eletroforético, principalmente entre os cultivares de origem Mesoamericana.

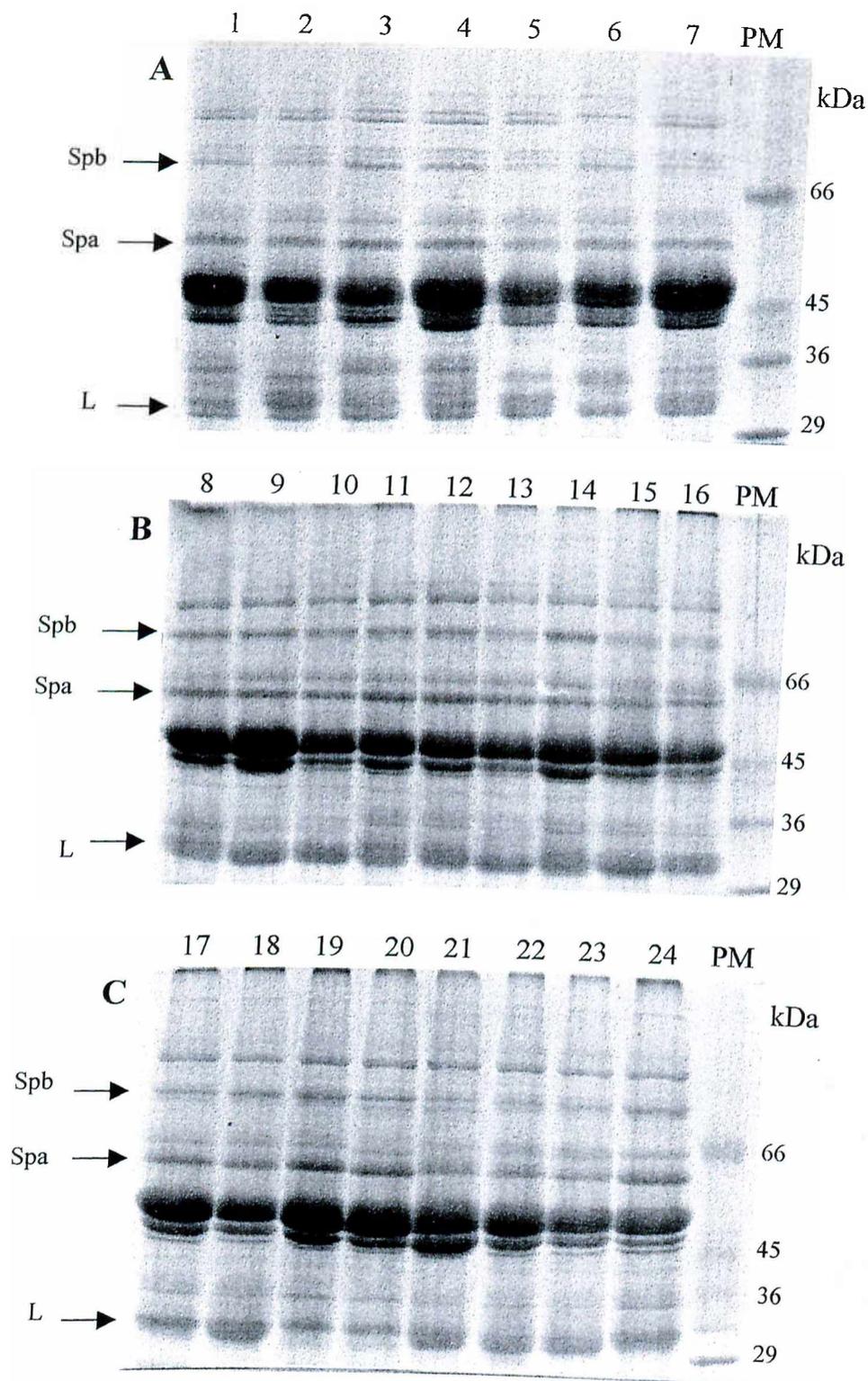
Foram identificadas quatro bandas referentes as lectinas, com massas moleculares estimadas em 35, 34, 32 e 31 kDa. Carvalho (1981) e Brelles-Mariño & Boiardi (1992) também identificaram lectinas como bandas de pesos moleculares próximos de 30 kDa.

Variações de natureza qualitativa, caracterizadas pela presença ou ausência de bandas polipeptídicas específicas, geraram um total de seis padrões eletroforéticos de lectinas, conforme esquematizado na Figura 8.

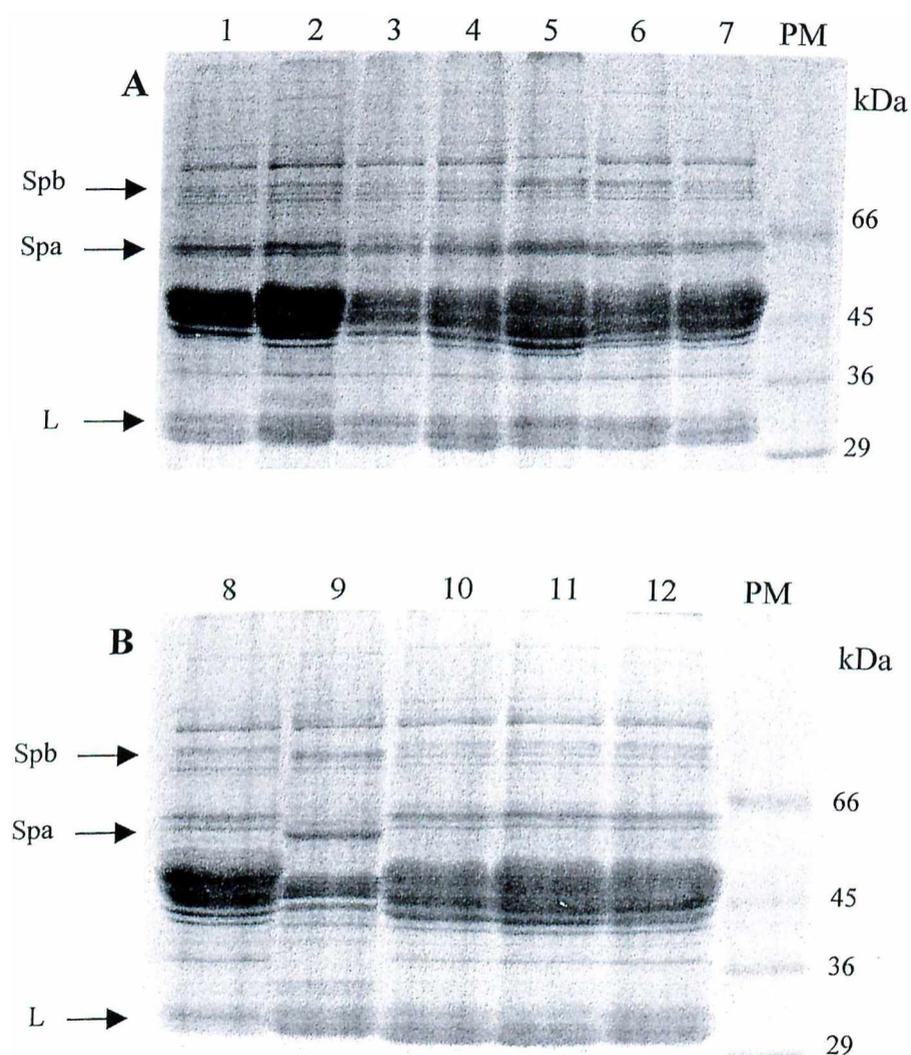
Em estudos anteriores, Carvalho (1981), Brown *et al.* (1982) e Osborn *et al.* (1985), já haviam mostrado a existência de variações qualitativas entre lectinas de cultivares de feijoeiro. Os padrões encontrados nestes estudos apresentaram variações entre 2 a 5 bandas.

Os diferentes padrões de lectinas encontrados foram denominados Lec1, Lec2, Lec3, Lec4, Lec5 e Lec6. Estes padrões correspondem aos tipos S, M, Po e V, respectivamente, descritos previamente por eletroforese bi-dimensional (Brown *et al.*, 1982) e eletroforese não-desnaturante (Osborn *et al.*, 1985).

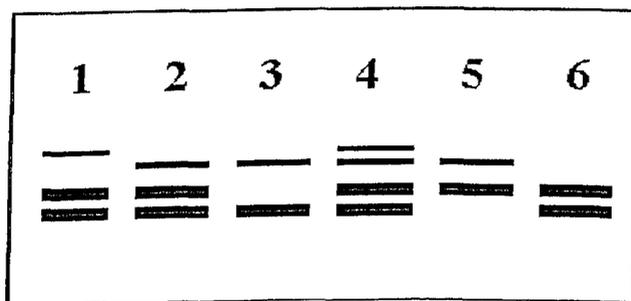
A avaliação da distribuição dos padrões de lectinas indicou que os grupos Mesoamericano e Andino possuem padrões próprios destas proteínas. Os tipos Lec1, Lec3, Lec4, e Lec5 representados na Figura 8 foram detectados apenas em cultivares Mesoamericanos, enquanto que o tipo Lec6 foi encontrado exclusivamente em cultivares Andinos. Apenas o tipo Lec2 foi compartilhado por cultivares dos dois grupos.



**Figura 6. Eletroforese em SDS-PAGE 12% de proteínas solúveis em NaCl 0,5 M dos cultivares de feijão Mesoamericanos. (PM) Padrão de Peso Molecular SDS-7H. A - (1) Sanilac; (2) Seafarer; (3) Brasil 2; (4) Rio Tibagi; (5) Jamapa; (6) Porrillo; (7) Ica Pijão. B - (8) Rojo de Seda; (9) Safira; (10) Mulatinho; (11) Carioca; (12) Rosinha G2; (13) Ipa 6; (14) Zamorano; (15) Michelite; (16) Small White. C - (17) Puebla 152; (18) Compuestro Negro; (19) Pinto; (20) Great Northern; (21) Red Mexican; (22) Flor de Mayo; (23) Garbancillo; (24) Apetito Blanco.**



**Figura 7. Eletroforese em SDS-PAGE 12% de proteínas solúveis em NaCl 0,5 M dos cultivares de feijão Andinos. (PM) Padrão de Peso Molecular SDS-7H. A - (1) Pompadour; (2) Canario; (3) Diacol Calima; (4) Mayo Coba; (5) Antioquia 8; (6) Jalo; (7) Manteigão Fosco. B - (8) Cramberry; (9) Barbunya; (10) Overitos 7634; (11) Overitos 7635; (12) Mortino.**



**Figura 8.** Representação esquemática dos seis padrões de lectina encontrados entre os cultivares de feijão avaliados. Os padrões de lectina foram denominados: (1) Lec1; (2) Lec2; (3) Lec3; (4) Lec4; (5) Lec5 e (6) Lec 6.

Apesar de existir a associação entre o padrão de lectina apresentado e o local de origem do cultivar, nenhuma relação entre tipo de lectina e tipo de faseolina pôde ser observada.

Com relação as glicoproteínas Spa e Spb, foi possível observar que estas apresentavam um polimorfismo altamente específico em relação a origem do cultivar (Figuras 6 e 7). Em SDS-PAGE estas proteínas apareceram como uma única banda cada, cuja massa molecular variou entre cultivares de diferentes origens.

No caso dos cultivares Mesoamericanos, Spa e Spb apresentaram massas moleculares de 56 e 70 kDa, respectivamente, enquanto que nos cultivares Andinos, a massa molecular calculada foi de 58 kDa para Spa e 74 kDa para Spb.

Entre os cultivares Mesoamericanos, entretanto, Small White foi uma exceção em relação ao padrão mostrado de Spa e Spb. Este cultivar apresentou um padrão único destas duas proteínas, de caráter intermediário entre aqueles encontrados nos cultivares Mesoamericanos e Andinos, com massas moleculares de 57 e 72 kDa, respectivamente.

O padrão de Spa e Spb encontrado para o cultivar Barbunya foi o mesmo encontrado para cultivares Mesoamericanas. Este resultado somado àqueles obtidos pela análise dos outros padrões de proteína discordam da literatura que apresenta este cultivar como Andino, e dão suporte à hipótese de uma origem Mesomericana para este cultivar.

A associação observada entre os padrões de Spa e Spb e a origem do cultivar sugerem que estas duas proteínas podem ser bons marcadores bioquímicos para identificação de cultivares de diferentes origens. Esta hipótese é reforçada pelo estudo feito por Vallejos e Chase (1991), segundo o qual Spa, Spb e faseolina, estão organizadas em *cluster* no genoma do feijoeiro, de forma que os tipos de faseolina estão diretamente associados aos padrões de Spa e Spb.

## 4.2. Análise Molecular

Visando aumentar a eficiência na identificação de polimorfismos, 17 *primers* foram inicialmente testados em dois genótipos, um Mesoamericano (Rosinha) e outro Andino (Jalo), a fim de selecionar aqueles cujo número e padrão de bandas fossem adequados para a análise da diversidade genética entre os cultivares.

Entre eles, 4 *primers*- OPA-11, OPA-12, OPA-17 e OPE-19- não puderam ser incluídos na análise de RAPD por não terem gerado produtos amplificados.

Os outros 13 *primers* testados para a avaliação da diversidade genética entre os cultivares de feijoeiro produziram um padrão de amplificação com um número razoável de bandas intensas, como aquele mostrado na Figura 9.

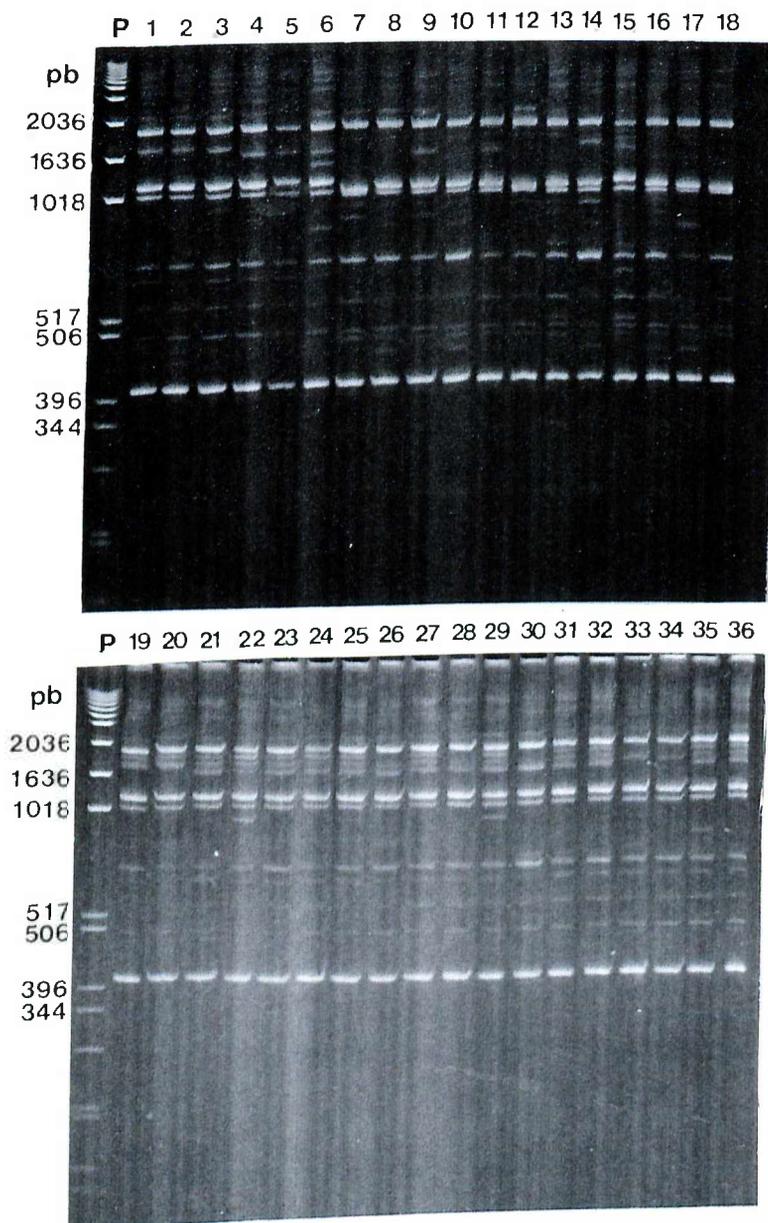
As amostras foram então testadas para cada um dos *primers* selecionados, sempre em duplicata. Todos os *primers* utilizados nesta análise mostraram uma alta repetibilidade de seus padrões de amplificação.

Apenas as bandas intensas, bem definidas e presentes nos dois testes foram incluídas na análise a fim de minimizar erros advindos da contagem incorreta de produtos amplificados fracamente.

A poliacrilamida foi utilizada para a eletroforese por possibilitar uma melhor definição dos fragmentos amplificados e por permitir uma melhor separação entre bandas de tamanhos muito próximos (Valentini *et al.*, 1996).

Os géis foram corados após a eletroforese para evitar erros na determinação dos tamanhos dos fragmentos, já que o brometo de etídio ao se intercalar entre as bases causa alteração de carga, conformação, flexibilidade e peso da molécula de DNA, alterando consequentemente sua migração (Sigmon & Larcom, 1996).

As reações de amplificação de DNA para a análise de RAPD envolvendo 13 *primers* de sequência arbitrária resultaram em 123 bandas amplificadas com tamanho variando entre 350 a 2000 pb, das quais apenas 13 (aproximadamente 10%) foram compartilhadas entre todas as 34 cultivares. O número de loci polimórficos detectados variaram de 2 até 17, dependendo do *primer* testado (Tabela 3).



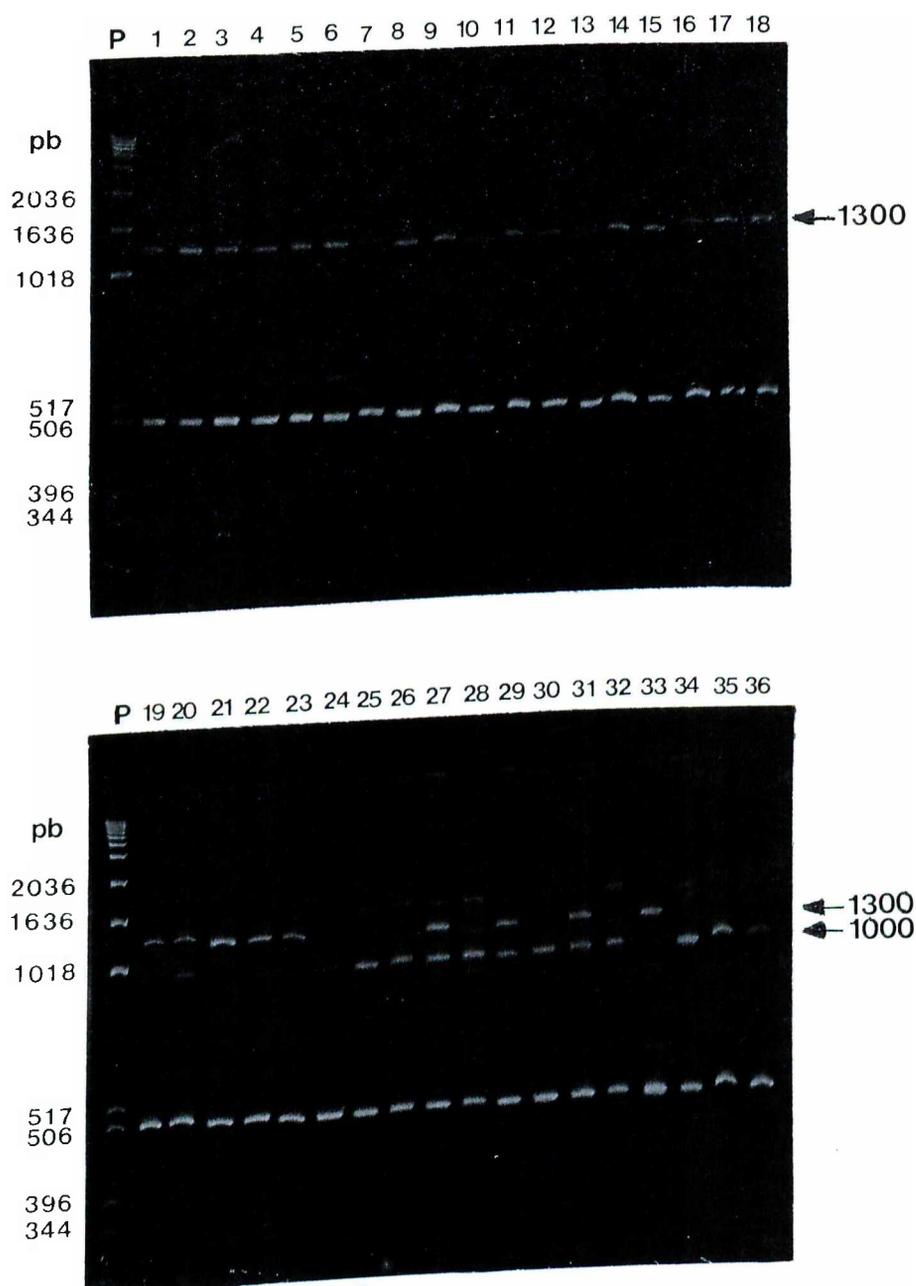
**Figura 9. Exemplo do padrão de amplificação selecionado para caracterização da diversidade genética entre os cultivares de feijoeiro analisados.** Os produtos de amplificação são derivados do *primer* OPA-10 e foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida à 6%. P - Padrão de DNA. **A** - (1) Sanilac; (2) Seafarer; (3) Brasil 2; (4) Rio Tibagi; (5) Jamapa; (6) Porrillo; (7) Ica Pijão; (8) Rojo de Seda; (9) Safira; (10) Mulatinho; (11) Carioca; (12) Rosinha G2; (13) Ipa 6; (14) Zamorano; (15) Michelite; (16) Small White; (17) Puebla 152; (18) Compuestro Negro. **B** - (19) Pinto; (20) Great Northern; (21) Red Mexican; (22) Flor de Mayo; (23) Garbancillo; (24) Apetito Blanco; (25) Pompadour; (26) Canario; (27) Diacol Calima; (28) Mayo Coba; (29) Antioquia 8; (30) Jalo; (31) Manteigão Fosco; (32) Cramberry; (33) Barbunya; (34) Overitos 7634; (35) Overitos 7635; (36) Mortino.

**Tabela 3.** Relação do número total de bandas amplificadas e polimórficas por *primer* testado.

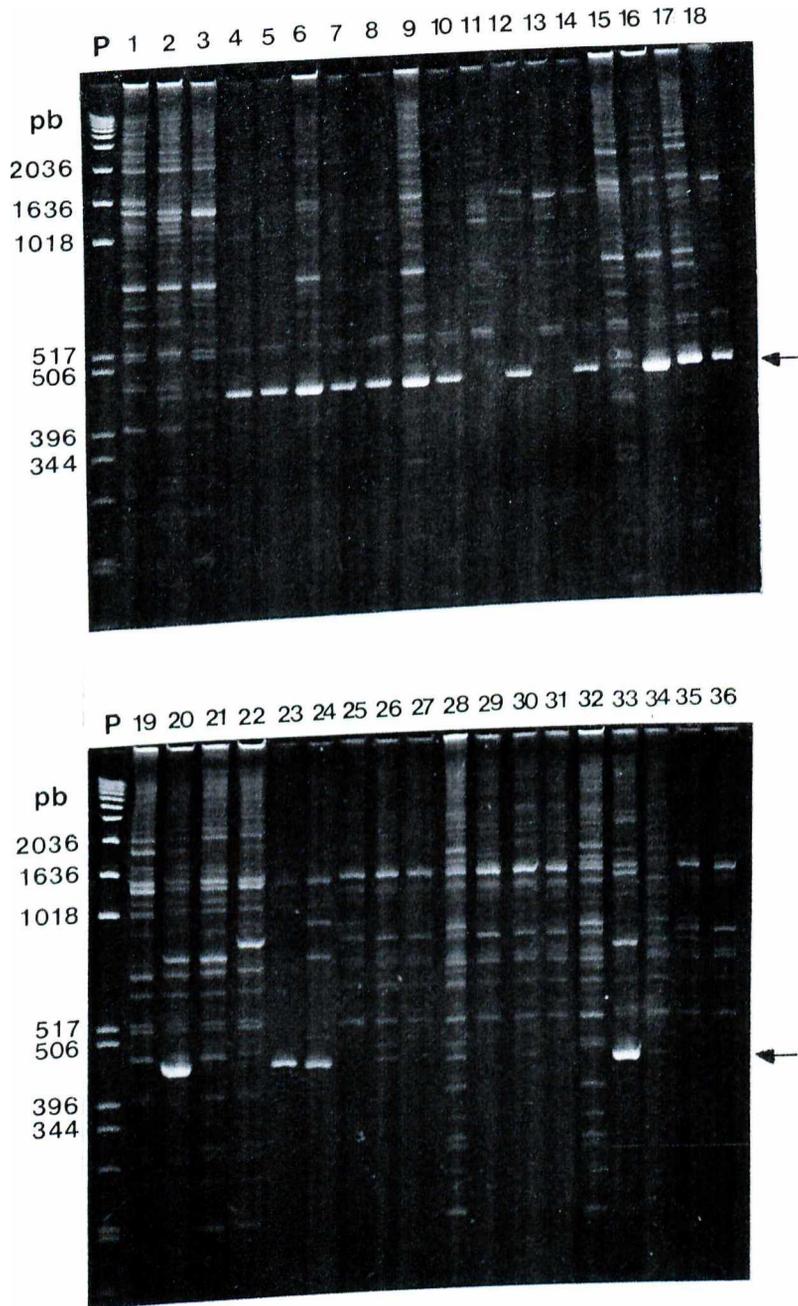
<i>Primer</i>	Bandas		
	Totais	Polimórficas	Tamanho (pb)
OPA-01	9	9	400-2000
OPA-02	13	12	500-2000
OPA-07	8	8	400-2000
OPA-10	10	6	400-2000
OPA-19	10	10	350-2000
OPC-20	9	7	400-1500
OPD-19	11	11	400-2000
OPG-08	5	5	1000-2500
OPG-18	3	2	400-1500
OPI-19	7	7	350-2000
OPS-13	8	7	400-1800
OPW-13	20	17	400-1700
B355	10	9	800-2000

Com apenas o *primer* OPG-18 foi possível a diferenciação entre os feijões Mesoamericanos e Andinos através de seus padrões específicos de amplificação com uma porcentagem de acerto de 96% e 100%, respectivamente. Com relação ao padrão de amplificação gerado por este *primer* (Figura 10), todos os cultivares Mesoamericanos, com exceção de *Apetito Blanco*, puderam ser identificados pela presença de uma banda de aproximadamente 1300 pb, enquanto que os cultivares Andinos foram reconhecidos pela presença de uma banda de aproximadamente 1000 pb. O cultivar *Barbunya* produziu o mesmo padrão de amplificação mostrado pelos cultivares Mesoamericanos (presença da banda de 1300 pb).

Esta semelhança entre o cultivar *Barbunya* e os cultivares Mesoamericanos também foi revelada pelo padrão de amplificação gerado por outros *primers*. Um deles, o *primer* OPD-19 (Figura 11), produziu uma banda intensa de aproximadamente 510 pb que estava presente apenas em cultivares Mesoamericanos e no cultivar *Barbunya*.



**Figura 10.** Eletroforese em gel de poliacrilamida à 6% dos produtos de amplificação obtidos do *primer* OPG-18. P - Padrão de DNA. A - (1) Sanilac; (2) Seafarer; (3) Brasil 2; (4) Rio Tibagi; (5) Jamapa; (6) Porrillo; (7) Ica Pijão; (8) Rojo de Seda; (9) Safira; (10) Mulatinho; (11) Carioca; (12) Rosinha G2; (13) Ipa 6; (14) Zamorano; (15) Michelite; (16) Small White; (17) Puebla 152; (18) Compuestro Negro. B - (19) Pinto; (20) Great Northern; (21) Red Mexican; (22) Flor de Mayo; (23) Garbancillo; (24) Apetito Blanco; (25) Pompadour; (26) Canario; (27) Diacol Calima; (28) Mayo Coba; (29) Antioquia 8; (30) Jalo; (31) Manteigão Fosco; (32) Cramberry; (33) Barbunya; (34) Overitos 7634; (35) Overitos 7635; (36) Mortino.



**Figura 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida à 6% dos produtos de amplificação obtidos do *primer* OPD-19. P - Padrão de DNA. P - Padrão de DNA. A - (1) Sanilac; (2) Seafarer; (3) Brasil 2; (4) Rio Tibagi; (5) Jamapa; (6) Porrillo; (7) Ica Pijão; (8) Rojo de Seda; (9) Safira; (10) Mulatinho; (11) Carioca; (12) Rosinha G2; (13) Ipa 6; (14) Zamorano; (15) Michelite; (16) Small White; (17) Puebla 152; (18) Compuestro Negro. B - (19) Pinto; (20) Great Northern; (21) Red Mexican; (22) Flor de Mayo; (23) Garbancillo; (24) Apetito Blanco; (25) Pompadour; (26) Canario; (27) Diacol Calima; (28) Mayo Coba; (29) Antioquia 8; (30) Jalo; (31) Manteigão Fosco; (32) Cramberry; (33) Barbunya; (34) Overitos 7634; (35) Overitos 7635; (36) Mortino.**

Esta análise da variação genética baseada em RAPD permitiu a determinação das distâncias genéticas entre cultivares, que foram utilizadas para a construção de um dendrograma (Figura 12).

A análise de *cluster* permitiu a separação dos cultivares avaliados em dois grupos distintos, de acordo com sua origem, com uma distância genética limite calculada de 30%. O primeiro grupo incluiu todos os cultivares de origem Mesoamericana, enquanto que o segundo grupo incluiu todos os cultivares Andinos, exceto Barbunya, que foi agrupado juntamente com os cultivares Mesoamericanos, confirmando os resultados anteriores obtidos por análise bioquímica.

Como mostrado na Figura 12, o nível de polimorfismo detectado entre cultivares Mesoamericanos foi maior em comparação com aquele detectado entre os cultivares Andinos.

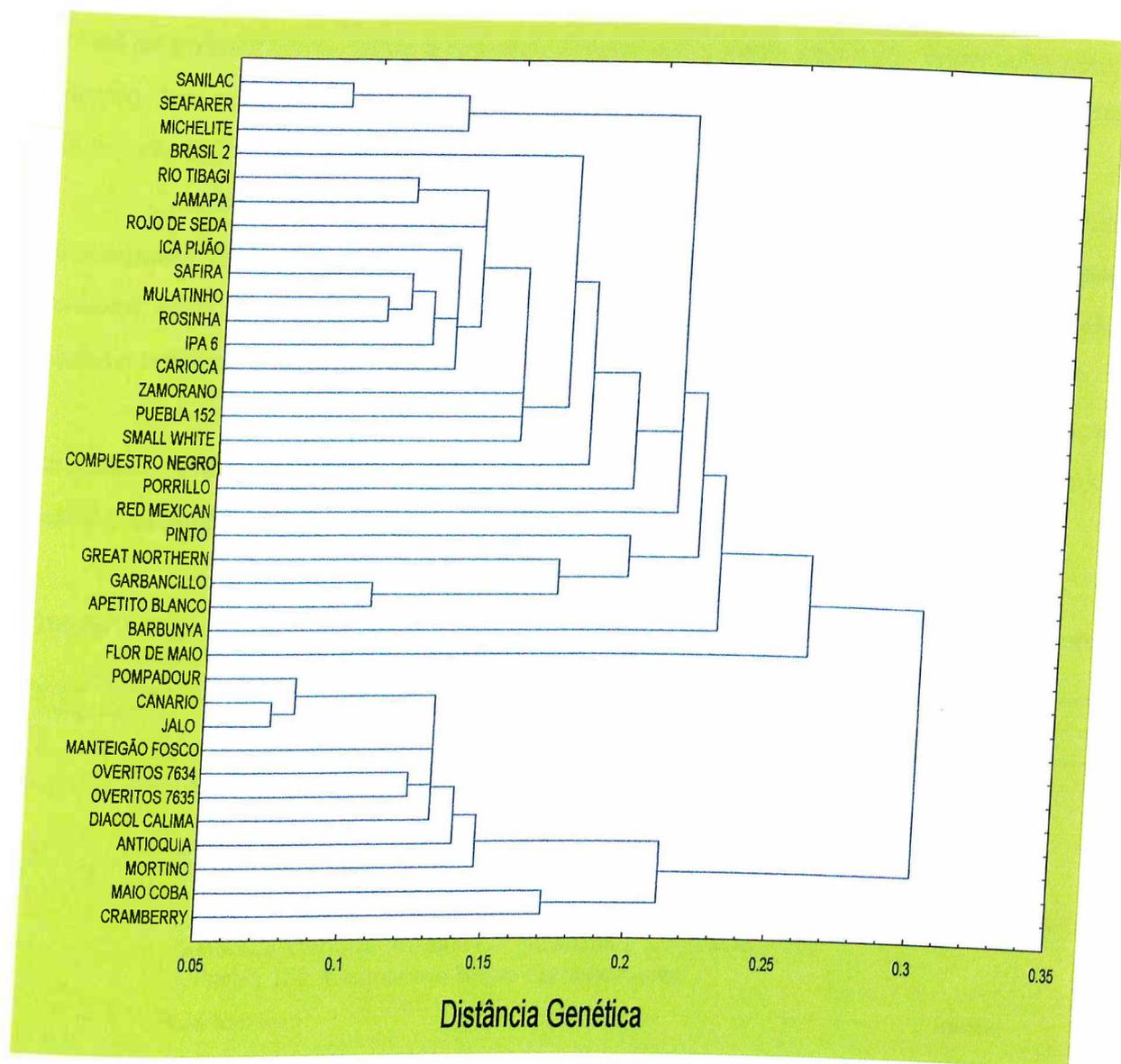
A divisão dos cultivares de feijoeiro em dois grupos distintos conforme a sua origem está de acordo com outros estudos baseados em análise de polimorfismo de DNA feitos anteriormente por Khairallah *et al.* (1992), Becerra Velásquez & Gepts (1994), Llaca *et al.* (1994), Haley *et al.* (1994) e Vasconcelos *et al.* (1996).

Estes autores também puderam identificar por meio das técnicas de RADP e RFLP dois grupos distintos de cultivares de feijoeiro, pertencentes aos *pools* gênicos Mesoamericano e Andino.

Entretanto, Haley *et al.* (1994) e Becerra Velásquez & Gepts (1994) detectaram em seus estudos um alto nível de polimorfismo entre genótipos de origem Mesoamericana e Andina, com uma distância genética calculada entre estes *pools* gênicos, para os dois casos, em torno de 80 a 85%. Considerando este nível de polimorfismo, Haley *et al.* (1994) sugeriram uma separação dos germoplasmas Mesoamericanos e Andinos em subespécies de *Phaseolus vulgaris*.

Esta hipótese no entanto não pode ser aceita considerando-se que a distância genética limite observada neste estudo entre cultivares Mesoamericanos e Andinos foi de 30%.

Além de permitir a separação dos cultivares nos *pools* gênicos Mesoamericano e Andino, os polimorfismos detectados possibilitaram a identificação de subgrupos de cultivares ou raças dentro de cada um destes *pools* gênicos.



**Figura 12.** Dendrograma representativo da divergência genética calculada a partir de RAPD entre os 36 cultivares de feijoeiro comum. Agrupamento feito pelo método de UPGMA, a partir da porcentagem de desacordo.

Considerando-se as distâncias genéticas calculadas entre 10 e 22% pôde-se distinguir os subgrupos dentro de cada *pool* gênico e entre 5 e 10 % pode-se separar os cultivares dentro de cada subgrupo. Este padrão de distribuição do polimorfismo onde o nível de polimorfismo segue a seguinte ordem: entre *pools* gênicos > entre subgrupos > dentro dos subgrupos foi o mesmo observado por Becerra Velásquez & Gepts (1994), Haley *et al.* (1994) e Vasconcelos *et al.* (1996).

Considerando-se uma distância genética limite de 23%, 3 sub-grupos puderam ser distinguidos entre os cultivares do grupo Mesoamericano: o primeiro representado pelo cultivar Flor de Mayo, o segundo pelo cultivar Barbunya e o último composto pelos demais cultivares. Entre os cultivares Andinos nenhum subgrupo pôde ser identificado.

Por outro lado, quando foi considerada uma distância genética limite de 20%, os cultivares Mesoamericanos puderam ser divididos em 6 subgrupos enquanto que os cultivares Andinos foram divididos em 2 subgrupos, como mostrado na Tabela 4.

**Tabela 4.** Agrupamento dos cultivares dentro dos *pools* gênicos Mesoamericano e Andino de acordo com a análise de RAPD, considerando uma distância genética limite de 20%.

Subgrupo	Cultivar	Tamanho da semente
<b>MESOAMERICANO</b>		
1	Sanilac, Seafarer, Michelite	pequena
2	Brasil 2, Jamapa, Porrillo, Rio Tibagi, Ica Pijão, Rojo de Seda, Zamorano, Carioca, Rosinha G2, Mulatinho, Small White, Ipa 6, Puebla 152, Compuestro Negro Chimaltenango	pequena ou média
3	Red Mexican	média
4	Pinto, Apetito Blanco, Great Northern, Garbancillo	média
5	Barbunya	média
6	Flor de Mayo	média
<b>ANDINO</b>		
7	Canario, Pompadour, Jalo, Manteigão Fosco, Antioquia 8, Diacol Calima, Overitos 7634, Overitos 7635, Mortino	média ou grande
8	Mayo Coba, Cramberry	média ou grande

Os padrões das proteínas avaliadas também tiveram suas bandas convertidas em dados de uma matriz de valores binários, onde (1) representava presença da banda e (0) ausência, da mesma forma que foi feito para produtos RAPD. Os dados desta matriz foram reunidos aos dados de RAPD, e a matriz final gerada foi utilizada para a análise de cluster. O dendrograma resultante desta análise é mostrado na Figura 13.

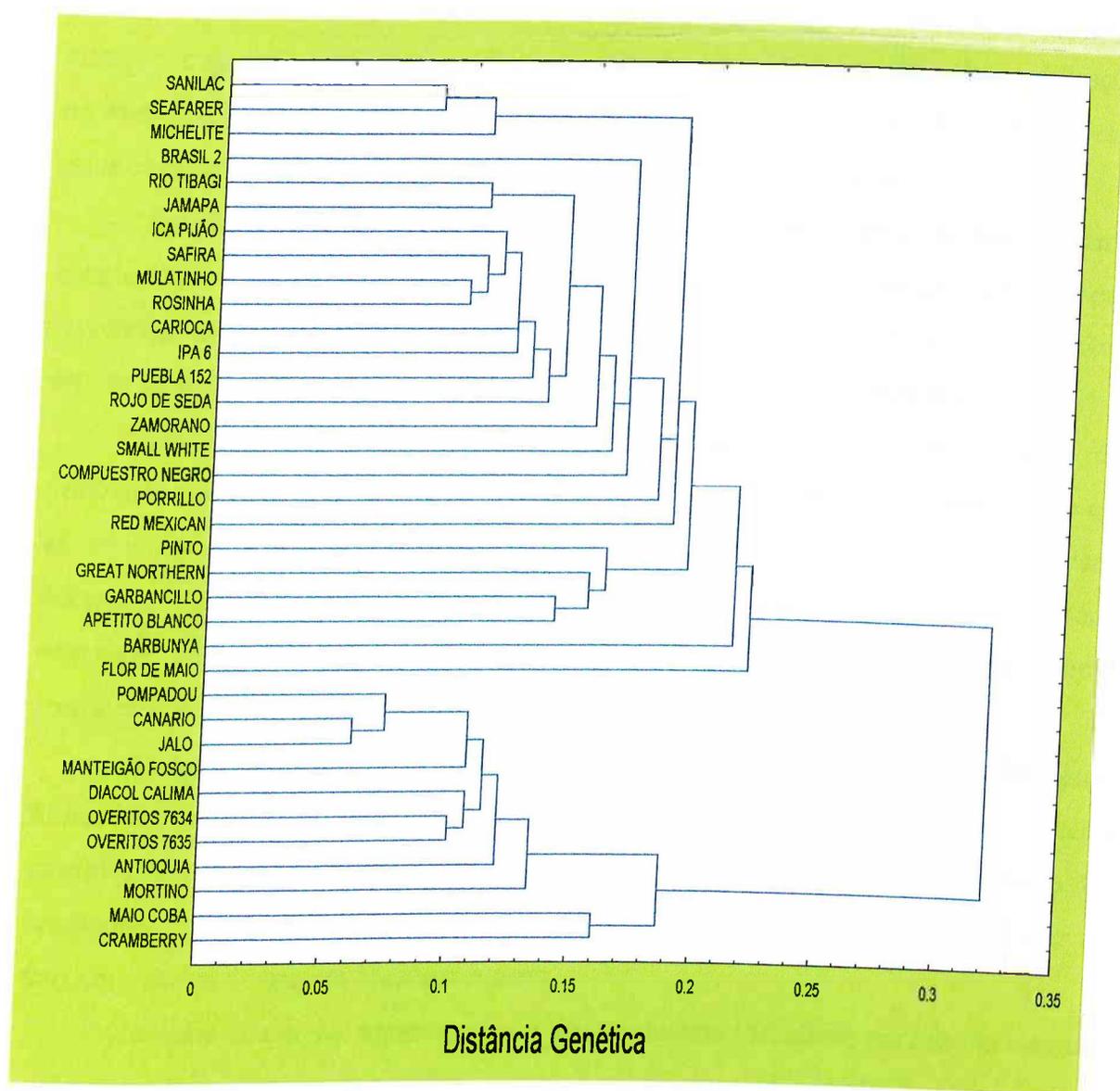
A inclusão dos dados da análise bioquímica levaram a uma redução nas distâncias genéticas entre os subgrupos dentro de cada *pool* gênico sem contudo alterar a forma de agrupamento dos cultivares e causaram um aumento da distância genética que separa estes dois pools gênicos.

A nova distância genética limite calculada para separação dos *pools* gênicos Mesoamericano e Andino foi de 32%, enquanto que a divisão dos cultivares Mesoamericanos em 6 subgrupos e dos Andinos em 2 subgrupos, considerou uma distância genética de 18%.

Este resultado demonstra que os marcadores bioquímicos são menos eficientes na detecção de polimorfismos entre indivíduos muito próximos geneticamente quando comparados aos marcadores moleculares. Isto sugere que, devido ao grande número de polimorfismos gerados por *primer* arbitrário, a análise RAPD seja uma técnica adequada para investigações das relações entre populações de uma mesma espécie, pois ela permite o estudo de um número muito maior de loci em comparação com outras técnicas, inclusive bioquímicas, os quais estão distribuídos por todo o genoma.

Como as características morfológicas são características fenotípicas, indivíduos podem se apresentar morfológicamente similares ainda que distantes geneticamente. Além disto, o complexo controle genético de muitas características morfológicas, devido ao número de genes envolvidos, presença de pleiotropia e epistasia e influência ambiental, frequentemente impedem a determinação precisa do genótipo envolvendo cada fenótipo, já que um mesmo genótipo pode resultar em vários fenótipos diferentes.

Por estes motivos acreditamos que em estudos de diversidade genética, determinados caracteres morfológicos quantitativos devem ser considerados com cautela.



**Figura 13.** Dendrograma representativo da divergência genética calculada a partir de RAPD e padrões de faseolina, Spa, Spb e lectina encontrados entre os 36 cultivares de feijoeiro comum. Agrupamento feito pelo método de UPGMA, a partir da porcentagem de desacordo.

Outro aspecto importante a se considerar em estudos de diversidade genética baseados em caracteres morfológicos feitos em cultivares ou linhagens é que estes são genótipos selecionados por apresentarem determinadas características morfológicas de interesse e que não tem efeito na discriminação de diversidade genética. As modificações na morfologia destes genótipos ocorreram devido à seleção de caracteres desejáveis e estes expresam apenas uma pequena parcela da variabilidade existente.

Estas observações sugerem que devido ao grande número de polimorfismos gerados por *primers* arbitrários, a análise RAPD seja uma técnica adequada para investigações das relações entre populações de uma mesma espécie, pois ela permite o estudo de um número muito maior de loci, distribuídos por todo o genoma.

Um estudo realizado recentemente por Cabral (1997) para avaliação das distâncias genéticas entre cultivares de algodoeiro por meio de RAPD, demonstrou que as relações descritas entre estes cultivares por análise morfológica eram bastante diferentes daquelas obtidas por análise molecular. Cultivares identificadas como próximas geneticamente em função de suas características morfológicas, foram consideradas as mais distantes pela análise de RAPD.

As análises bioquímica e molecular do cultivar Barbunya, sugerem que, da mesma forma que em algodoeiro, os estudos anteriores baseados em análise de caracteres morfológicos classificaram erroneamente este cultivar como sendo de origem Andina. Os resultados obtidos para este cultivar no presente estudo indicam que este possa ser de fato um cultivar de origem Mesoamericana.

Em vista dos dados apresentados e dos problemas discutidos em relação a alguns marcadores morfológicos quantitativos, uma nova proposta de divisão dos genótipos de feijoeiro dentro dos *pools* gênicos Mesoamericano e Andino pode ser sugerida, com base em dados das análises bioquímica e molecular obtidos neste estudo.

## 5. CONCLUSÕES

- A análise bioquímica dos padrões de faseolina, albumina, lectina, Spa, Spb, e molecular por RAPD, revelaram a existência de variabilidade entre os cultivares avaliados. A distribuição dos padrões eletroforéticos destas frações protéicas entre os cultivares permitiu a separação dos mesmos em dois grupos principais, conforme seu centro de origem: o Mesomamericano e o Andino.
- O nível de polimorfismo detectado por RAPD foi maior do que aquele encontrado por análise bioquímica. Esta técnica mostrou-se mais eficaz para detectar polimorfismo entre cultivares de mesma origem.
- Padrões específicos das frações protéicas analisadas foram encontrados para os *pools* gênicos Mesoamericano e Andino. Os padrões Lec6 e Alb5, Alb6 e Alb7 de lectina e albumina, respectivamente, foram específicos do *pool* gênico Andino enquanto que os outros tipos, tanto de lectina quanto de albumina, foram encontrados no *pool* gênico Mesoamericano.
- Novos padrões de faseolina, variantes do tipo "S" foram descritos: "Sr", "Si" e "Sa". Estes padrões foram identificados nos cultivares Rojo de Seda, Ipa 6 e Apetito Blanco, respectivamente.
- A análise de RAPD mostrou-se mais eficiente na detecção de polimorfismos entre cultivares do mesmo *pool* gênico, permitindo a separação destes em subgrupos dentro cada *pool* gênico.
- Dados obtidos pelas análises bioquímica e molecular, permitiram a separação dos cultivares Mesoamericanos e Andinos em 6 e 2 subgrupos, respectivamente, considerando-se uma distância genética limite de 18%. Estes resultados não

confirmam as divisões destes mesmos cultivares sugeridas por Singh (1989) e Singh *et al.* (1991c), com base em caracterização morfológica e bioquímica destes mesmos cultivares.

- Os dados obtidos neste estudo demonstram a necessidade de uma avaliação da diversidade genética existente entre os cultivares de feijoeiro de diferentes origens por meio de técnicas mais acuradas, uma vez que as classificações feitas com base em determinadas características morfológicas quantitativas, não permitem uma avaliação correta da diversidade genética devido à complexidade de seu controle genético e da grande influência do ambiente na expressão do fenótipo destas características.
- Os resultados encontrados pelas análises de RAPD e proteínas servem como base para uma proposta de uma nova divisão destes genótipos de feijoeiro dentro dos *pools* gênicos (Tabela 5).

**Tabela 5.** Agrupamento dos cultivares dentro dos *pools* gênicos Mesoamericano e Andino de acordo com as análises bioquímicas e de RAPD, considerando uma distância genética limite de 18%.

Subgrupo	Cultivar	Tamanho da semente	Padrão de Faseolina	Padrão de Albumina	Padrão de Lectina	Spa/Spb*	OPG18-1.3/ OPG18-1.0
<b>MESOAMERICANO</b>							
1	Sanilac, Seafarer, Michelite	pequena	S	Alb1	Lec1, Lec2	M/M	+/-
2	Brasil 2, Jamapa, Porrillo, Rio Tibagi, Ica Pijão, Rojo de Seda, Zamorano, Carioca, Rosinha G2, Mulatinho, Small White, Ipa 6, Puebla 152, Compuestro Negro Chimaltenango	pequena ou média	S, Sb, Si, Sr	Alb1, Alb2, Alb3	Lec1, Lec2, Lec3, Lec4	M/M I/I	+/-
3	Red Mexican	média	S	Alb1	Lec5	M/M	+/-
4	Pinto, Apetito Blanco, Great Northern, Garbancillo	média	S, Sa	Alb1, Alb3, Alb4	Lec2, Lec3	M/M	+/- -/-
5	Barbunya	média	Sb	Alb2	Lec2	M/M	+/-
6	Flor de Mayo	média	S	Alb3	Lec2	M/M	+/-
<b>ANDINO</b>							
7	Canario, Pompadour, Jalo, Manteigão Fosco, Antioquia 8, Diacol Calima, Overitos 7634, Overitos 7635, Mortino	média ou grande	T, C, H	Alb5, Alb6, Alb7	Lec2, Lec6	A/A	-/+ +/-
8	Mayo Cramberry	média ou grande	T	Alb5	Lec6	A/A	-/+

\* Spa/Spb-M=padrão Mesoamericano; A=padrão Andino; I=padrão intermediário

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, M. & McNEIL, D.L. 1996. Comparison of crossability, RAPD, SDS-PAGE and morphological markers for revealing gentic relationships within and among *Lens* species. **Theor. Appl. Genet.** **93**: 788-793.
- ALZATE-MARIN, A.L.; BAÍA, G.S.; FILHO, S.M.; JÚNIOR, T.J.P.; SEDIYAMA, C.S.; BARROS, E.G. & MOREIRA, M.A. 1996. Use of RAPD-PCR to identify true hybrid plants from crosses between closely related progenitors. **Rev. Brasil. Genet.** **19** (4): 621-623.
- BASSIRI, A. & ADAMS, M.W. 1978. Evaluation of common bean cultivar relationships by means of isozyme electrophoretic patterns. **Euphytica** **27**: 707-720.
- BECERRA VELÁSQUEZ, V.L. & GEPTS, P. 1994. RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in its centers of origin. **Genome** **37**: 256-263.
- BERGLUND-BRÜCHER, O. & BRÜCHER, H. 1976. The South American wild bean (*Phaseolus aborigineus* Burk.) as ancestor of the common bean. **Economic Botany** **30**: 273-280.
- BOLLINI, R. & CHRISPEELS, M.J. 1978. Characterization and subcellular localization of vicilin and phytohemagglutinin, the two major reserve proteins of *Phaseolus vulgaris* L. **Planta** **142**: 291-298.
- BRELLES-MARIÑO, G. & BOIARDI. 1992. Role of bean lectins in *Rhizobium phaseoli*-*Phaseolus vulgaris* interactions. Some properties of lectins from two bean cultivars. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** **8**: 573-578.

- BROWN, J.W.S.; MA, Y.; BLISS, F.A. & HALL, T.C. 1981. Genetic variation in the subunits of globulin-1 storage protein of French bean. **Theor. Appl. Genet.** **59**: 83-88.
- BROWN, J.W.S.; McFERSON, J.R.; BLISS, F.A. & HALL, T.C. 1982. Bean lectins. 1. Relationships between agglutinating activity and electrophoretic variation in the lectin-containing G2/albumin seed proteins of French Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theor. Appl. Genet.** **62**: 263-271.
- CABRAL, T.A.T. 1997. **Divergência genética entre genótipos de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) estimada por análise de marcadores RAPD.** Uberlândia, Universidade Federal de Uberlândia. 47p. (Tese, Mestrado).
- CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAM, B.J. & GRESSHOFF, P.M. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **BioTechnology** **9**: 553-557.
- CARVALHO, M.T.V. 1981. **Investigações bioquímicas sobre hemaglutininas e outras proteínas de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).** São Paulo, USP. 143p. (Tese, Doutorado).
- COPPENOLLE, B.V.; WATANABE, I.; HOVE, C.V.; SECOND, G. HUANG, N.; McCOUCH, S.R. 1993. Genetic diversity and phylogeny analysis of *Azolla* based on DNA amplification by arbitrary primers. **Genome** **36**: 686-693.
- DEBOUCK, D.G.; TORO, O.; PAREDES, O.M.; JOHNSON, W.C.; GEPTS, P. 1993. Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) in Northwestern South America. **Economic Botany** **47(4)**: 408-423.
- DEMEKE, T.; ADAMS, R.P. & CHIBBAR, R. 1992. Potencial taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in *Brassica*. **Theor. Appl. Genet.** **84**: 990-994.

- DEMEKE, T.; LYNCH, D.R.; KAWCHUK, L.M.; KOZUB, G.C. & ARMSTRONG, J.D. 1996. Genetic diversity of potato determined by random amplified polymorphic DNA analysis. **Plant Cell Reports** **15**: 662-667.
- DERBYSHIRE, E.; MÜLLER, H.P.; CARVALHO, M.T.V. & CROCOMO, O.J. 1981. Protein profiles of Brazilian beans (*Phaseolus vulgaris*) obtained by electrophoresis in slabs of polyacrylamide gel. **Energ. Nucl. Agric. (Piracicaba)** **3**: 100-109.
- DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D.J. & BOULTER, D. 1976. Legumin and vicilin storage proteins of legume seeds. **Phytochemistry** **15**: 3-24.
- ECHEVERRIGARAY, S.; CARVALHO, M.T.V.; POMPEU, A.S. & DERBYSHIRE, E. 1993. Affinity grouping of closely related lines of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) through comparative electrophoresis of seed proteins. **Rev. Brasil. Genet.** **16** (3): 759-771.
- ELLSWORTH, D.L.; RITTENHOUSE K.D. & HONEYCUTT, R.L. 1993. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. **BioTechniques** **14** (2): 214-217.
- EVANS, A.M. 1976. **Beans**. In: SIMMONDS, N.W. Evolution of crop plants. Longman, London. p. 168-172.
- FAIRBANKS, D.J.; WALDRIGUES, A.; RUAS, C.F.; RUAS, P.M.; MAUGHAN, P.J.; ROBISON, L.R.; ANDERSEN, W.R.; RIEDE, C.R.; PAULEY, C.S.; CAETANO, L.G.; ARANTES, O.M.N.; FUNGARO, M.H.P.; VIDOTTO, M.C. & JANKEVICIUS, S.E. 1993. Efficient characterization of biological diversity using field DNA extraction and random amplified polymorphic DNA markers. **Rev. Brasil. Genet.** **16**(1): 11-22.
- GENTRY, H.S. Origin of the Common Bean, *Phaseolus vulgaris*. 1969. **Economic Botany** **23**: 55-69.

- GEPTS, P. & BLISS, F.A. 1985. F1 hybrid weakness in the common bean. **The Journal of Heredity** 76: 447-450.
- GEPTS, P. & BLISS, F.A. 1986. Phaseolin variability among wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. **Economic Botany** 40(4): 469-478.
- GEPTS, P. & DEBOUCK, D. 1991. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: VAN SCHOONHOVEN, A. & VOYSEST, O. **Common beans: research for crop improvement**. CIAT. Cali, Colombia. p. 7-53.
- GEPTS, P. 1988. Phaseolin as an evolutionary marker. In: GEPTS, P. **Genetic Resources of *Phaseolus vulgaris* beans: their maintenance, domestication, evolution, and utilization**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. p. 215-341.
- GEPTS, P. 1990. Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (Fabaceae) beans. **Economic Botany** 44(3): 28-38.
- GEPTS, P.; OSBORN, T.C.; RASHKA, K. & BLISS, F.A. 1986. Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of common bean (*Phaseolus vulgaris*): Evidence for multiple centers of domestication. **Economic Botany** 40(4): 451-468.
- GRATTAPAGLIA, D.; CHAPARRO, J.; WILCOX, P.; McCORD, S.; WERNER, D.; AMERSON, H.; McKEAND, S.; BRIDGWATER, F.; WHETTEN, R.; O'MALLEY, D. & SEDEROFF, R. 1992. Mapping in woody plants with RAPD markers: application to breeding in forestry and horticulture. **Applications of RAPD Technology to Plant Breeding**. p. 37-40.
- HALEY, S.D.; MIKLAS, P.N.; AFANADOR, L. & KELLY, J.D. 1994. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker variability between and within gene pools of common bean. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 119(1): 122-125.

- HALL, T.C.; McLEESTER, R.C. & BLISS, F.A. 1977. Equal expression of the maternal e paternal alleles for the polypeptide subunits of the major storage protein of the *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Physiol.** **59**: 1122-1124.
- HALL, T.C.; SLIGHTOM, J.L., ERSLAND, D.R., MURRAY, M.G.; HOFFMAN, L.M., ADANG, M.J.; BROWN, J.W.S.; MA, Y.; MATTHEWS, J.A.; CRAMER, J.H.; BARKER, R.F.; SUTTON, D.W. & KEMP, J.D. 1983. Phaseolin: nucleotide sequence explains molecular weight and charge heterogeneity of a small multigene family and also assists vector construction for gene expression in alien tissue. In: CIFERRI, O. & DURE III, L. **Structure and function of plant genomes**. Plenum Publishing, New York. p. 123-143.
- HALWARD, T.M.; STALKER, H.T.; LARUE, E.A. & KOCHERT, G. 1991. Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted germplasm resources of cultivated peanut and related wild species. **Genome** **34**: 1013-1020.
- HARLAN, J.R. 1971. Agricultural origins: centers and noncenters. **Science** **174**: 468-474.
- HARTANA, A. 1983. **Genetic variability on seed protein levels associated with two phaseolin protein types in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Madison, University of Wisconsin. 49p. (Tese, Mestrado).
- HEUN, M.; MURPHY, J.P. & PHILLIPS, T.D. 1994. A comparison of RAPD and isozyme analyses for determining the genetic relationships among *Avena sterilis* L. accessions. **Theor. Appl. Genet.** **87**: 689-696.
- HU, J. & QUIROS, C.F. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. **Plant Cell Reports** **10**: 505-511.
- HUSSEIN, A.; RAMIREZ, H.; BUSHUK, W. & ROCZ, W. 1986. Field bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar identification by electrophoregrams of cotyledon storage proteins. **Euphytica** **35**: 665-679.

- JOHNSON, W.C.; MENÉNDEZ, C.; NODARI, R.; EPIMAKI, M.K.; KOINANGE, S.M.; SINGH, P.S. & GEPTS, P. 1996. Association of a seed weight factor with the phaseolin seed protein locus across genotypes, environments, and genomes in *Phaseolus-Vigna* spp.: Sax (1923) revisited. **Journal of Quantitative Trait Loci** 2: 127-135.
- KAMI, J.A. & GEPTS, P. 1994. Phaseolin nucleotide sequence diversity in *Phaseolus*. I. Intraspecific diversity in *Phaseolus vulgaris*. **Genome** 37: 751-757.
- KAPLAN, L. 1981. What is the origin of the common bean? **Economic Botany** 35(2): 240-254.
- KAZAN, K.; MANNERS, J.M. & CAMERON, D.F. 1992. Genetic relationship and variation in the *Stylosanthes guianensis* species complex assessed by random amplified polymorphic DNA. **Genome** 36: 43-49.
- KERNODLE, S.P.; CANNON, E. & SCANDALIOS, J.G. 1993. Concentration of primer and template qualitatively affects products in random-amplified polymorphic DNA PCR. **BioTechniques** 14 (3): 362-364.
- KHAIRALLAH, M.M.; SEARS, B.B. & ADAMS, M.W. 1992. Mitochondrial restriction fragment length polymorphisms in wild *Phaseolus vulgaris* L.: insights on the domestication of the common bean. **Theor. Appl. Genet.** 84: 915-922.
- KOENIG, R.L. & GEPTS, P. 1989. Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centers for genetic diversity. **Theor. Appl. Genet.** 78: 809-817.
- KOENIG, R.L.; SINGH, S.P.; GEPTS, P. 1990. Novel phaseolin types in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany** 44(1): 50-60.
- LADIZINSKI, G. & HYMOWITZ, T. 1979. Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies - review. **Theor. Appl. Genet.** 54: 145-151.

- LADIZINSKY, G. 1979. Species relationships in the genus *Lens* as indicated by seed proteins electrophoresis. **Bot. Gaz.** **140**: 449-451.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature** **227**: 680-685.
- LIQI, L. 1989. Variation of the storage protein phaseolin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from the Mediterranean area. **Euphytica** **44**: 151-155.
- LLACA, V.; SALINAS, A.D.; GEPTS, P. 1994. Chloroplast DNA as an evolutionary marker in the *Phaseolus vulgaris* complex. **Theor. Appl. Genet.** **88**: 646-652.
- MA, Y & BLISS, F.A. 1978. Seed proteins of common bean. **Crop Science** **18**: 431-437.
- MCLEESTER, R.C.; HALL, T.C. SUN, S.M. & BLISS, F.A. 1973. Comparison of globulin proteins from *Phaseolus vulgaris* with those from *Vicia faba*. **Phytochemistry** **2**: 85-93.
- MEUNIER, J.R. & GRIMONT, P.A.D. 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Res. Microbiol.** **144**: 373-379.
- MIRANDA COLIN, S. 1967. Origen de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol comun). **Agrociencia** **1**: 99-109.
- NODARI, K.O.; TSAI, S.M.; GILBERTSON, R.L. & GEPTS, P. 1993. Towards an integrated linkage map of common bean. II. Development of an RFLP-based linkage map. **Theor. Appl. Genet.** **85**: 513-520.
- OSBORN, T.C.; BROWN, J.W.S. & BLISS, F.A. 1985. Bean lectins. Quantitative genetic variation in seed lectins of *Phaseolus vulgaris* L. And its relationship to qualitative lectin variation. **Theor. Appl. Genet.** **70**: 22-31.

- PADHYE, V.W. & SALUNKLE, D.K. 1977. Biochemical studies on black gram (*Phaseolus mungo*): I. Solubilization and electrophoretic characterization of the proteins. **Journal of Food Biochemistry** **1**: 111-129.
- PETERSEN, G.; JOHANSEN, B. & SEBERG, O. 1996. PCR and sequencing from a single pollen grain. **Plant Molecular Biology** **31**: 189-191.
- POPESCU, O. 1983. A simple method for drying polyacrilamide slabs gels using glycerol and gelatin. **Electrophoresis** **4**: 432-435.
- PRZYBYLSKA, J. & ZIMNIAK- PRZYBYLSKA. 1993. Electrophoretic seed albumin patterns in the cultivated *Phaseolus* species: albumin variants with trypsin inhibitory activity. **Genetica Polonica** **34(1)**: 15-25.
- PUTERKA, G.J.; BLACK IV, W.C.; STEINER, W.M. & BURTON, R.L. 1993. Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. **Heredity** **70**: 604-618.
- RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. **Trends in Genetics** **9(8)**: 275-280.
- RAYAS-DUARTE, P.; BERGERON, D. & NIELSEN, S.S. 1992. Screening of heat-stable trypsin inhibitors in dry beans and their partial purification from Great Northern beans (*Phaseolus vulgaris*) using anhydrotrypsin-sepharose affinity chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **40(1)**: 32-42.
- RODRIGUEZ, M.S. & MENDOZA, E.M.T. 1989. Isolation characterization of soluble proteins from rice bean (*Vigna umbellata*). In: MENDOZA, E.M.T. 1989. Biochemical and nutritional studies of Philippine indigenous food and forage legums. Terminal report. **Institute of Plant Breeding**. College, Laguna. Ago p. 131-154.

- ROMERO, J.; SUN, S.M.; McLEESTER, R.C.; BLISS, F.A. & HALL, T.C. 1975. Heritable variation in a polypeptide subunit of the major storage protein of the bean, *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Physiol.** **56**: 776-779.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Vol. 3. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. E5-E7.
- SCHIERWATER, B. & ENDER, A. 1993. Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. **Nucleic Acids Research** **21** (19): 4647-4648.
- SCHIERWATER, B. 1995. Arbitrarily amplified DNA in systematics and phylogenetics. **Electrophoresis** **16**: 1643-1647.
- SGARBIERI, V.C. & GALEAZZI, M.A.M. 1990. Quantification and some chemical and biochemical characterization of nitrogenous substance from varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Food Biochemistry** **14**(3): 219-232.
- SHIH, C.T.; MOK, M.C.; TEMPLE, S.R. & MOK, D.W.S. 1980. Expression of developmental abnormalities in hybrids of *Phaseolus vulgaris* L.: interaction between temperature and allelic dosage. **J. Hered.** **71**(4): 218-222.
- SIGMON, J. & LARCOM, L.L. 1996. The effect of ethidium bromide on mobility of DNA fragments in agarose gel electrophoresis. **Electrophoresis** **17**: 1524-1527.
- SILVERTOWN, J.W. 1982. **Introduction to plant population ecology**. Longman, London, England. 209 p.
- SINGH, S.P. & GUTIÉRREZ, A. 1984. Geographical distribution of the DL1 and DL2 genes causing hybrid dwarfism in *Phaseolus vulgaris* L., their association with seed size, and their significance to breeding. **Euphytica** **33**: 337-345.
- SINGH, S.P. 1989. Patterns of variation in cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany** **43**(1): 39-57.

- SINGH, S.P. 1991. Breeding for seed yield. *In*: VAN SCHOONHOVEN, A. & VOYEST, O. **Common beans: research for crop improvement**. CIAT, Cali, Colombia. p. 383-443.
- SINGH, S.P.; GEPTS, P. & DEBOUCK, D.G. 1991c. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany** 45(3): 369-396.
- SINGH, S.P.; GUTIÉRREZ, J.A.; MOLINA, A.; URREA, C. & GEPTS, P. 1991b. Genetic diversity in cultivated common bean: II. Marker-based analysis of morphological and agronomic traits. **Crop Science** 31: 23-29.
- SINGH, S.P.; NODARI, R. & GEPTS, P. 1991a. Genetic diversity in cultivated common bean: I. Allozymes. **Crop Science** 31: 19-23.
- SLIGHTOM, J.L.; DRONG, R.F.; KLASSY, R.C.; HOFFMAN, L.M. 1985. Nucleotide sequences from phaseolin cDNA clones: the major storage protein from *Phaseolus vulgaris* are encoded by two unique gene families. **Nucleic Acids Research** 13(18): 6483-6498.
- STILES, J.I.; LEMME, C.; SONDUR, S.; MORSHIDI, M.B. & MANSCHARDT, R. 1993. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. **Theor. Appl. Genet.** 85: 697-701.
- SUN, S.M.; SLIGHTOM, J.L. & HALL, T.C. 1981. Intervening sequences in a plant gene - comparison of the partial sequences of cDNA and genomic DNA of french bean phaseolin. **Nature** 289: 37-41.
- TALBOT, D.R.; ADANG, M.J.; SLIGHTOM, J.L.; HALL, T.C. 1984. Size and organization of a multigene family encoding phaseolin, the major seed storage protein of *Phaseolus vulgaris* L. **Mol. Gen. Genet.** 198: 42-49.
- TANKSLEY, S.D.; YOUNG, N.D.; PATERSON, A.H. & BONIERBALE, M.W. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Biotechnology** 7: 257-264.

- TINGEY, S.V.; RAFALSKI, J.A. & WILLIAMS, J.G.K. 1992. Genetic analysis with RAPD markers. **Applications of RAPD Technology to Plant Breeding**. p. 3-8.
- TOHME, J.; GONZALEZ, D.O.; BEEBE, S. & DUQUE, M.C. 1996. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. **Crop. Science** **36**: 1375-1384.
- TOMOOKA, N.; LAIRUNGREANG, C.; NAKEERAKS, P. EGAWA, Y. & THAVARASOOK, C. 1992. Center of genetic diversity and dissemination pathways in mung bean deduced from seed protein electrophoresis. **Theor. Appl. Genet.** **83(3)**: 289-293.
- VALENTINI, A.; TIMPERIO, A.M.; CAPPUCCIO, I. & ZOLLA, L. 1996. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) interpretation requires a sensitive method for the detection of amplified DNA. **Electrophoresis** **17**: 1553-1554.
- VALLEJOS, C.E. & CHASE, C.D. 1991. Linkage between isozyme markers and a locus affecting seed size in *Phaseolus vulgaris* L. **Theor. Appl. Genet.** **81**: 413-419.
- VASCONCELOS, M.J.V.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. & VIEIRA, C. 1996. Genetic diversity of the common bean *Phaseolus vulgaris* L. determined by DNA-based molecular markers. **Rev. Brasil. Genet.** **19 (3)**: 447-451.
- VILARINHOS, A. D.; BARROS, E.G.; PAIVA, E.; SEDIYAMA, C.S. & MOREIRA, M.A. 1994. Use of the random amplified polymorphic DNA technique to characterize soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) genotypes. **Rev. Bras. Genet.** **17**: 287-290.
- WEEDEN, N.F.; TIMMERMAN, G.M.; HEMMAT, M.; KNEEN, B.E. & LODHI, M.A. 1992. Inheritance and reliability of RAPD markers. **Applications of RAPD Technology to Plant Breeding**. p. 12-17.
- WELLS, W.C.; ISOM, W.H.; WAINES, J.G. 1988. Outcrossing rates of six common bean lines. **Crop Science** **28**: 177-178.

- WELSH, J. & McCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* **18(24)**: 7213-7218.
- WILKIE, S.E.; ISAAC, P.G. & SLATER, R.J. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theor. Appl. Genet.* **86**: 497-504.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18 (22)**: 6531-6535.
- YOUNG, R.A. & KELLY, J.D. 1996. RAPD markers flanking the are gene for anthracnose resistance in common bean. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **121(1)**: 37-41.
- ZIMNIAK-PRZYBYLSKA, Z. & PRZYBYLSKA, J. 1994. Electrophoretic seed albumin patterns in wild and cultivated forms of *Phaseolus vulgaris* L. *Genetica Polonica* **35(3)**: 171-182.