

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

TAMARA PEREIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA PARA O CENTRO DE ORIGEM E O TEOR
DE NUTRIENTES DOS GRÃOS DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências
Agroveterinárias da Universidade do Estado de
Santa Catarina, para obtenção do título de
Mestre em Produção Vegetal

Orientador: Dr. Cileide Maria M. Coelho

Co-orientador: Dr. Salete Aparecida Gaziola

LAGES – SC

2008

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Pereira, Tamara

Diversidade genética para o centro de origem e o teor
de nutrientes dos grãos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) /
Tamara Pereira. – Lages, 2008.

72 p.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências
Agroveterinárias / UDESC.

1.Feijão. 2. Proteínas. 3. Fósforo. 4. Micronutrientes.

I.Título.

CDD – 635.652

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

TAMARA PEREIRA

Engenheira Agrônoma

**DIVERSIDADE GENÉTICA PARA O CENTRO DE ORIGEM E O TEOR
DE NUTRIENTES DOS GRÃOS DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovado em:
Pela Banca Examinadora:

Homologado em:

Dr. CILEIDE MARIA M. COELHO
Orientadora – UDESC/Lages – SC

Dr. RICARDO TREZZI CASA
Coordenador do Programa de
Mestrado em Produção Vegetal
UDESC/ Lages – SC

Dr. SALETE APARECIDA GAZIOLA
Co - orientadora – ESALQ/Piracicaba – SP

Dr. OSMAR KLAUBERG FILHO
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Ciências Agrárias
UDESC/ Lages – SC

Dr. JULIO CESAR PIRES SANTOS
UDESC/Lages – SC

ADIL KNACKFUSS VAZ, PhD
Diretor Geral do Centro de Ciências
Agroveterinárias
UDESC/Lages – SC

Dr. CLOVIS ARRUDA DE SOUZA
UDESC/Lages – SC

LAGES
Santa Catarina – Brasil
2008

A minha mãe e meu pai, por tudo que tem me proporcionado, com carinho!

A meu namorado Felipe e minha sogra Cleusa, pelo companheirismo nas horas mais difíceis!

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, por estar sempre comigo, me guiando e me orientando sem que eu perceba.

Gostaria de agradecer aos meus pais **Idete** e **Osvy**, por nunca terem medido esforços para que eu pudesse concretizar meus objetivos. Aos meus irmãos Anderson, Andresa e Taíse, cunhado (a) Janaina e Giovane e meu querido sobrinho Gabryel por terem me acompanhado mesmo estando longe, por estar sempre torcendo por mais esta conquista.

A minha querida sogra **Cleusa** que me adotou como filha, pelo acolhimento, carinho, apoio e estímulo para “sempre continuar”. Obrigada!

Agradeço a todos os alunos e bolsistas de iniciação científica: Carol, Ina, Jana, Dai, Gilberto, Murilo, Márcio, Dênis, Leonardo, Gabriela, Marília, Thalita e ao mestrando Luiz, pelo auxílio inestimável nas análises de laboratório, pelas conversas, risadas e desabafos.

Agradeço também a estagiária Jaqueline, que nos últimos meses foi meu braço-direito. Obrigada por ter estado presente nestes momentos, inclusive quando eu não estava lá.

Ao meu namorado **Felipe**, por todos os momentos desta etapa, pelo seu apoio e compreensão nos momentos de ausência.

A minha orientadora, **Prof^a Cileide Maria Medeiros Coelho**, deixo meu agradecimento especial. Pois mesmo sem me conhecer, acreditou em meu potencial para desenvolver a pesquisa. Teve paciência em me ensinar inúmeras técnicas, me auxiliou na

escrita de artigos em inglês, não me deixou desanimar quando algo dava errado. Por seu enorme carinho e compreensão, pelos ensinamentos passados e principalmente por ela ter sido muito além de minha orientadora, uma grande **AMIGA**. Também agradeço ao seu marido Clovis, Camile e dona Vanda pelo apoio.

Agradeço aos amigos que tive a felicidade de conhecer durante o mestrado: Carla, Orozimbo, Ayan, Cíntia, Alinne, Solange, Diorvania e André. Os quais me proporcionaram horas de distração, divertimento, alegrias, estudo, que me deram conselhos e me apoiaram nos momentos difíceis, e estavam sempre presentes.

À minha amiga **Carla**, um agradecimento especial pelas alegrias, pelo choro, estudos, jornadas de laboratório, lanches, pelo apoio e pela palavra amiga nas horas de desânimo, por todos os momentos que passamos juntas. Valeu parceira!

Agradeço a todos os meus amigos: Rodrigo, Fabrício, Tatiana Pagani, Tati, Elaine, Juliano, Amanda, Biffi, Nayana, Ana, Alethéia, Danuza, Adriano, Jaque, Aldry pelos churrasquinhos, almoços, conversas, incentivo, caronas. Obrigada galera!

Agradeço aos funcionários Fátima, Leandro, Fernando, Cláudia, Alcir, Pipoca e Kelin por serem sempre prestativos e compreensivos.

Aos professores do curso de mestrado em Produção Vegetal, Prof. Altamir, Adelar, David e Rose e Ciência do Solo Prof. Jaime, Julio, Paulo pela contribuição, colaboração e disponibilidade de uso dos laboratórios.

A Dra. **Salete** Aparecida Gaziola (ESALQ/USP), pela parceria no trabalho de mestrado, pela atenção e apoio disponibilizados.

As minhas amigas Carolina Maluche, Jaqueline B. e Alinne por me ajudaram nos momentos finais da entrega da dissertação, pelo companheirismo, disponibilidade e principalmente amizade nestes momentos difíceis.

A Dra. Heloisa Torres da Silva (EMBRAPA-CNPAF) pela disponibilização de genótipos controles, utilizados no trabalho.

A todos os participantes da banca pela disponibilidade.

A UDESC pela concessão da bolsa e oportunidade de realização do curso de graduação e mestrado.

Meus mais sinceros agradecimentos a todos que de qualquer forma torceram e contribuíram para a conclusão do mestrado. **OBRIGADOOOO!**

“Paciência e perseverança têm o efeito mágico de fazer as dificuldades desaparecerem e os obstáculos sumirem”.

John Quincy Adams

RESUMO

Um total de 112 genótipos provenientes do Banco Ativo de Feijão (BAF) do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) foi analisado, com o objetivo de caracterizar a diversidade protéica do feijão em relação ao perfil total das proteínas de reserva (SDS-PAGE) e quanto ao centro de origem (tipos de faseolina), teor de proteína total e solúvel e morfologia da semente. A partir desta caracterização selecionou-se 34 genótipos para avaliações do conteúdo de nutrientes nos grãos: cálcio, magnésio, ferro, fósforo total, fitato, zinco, potássio, proteína total e solúvel, em duas safras 2005/2006 e 2006/2007. As avaliações bioquímicas e morfológicas da semente indicaram que os 112 genótipos de feijão em sua maioria coletados em Santa Catarina foram provenientes de dois centros de origem: Mesoamericano e Andino. O tipo de faseolina “S” foi o mais encontrado (58%) e foi representado por sementes pequenas; o tipo de faseolina “T” representou 38,3% dos genótipos do banco e caracterizou-se por sementes grandes. O peso de 100 sementes associado ao tipo de faseolina foram as características que melhor separaram os centros de origem. Através da análise de correspondência realizada para o perfil total das proteínas de reserva dos grãos observou uma grande diversidade de proteínas, e estas foram associadas a determinados grupos de genótipos de acordo com suas frequências. Observou-se uma baixa associação das faseolinas em todos os grupos e alta relação com grupos de proteínas de baixo peso molecular (14-26 KDa) e médio à alto peso molecular (55-184 KDa). Para o teor de nutrientes nos grãos, observaram-se genótipos que se destacaram em determinadas concentrações de nutriente nos grãos, por exemplo, o BAF 36 alto teor de ferro ($161,68 \text{ mg.kg}^{-1}$), BAF 108 destacou-se com altos teores de ferro, zinco, proteína total e fósforo: 124 mg.kg^{-1} , 68 mg.kg^{-1} , $246,09 \text{ g.kg}^{-1}$ e $5,34 \text{ g.kg}^{-1}$, respectivamente, e apresentou baixos teores de fitato ($4,3 \text{ g.kg}^{-1}$), o que enfatiza o uso destes genótipos para consumo. A ampla diversidade constatada nos genótipos do BAF pode ser usada como suporte para futuros estudos, como incorporação de genótipos em programas de melhoramento e metabolismo bioquímico e fisiológico para entender os mecanismos envolvidos no acúmulo destes nutrientes nos grãos. Esta diversidade encontrada no trabalho é importante e deve ser preservada junto ao agricultor.

Palavras chave: Feijão. Proteínas. Fósforo. Micronutrientes.

ABSTRACT

A collection of 112 common bean genotypes from Banco Ativo de Feijão (BAF) from Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) were analyzed with the objective of characterize the proteic diversity of the common bean in relation to the profile of total storage proteins (SDS-PAGE), as well as the center of origin (phaseolin types), total and soluble content protein and morphology of the seed. From this characterization were selected 34 genotypes for evaluations of the content of the nutrients in the grains: calcium, magnesium, iron, total phosphorus, phytate, zinc, potassium, total and soluble protein, in two growing seasons (2005/2006 and 2006/2007). The biochemical and morphological evaluation of the seed indicated that the 112 genotypes of common bean, mostly collected in Santa Catarina, were derived from two centers of origin: Mesoamerican and Andean. The phaseolin type "S" was the most found (58%), represented by small seeds, and the phaseolin type "T" showed 38.3% of the genotypes of the bank and were characterized like large seeds. The 100 seeds weight associated with the type phaseolin were the characteristics that best separated the centers of origin. Through the analysis of correspondence performed to profile of total storage proteins of grains, was observed a great diversity of proteins, and these were associated with certain groups of genotypes according to their frequencies. There was a low phaseolin association to the all groups, and a high association with groups of low weight molecular proteins (14-26 KDa) and medium to high molecular weight (55-184 KDa). In relation to the nutrients content of the grains, was observed genotypes that were highlighted in determined concentrations of nutrient in the grains. The BAF 36 presented high iron content ($161.68 \text{ mg.kg}^{-1}$), and the BAF 108 with high contents of iron, zinc, protein and total phosphorus (124 mg.kg^{-1} , 68 mg.kg^{-1} , 246.09 g.kg^{-1} and 5.34 g.kg^{-1} respectively), and showed low content of phytate (4.3 g.kg^{-1}), which emphasizes the use of these genotypes for the consumption. The large diversity evidenced in the genotypes from this BAF can be used in future studies of incorporation in breeding programs, biochemical and physiological metabolism, and the knowledge of the mechanisms involved in the accumulation of these nutrients in the grain. The diversity encountered in this study is important and has to be preserved close to the agriculturist.

Keywords: Bean. Proteins. Phosphorus. Micronutrients.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01** - Classificação do formato da semente baseada na relação entre comprimento/espessura (coeficiente J)..... 29
- Tabela 02** - Classificação do grau de achatamento da semente baseado na relação largura/espessura (coeficiente H).....29
- Tabela 03** - Identificação, origem da coleção, tipo de faseolina, peso de 100 sementes, proteína total e solúvel dos 112 genótipos da safra 2005/06 do BAF, UDESC, Lages..... 40
- Tabela 04** - Importância relativa dos caracteres analisados com base na divergência genética (D^2) para os 112 genótipos de feijão da safra 2005/06, BAF, UDESC, Lages...43
- Tabela 05** - Agrupamento para os 112 genótipos de feijão baseado no peso de 100 sementes, classes comerciais, tipo de faseolina, coeficiente de J e H, na safra 2005/06 do BAF, UDESC, Lages..... 44
- Tabela 06** - Morfologia da semente dos 112 genótipos de feijão e sua relação com o grupo Andino e Mesoamericano, da safra 2005/06 do BAF, UDESC, Lages..... 46
- Tabela 07** - Teor de ferro, zinco (mg.kg^{-1}) e cálcio, magnésio e potássio (g.kg^{-1}) em grãos de feijão na safra (1) 2005/06 e safra (2) 2006/07, referente a 34 genótipos do BAF, UDESC, Lages..... 55
- Tabela 08** - Teor de fósforo, fitato, proteína total e proteína solúvel (g.kg^{-1}) em grãos de feijão na safra (1) 2005/06 e safra (2) 2006/07, referente a 34 genótipos do BAF, UDESC, Lages..... 56

Tabela 09 - Importância relativa dos caracteres analisados com base na divergência genética (D^2) para 34 genótipos de feijão, nas safras 1 (2005/06) e 2 (2006/07), do BAF, UDESC, Lages..... 57

Tabela 10 - Agrupamento com padrões de comportamento similares pelo método de Tocher, com base em 9 características avaliadas em 34 genótipos de feijão referente à safra 1 (2005/06) e 2 (2006/07), utilizando-se a distância generalizada de Mahalanobis (D^2), do BAF, UDESC, Lages.....57

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** - Classificação quanto aos tipos comerciais: manteigão (1), branco (2), mulatinho (3), preto (4), colorido (5), amarelo (6), vermelho (7) e carioca (8).....30
- Figura 02** - Gel de poliacrilamida SDS-PAGE (10 µg de proteína, 15%), corado com nitrato de prata, onde PM= padrão de peso molecular (45-200 KDa), contendo o perfil representativo dos tipos de faseolina (S, T, H, B, C) em alguns genótipos (Bafs: 113,116,117,118,119,61,115,57,110,28 e 48), UDESC, Lages.....39
- Figura 03** - Percentual das classes comerciais (amarelo, manteigão, mulatinho, colorido, vermelho, preto, carioca e branco) nos grupos Andino e Mesoamericano, da safra 2005/06 do BAF, UDESC, Lages..... 46
- Figura 04** - Diversidade de cor e tamanho de genótipos representativos do banco ativo de feijão (BAF), com seus agrupamentos (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e K), da safra 2005/06, UDESC, Lages.....47
- Figura 05** - Gel de poliacrilamida SDS-PAGE, com 20 µg de proteína, numa concentração de 15%, mostrando o perfil das proteínas de reserva de genótipos de feijão (BAFs: 113, 117, 81, 85, 38, 67, 34, 77, 83 e 09), onde a coluna P = padrão de peso molecular (6,5 a 200 KDa), da safra 2005/06, BAF, UDESC, Lages.....48
- Figura 06** - Relação entre os eixos (dimensões) 1 e 2 da análise de correspondência (AC), baseado as faixas representativas dos pesos moleculares do perfil total das proteínas de reserva dos grãos de 112 genótipos da safra 2005/06 do BAF, UDESC, Lages..... 50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 DIVERSIDADE GENÉTICA DA CULTURA DO FEIJÃO.....	18
2.1.1 Bancos de germoplasma.....	18
2.1.2 Marcadores morfológicos e bioquímicos.....	19
2.2 ORIGEM E EVOLUÇÃO DO FEIJÃO.....	21
2.3 DIVERSIDADE QUANTO AOS TEORES DE NUTRIENTES NOS GRÃOS.....	23
2.4 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E SOCIAL	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	27
3.2 AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS DA SEMENTE.....	28
3.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE RESERVA DOS GRÃOS.....	30
3.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURANTE (SDS-PAGE).....	31
3.5 COLORAÇÃO DOS GÉIS COM NITRATO DE PRATA.....	31
3.6 COLORAÇÃO DOS GÉIS COM COMASSIE BRILLIANT BLUE R 250.....	32
3.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS DA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURANTE (SDS-PAGE).....	32

3.8 DETERMINAÇÃO DOS NUTRIENTES NOS GRÃOS.....	32
3.8.1 Teor de proteína total dos grãos.....	33
3.8.2 Teor de potássio (K).....	34
3.8.3 Teores de cálcio (Ca) e magnésio (Mg).....	34
3.8.4 Teores de ferro (Fe) e zinco (Zn).....	35
3.8.5 Teor de fósforo total.....	35
3.8.6 Teor de ácido fítico.....	35
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 CENTRO DE ORIGEM DO FEIJOEIRO.....	38
4.2 DIVERSIDADE PARA O PERFIL TOTAL DAS PROTEÍNAS DE RESERVA.....	47
4.3 DIVERSIDADE DE NUTRIENTES NOS GRÃOS DE FEIJÃO.....	51
5 CONCLUSÕES.....	58
6 PERSPECTIVAS E APLICAÇÕES.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ANEXOS	70

1 INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das culturas mais difundidas no mundo, representando metade dos grãos de leguminosas consumidos, sendo uma das principais fontes calórico-protéicas para cerca de 800 milhões de pessoas, predominando em regiões menos desenvolvidas do mundo como países da América Latina e África (BROUGHTON *et al.*, 2003). Neste contexto, o Brasil representa a maior produção de feijão, com aproximadamente três milhões de toneladas por ano e um consumo de 17,5 kg/habitante/ano (WANDER, 2007).

Vários estudos bioquímicos baseados em análise eletroforética de proteínas de sementes levaram a identificação de diversos tipos de proteínas. Segundo Osborn (1988), as maiores frações de proteínas em feijão são as lectinas, arcelinas e faseolinas. As arcelinas segundo literatura estão intimamente associadas à resistência a insetos de armazenamento (brucídeos), e são principalmente encontradas em feijões selvagens (OSBORN *et al.*, 1986). Já, as lectinas, apesar de suas propriedades fitohemaglutininas, a maioria de suas funções é desconhecida, mas acredita-se que tenham ligação com mecanismos de defesa da planta contra o ataque de fungos (SILVA & SILVA, 1976).

As faseolinas representam a maior fração protéica de reserva do feijão (MA & BLISS, 1978), e baseando-se no perfil dos tipos de faseolina se determina o centro de origem do feijoeiro (GEPTS *et al.*, 1986).

Dados recentes confirmam que o feijão é originário de múltiplos centros de domesticação no continente Americano. Evidências arqueológicas, morfológicas, bioquímicas e moleculares sugerem dois centros de origem de feijão comum, o centro Andino e Mesoamericano, no qual são confirmados através de marcadores morfológicos da semente (DE LA CRUZ *et al.*, 2005; GEPTS *et al.*, 1986), marcadores morfológicos da planta e da semente (SINGH *et al.*, 1991a) marcadores de isoenzimas (SANTALLA *et al.*, 2004; KOENIG & GEPTS, 1989) marcadores bioquímicos, através do padrão de faseolina (SOLANO, 2005; MACIEL *et al.*, 1999; PEREIRA & SOUZA, 1992; GEPTS *et al.*, 1986); marcadores moleculares através de RFLP (CHACÓN *et al.*, 2005); AFLP (MACIEL *et al.*, 2003), RAPD (BEEBE *et al.*, 2000b), ISSR (DE LA CRUZ *et al.*, 2005).

Os dois centros primários localizados na América Central apresentam cultivares que exibem predominantemente faseolina “S”, sementes pequenas (<25 g/100 sementes) e dos Andes, cultivares com predominância do tipo de faseolina “T”, sementes grandes (>40 g/100 sementes) (SINGH *et al.*, 1991a). Particularmente, a expressão do fenótipo da faseolina não é influenciada pelo ambiente (BROWN *et al.*, 1981). Além disso, a herdabilidade da faseolina em sementes pode alcançar valores de 0,8 – 0,9 (VAN SCHOONHOVEN & VOYSEST, 1991) por isso o marcador de faseolina é uma ferramenta com potencial para ser utilizado em trabalhos de diversidade genética e fluxo gênico em feijões domesticados e selvagens.

Além da relação do tipo de faseolina “T” com o centro de origem Andino, é citado na literatura que os maiores teores de metionina estão no centro Andino. Este resultado indica a possibilidade de encontrar genótipos com maior teores de aminoácidos sulfurados, o qual é um aminoácido essencial na dieta humana e naturalmente encontrado em baixa concentração em feijão (GEPTS *et al.*, 1988). Assim a caracterização, e o conhecimento da diversidade genética das proteínas de reserva do feijão, podem fornecer informações importantes para identificação de genótipos que contenham proteínas de interesse tanto agrônomo, quanto nutricional.

O feijão representa um excelente alimento, fornecendo proteínas, carboidratos, ferro, cálcio, magnésio, zinco, fibras e vitaminas essenciais à dieta humana (BROUGHTON *et al.*, 2003; SGARBIERI, 1989). Apesar de apresentar altos teores de proteína, o feijão possui um baixo valor nutritivo quando utilizado como única fonte protéica, entretanto, quando combinado com cereais como o arroz e o milho, forma uma mistura nutritiva. O feijão é pobre em aminoácidos sulfurados, e rico em lisina, enquanto que o arroz, por exemplo, é pobre em lisina e relativamente rico em aminoácidos sulfurados (BROUGHTON *et al.*, 2003; SATHE, 2002; VAN SCHOONHOVEN & VOYSEST, 1991; SGARBIERI, 1989).

Devido à necessidade da melhoria da qualidade nutricional de grãos de feijão, o qual é base na alimentação humana, principalmente para a população de baixa renda, tem-se a necessidade de determinação da composição química destes grãos e suas inter-relações com antinutrientes. Segundo a literatura os teores de nutrientes apresentam variações de acordo com o genótipo e o local de cultivo (MORAGHAN & GRAFTON, 2001; BEEBE *et al.*, 2000b). Estes teores por sua vez são pouco estudados em bancos de germoplasmas, bem com os teores de aminoácidos, mesmo quando se consideram as cultivares comerciais de feijão que são recomendadas para semeadura no Brasil (RIBEIRO *et al.*, 2007).

Apesar da deficiência de informações dos germoplasmas, o Brasil detém a maior diversidade vegetal do mundo, e os estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul

destacam-se pelo grande número de variedades crioulas (GUERRA *et al.*, 1998). Portanto, esta diversidade deve ser explorada, caracterizada e utilizada como um bem público, garantindo benefícios globais (GEPTS, 2006).

Juntamente com a ampla diversidade vegetal encontrada no Brasil, observa-se que Santa Catarina possui uma estrutura fundiária baseada em minifúndios, e esta característica associada a fatores sócio-econômicos permitiu a manutenção dos genótipos crioulos até os dias atuais, indicando uma grande biodiversidade. Estes genótipos vêm sendo mantidos por gerações de agricultores, sendo fonte de alimento e renda, constituindo um patrimônio genético que merece ser estudado e conservado em bancos de germoplasma (GUERRA *et al.*, 1998).

A utilização destes recursos genéticos nas pesquisas pode contribuir no incremento da qualidade nutricional das sementes, baseado na melhoria dos teores de nutrientes nos grãos, e ainda fornece base para novas pesquisas em nível de metabolismo bioquímico associado ao acúmulo de nutrientes nos grãos para consumo e constituir uma forma de incentivo aos agricultores com objetivo de agregar valor ao produto, em função da venda por preferência de cor e altos teores de nutrientes (CONAFE, 2005). Este trabalho de mestrado teve como objetivo caracterizar a biodiversidade quanto ao perfil das proteínas de reserva e sua relação com os teores de nutrientes nos grãos de genótipos de feijão do Banco Ativo de Feijão do CAV-UDESC.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DIVERSIDADE GENÉTICA DA CULTURA DO FEIJÃO

2.1.1 Bancos de germoplasma

O desenvolvimento tecnológico avançado das culturas, através do uso de variedades melhoradas e substituição das variedades crioulas, de ampla variabilidade genética, levam a perda de genótipos que possuam genes úteis para o melhoramento, tais como os relacionados à produção, qualidade tecnológica e nutricional de grãos, resistência a doenças ou tolerância a estresses bióticos e abióticos, assim constitui-se em fonte potencial para uma agricultura que busca sustentabilidade (CONNER & MERCER, 2007; CONAFE, 2005). O Brasil é considerado o país com maior diversidade vegetal do mundo, embora esta seja amplamente desconhecida (GUERRA *et al.*, 1998).

A importância da biodiversidade tornou-se uma preocupação mundial, no sentido de promover a conservação das mais variadas espécies, com o propósito de constituir base a sistemas de produção estáveis, aptos a enfrentar ameaças relacionadas às mudanças ambientais. Nas ações de conservação das espécies três métodos prevalecem: o método de conservação “*ex-situ*” que é a preservação de recursos genéticos fora do seu habitat natural, como os bancos de germoplasma. A conservação “*in-situ*” que é a preservação dos recursos em seu local de ocorrência natural, e inclui a conservação em reservas genéticas (Unidades de conservação) e a preservação “*on-farm*” que prevê a preservação das espécies em sistemas de cultivo agrícolas (GEPTS, 2006). Desta forma, observa a importância da coleta, preservação e principalmente caracterização dos genótipos crioulos. Através da preocupação em manter a diversidade genética e a sustentabilidade da agricultura, encontra-se a diferentes bancos de germoplasmas, das mais variadas espécies. Os bancos de germoplasma estão distribuídos mundialmente. Para a cultura do feijão a maior coleção se encontra no Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, Colômbia) o qual reúne mais de 30.000 acessos (CHIORATO *et al.*, 2005). No Brasil, a EMBRAPA vem organizando através do CENARGEM, os bancos ativos de germoplasma, com cerca de 14.000 acessos somente de feijão (SILVA &

FONSECA, 2005). No estado de Santa Catarina, os bancos de germoplasmas que se conhecem são compostos por menor número de acessos, na maioria em Universidades, como a UDESC-Lages, e também alguns centros de pesquisa representados pela Epagri-Chapécó, que mantêm exemplares representativos do estado de Santa Catarina. Poucas informações são obtidas a nível de bancos de germoplasma no estado, o que dificulta a troca de informações dos mesmos.

Visando preservar e usar a variabilidade presente nos bancos de germoplasma, de forma sustentável, existe o interesse sócio-econômico em manter os bancos de germoplasma. O CAV/UDESC se destaca neste cenário, pois é mantido um banco ativo de feijão (BAF) desde 1996, com conservação *ex situ*, composto atualmente por 194 acessos de feijão, formando-se uma fonte genética para trabalhos de pré-melhoramento para a cultura, principalmente no estado de Santa Catarina. O banco ativo de feijão (BAF) tem uma característica peculiar em relação aos demais bancos, pois existem muitas pesquisas dentro da própria instituição com estes genótipos, bem como fixação biológica de nitrogênio e sua interação com a planta (Dr. Julio Cesar Pires Santos e Dr. Cileide Maria Medeiros Coelho), resistência ao pH baixo e toxidez ao alumínio (Dr. Clovis Arruda de Souza), qualidade tecnológica, fisiológica e nutricional das sementes de feijão (Dr. Cileide Maria Medeiros Coelho), modelos biométricos aplicados ao melhoramento de feijão (Dr. Jefferson Luís Meirelles Coimbra) e diversidade genética baseada em marcadores moleculares (Dr. Altamir Frederico Guidolin). A preservação da variabilidade genética do feijão torna-se mais útil quando caracterizada, organizada e disponibilizada à comunidade científica, assim finalmente promove ganhos genéticos expressivos para a cultura, e para agricultura brasileira, o que torna o banco do CAV-UDESC um banco ativo nas suas pesquisas com feijão.

2.1.2 Marcadores morfológicos e bioquímicos

A caracterização de genótipos é uma etapa essencial em bancos de germoplasma e programas de melhoramento. Esta pode ser realizada com base em diferenças morfológicas das plantas, nos tipos de proteínas e de seqüências de DNA (Ácido Desoxirribonucleico), ou ainda pela integração de marcadores morfológicos, moleculares e bioquímicos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores morfológicos ou características fenotípicas são utilizados desde os tempos de Mendel em seus estudos de genética, representando um tipo de análise mais simples e de menor custo (BALLVE *et al.*, 1997). No entanto, é importante mencionar que a

maioria das características morfológicas são de natureza quantitativa, e estão sujeitas a grandes influências do ambiente.

Já a utilização de marcadores moleculares permite identificar um alto nível de polimorfismo, diretamente na sequência do DNA, além da ausência de efeitos ambientais, apesar de exigir técnicas e equipamentos mais complexos (GRATTAPAGLIA *et al.*, 1992). Particularmente, o uso de marcadores bioquímicos representa o resultado da expressão de um gene, como é o caso da expressão do fenótipo da faseolina, o qual não possui influência do ambiente, nem por características de seleção realizadas pelo homem (BROWN *et al.*, 1981), o que demonstra o alto potencial de uso da faseolina com marcador bioquímico para estudos de diversidade genética, domesticação e fluxo gênico entre genótipos de feijão.

Vários estudos bioquímicos baseados em análise eletroforética de proteínas de sementes levaram a identificação de diversos tipos de proteínas. Baseados em estudos feitos por Osborn (1988), os termos usados para as maiores frações de proteína de reserva em feijão são faseolinas, lectinas e arcelinas. Entre as proteínas de reserva armazenadas em feijão, as faseolinas representam a maior fração protéica de reserva, correspondendo em torno de 40-60% da proteína total (MA & BLISS, 1978). Tal proteína também é conhecida como glicoproteína II, vicilina, globulina G1 e componente α (OSBORN, 1988; BUCHBINDER, 1981). A solubilidade completa dessa proteína é realizada em 0,5 M de NaCl. A faseolina constitui um grupo de subunidades moleculares de polipeptídeos com peso molecular entre 43 a 54 KDa e o ponto isoelétrico está entre o pH 5,6 e 6,8; dependente do variante de faseolina. O variante tipo “T” (Tendergreen) contém quatro principais subunidades com diferentes pesos moleculares, α 51 KDa; β 48 KDa; γ 46 KDa e γ 45,5 KDa, o variante tipo “S” (Sanilac) contém como principais bandas α 49 KDa; α 48,5 KDa; β 48 KDa; β 47 KDa; γ 46 KDa e γ 45 KDa, o variante tipo “C” (Contender) apresenta as seguintes subunidades α 51 KDa; α 49 KDa; β 48 KDa; β 47 KDa ; γ 46 KDa; γ 45,4 KDa e γ 45 KDa (BROWN *et al.*, 1981).

As lectinas, assim como as faseolinas, receberam outras denominações como as fitoaglutinas ou fito-hemaglutininas, glicoproteína I e proteína II (KLOZOVÁ & TURKOVÁ, 1978). Esta fração representa cerca de 6 a 12% da proteína total do grão (OSBORN *et al.*, 1985). As lectinas têm sido isoladas e caracterizadas em diferentes cultivares de feijão e as suas subunidades apresentam peso molecular que se estende de 27 a 37 KDa e o ponto isoelétrico na faixa de pH entre 4,9 a 7,9 (BROWN *et al.*, 1982). As lectinas ainda possuem funções desconhecidas. O que se sabe deste grupo de glicoproteína e que estas são comumente chamadas de fitohemaglutininas, pois têm a capacidade de se ligar com a superfície das células de animais, muitas vezes causando aglutinação (especialmente em

eritrócitos), como a concanavalina A em sementes de jack bean (*Canavalia ensiformis*) (LIS & SHARON, 1973). O efeito tóxico das lectinas pode ser eliminado através do uso de tratamento com calor. Estas proteínas parecem ter relação com estádios de maturação e germinação das sementes Liener, (1976), e segundo Silva & Silva (1976), tem ligações com mecanismos de defesa da planta contra o ataque de fungos. Com relação à influência das lectinas no processo de germinação, a hipótese é que a eliminação dessas proteínas das sementes possa causar uma redução da germinação e ainda incrementar a susceptibilidade a doenças e insetos (VAN SCHOONHOVEN & VOYSEST, 1991).

Outras glicoproteínas, como as arcelinas são geralmente encontradas em espécies selvagens de feijão e as suas subunidades apresentam peso molecular que se estende de 35 a 42 KDa dependente do variante e o ponto isoelétrico é mais básico que a faseolina e as lectinas (OSBORN *et al.*, 1986). Aparentemente a arcelina faz parte do mecanismo de defesa da planta contra predadores, estando associada à resistência do feijoeiro ao *Zabrotes subfasciatus*, popularmente conhecido como caruncho (OSBORN *et al.*, 1986), que atacam as sementes durante seu armazenamento gerando perda como alimento e semente.

Além de todos estes efeitos citados pelas lectinas e arcelinas, pode ser que as mesmas tenham algum envolvimento com a síntese de fitato, como já foram observadas algumas evidências em trabalhos prévios por SDS-PAGE (COELHO *et al.*, 2005; COELHO *et al.*, 2004), onde se observam aumentos na expressão de tais frações protéicas coincidentes com altos níveis de fitato.

Portanto observa-se à importância da caracterização da diversidade protéica nos genótipos dos bancos de germoplasma, buscando a recuperação de genes que são importantes nas condições atuais de cultivo, através da caracterização dos variantes das principais proteínas de armazenamento e sua relação com os caracteres agrônômicos desejáveis como resistência a doenças e valor tecnológico e nutricional dos grãos para armazenamento e consumo, constituem-se em objetivos a serem alcançados pela pesquisa.

2.2 ORIGEM E EVOLUÇÃO DO FEIJÃO

Observações arqueológicas suportam a hipótese de que o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma planta originada das Américas (VAN SCHOONHOVEN & VOYSEST, 1991). Juntamente com resultados obtidos dos padrões eletroforéticos de faseolina, sugerem a existência de vários locais de domesticação do feijoeiro. Conforme citado por Gepts (1988) existem três centros de origem localizados na América Latina, definidos como centro

mesoamericano, centro norte andino e centro sul andino. O mesoamericano estende-se desde o sudeste dos Estados Unidos até o Panamá, tendo como zonas principais o México, Guatemala, Nicarágua, El Salvador, Honduras e Costa Rica, onde se encontra os tipos mais cultivados como *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. coccineus* e *P. acutifolius*. Enquanto que o centro norte andino estende-se da Colômbia, Venezuela até o norte do Peru, que possui menos espécies que a região mesoamericana. O centro sul andino estende-se do norte do Peru até algumas províncias do noroeste da Argentina, sendo encontradas as espécies *P. vulgaris*, *P. lunatus* e *P. vulgaris* var. *aborigineus*.

Análises eletroforéticas demonstraram os vários tipos de faseolina, onde o tipo “S” e sementes pequenas predominaram nos centros mesoamericanos e norte andino, enquanto que o tipo “T” e sementes grandes predominaram na região sul dos Andes. Nesta região foram encontrados outros tipos de faseolina como a “C”, “H” e “A”. O tipo “B” foi encontrado somente em feijões cultivados na Colômbia (GEPTS & BLISS, 1986; GEPTS *et al.*, 1986). Gepts e demais autores estabeleceram um paralelo geográfico para a variação do tipo de faseolina e tamanho de semente, entre formas de feijões selvagens e cultivados.

Feijões mesoamericanos exibiram predominantemente uma faseolina tipo “S” e sementes menores, enquanto que os andinos, na maioria dos cultivares, apresentaram faseolina do tipo “T”, com sementes maiores e mais largas. Da mesma forma, Gepts & Bliss (1986) designaram o norte dos Andes, mais especificamente a Colômbia, como um centro de domesticação adicional, com características intermediárias entre os mesoamericanos e os andinos, apresentando cultivares com sementes pequenas e com faseolinas tipo “S”, “T” e em baixa frequência o tipo “B”.

Estudos realizados por Singh e colaboradores (1991b, 1989), propõem uma subdivisão dos dois conjuntos gênicos primários (mesoamericano e andino), em raças quais podem ser diferenciadas com base na diferença morfológica das plantas, morfologia de semente, regimes de adaptação e hábitos de crescimento. O grupo gênico mesoamericano foi subdividido em três raças: raça Mesoamérica (M), encontrada no México e América Central, caracterizada por sementes pequenas (< 25 g/100 sementes), faseolina tipo “S”, hábitos de crescimento tipo II e III e sementes com tegumentos de coloração preta e vermelha; raça Durango (D), composta principalmente por hábitos de crescimento tipo III, sementes médias (25 a 40 g/100 sementes), faseolina tipo “S” e cultivada em áreas de sequeiro provenientes do México; e raça Jalisco (J), encontrada em áreas úmidas do México, hábitos de crescimento tipo IV, faseolina tipo “S” e sementes de tamanho médio. O grupo andino também foi subdividido em três raças, denominado de raça Nueva Granada (N), representado por feijões com sementes

médias a grande (> 40 g/100 sementes), faseolina tipo “T” e hábitos de crescimento tipo I e II; raça Peru (P), com feijões com hábito de crescimento tipo III e IV, adaptados a altitudes acima de 2.000 metros, sementes grandes e faseolina dos tipos “T”, “C”, “H” e “A”; e raça Chile (C), composta tipicamente por raças cultivadas no Chile, predominando hábitos de crescimento tipo III, sementes médias e ovais, geralmente com mais de uma cor e padrões de faseolina tipo “C” e “H”.

Com relação à introdução do feijão no Brasil as hipóteses apresentadas por Gepts *et al.* (1988) sugerem que pelo fato de ocorrerem tanto feijões grandes como pequenos, possivelmente tenham no mínimo três rotas distintas: a primeira rota envolvendo genótipos da América Central deve ter começado no México, seguindo para as ilhas do Caribe, Colômbia, Venezuela, e posteriormente para o Brasil. Por esta rota provavelmente foram introduzidos feijões mesoamericanos, pequenos, pretos, marrons, e mulatinhos.

A segunda rota partiu do Andes e possibilitou a entrada de feijões grandes em nosso país, contendo a faseolina T, feijões tipo Jalo, Pintado e outros. Há também possibilidade de uma terceira rota com feijões trazidos pelos imigrantes europeus. Para alguns tipos de feijões, tal como feijão Carnaval, preferido por imigrantes italianos e muito consumido no Rio Grande do Sul. Esta última deve ser a rota mais provável, tanto para o estado do Rio Grande do Sul, como também para o estado de Santa Catarina que foi colonizado por imigrantes italianos e alemães, principalmente na região oeste do estado (MACIEL *et al.*, 1999; GEPTS *et al.*, 1988).

Os estudos sobre a origem do feijoeiro fornecem dados importantes sobre a diversidade desta espécie e alternativas para a baixa variabilidade presente nos feijoeiros cultivados, permitindo a sistematização dos trabalhos de melhoramento que buscam fornecer resistência a fatores abióticos, bióticos (doenças e resistência a insetos como os brucídeos), melhorias na qualidade tecnológica e nutricional da semente (GEPTS *et al.*, 1986).

2.3 DIVERSIDADE QUANTO AOS TEORES DE NUTRIENTES NOS GRÃOS

O feijão representa no ponto de vista nutricional dos grãos grande importância mundial devido à presença de características que tornam seu consumo vantajoso, contendo elevados teores de proteínas, minerais, vitaminas, carboidratos e fibras (ARAÚJO *et al.*, 1996). Entre essas características podemos citar o alto teor de proteína nos grãos, podendo variar segundo Sgarbieri (1989) de 20 a 25%, já Sathe (2002), demonstra uma variação de 17,5 a 28,7% em feijões comerciais. Em feijões crioulos encontra-se uma variação

relativamente maior, de 17-32% de proteína total (BALDI & SALAMINI, 1973). O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) denota uma fonte mineral importantíssima principalmente para países como o Brasil (SGARBIERI, 1989), apresentando excelentes fontes de potássio, fósforo, cálcio, ferro, cobre, zinco e magnésio, particularmente teores altos de potássio, fósforo e baixo de sódio.

Os teores podem variar de 0,6-2,0 g.kg⁻¹ de cálcio; 1,23-2,20 g.kg⁻¹ de magnésio; 8,21-16,50 g.kg⁻¹ de potássio; 3,74-4,90 g.kg⁻¹ de fósforo; 27,1-41,0 mg.kg⁻¹ de zinco e 34,8-75,8 mg.kg⁻¹ de ferro (SGARBIERI, 1989). Tal variação nos teores de minerais é mais ampla em germoplasmas de feijões, e estes genótipos apresentam correlações positivas entre os conteúdos de minerais, como os teores de ferro correlacionado positivamente com: magnésio, zinco, fósforo e enxofre, o que pode promover melhoria de um mineral associado a outros minerais simultaneamente (BEEBE *et al.*, 2000 b).

Coincidentemente os maiores teores de ferro foram encontrados em genótipos andinos, sugerindo uma relação não muito evidente entre o conteúdo de ferro e a distribuição geográfica (BEEBE *et al.*, 2000b). Outras correlações entre os teores de minerais foram negativas entre o tamanho da semente e os teores de cálcio e magnésio em contraste do fósforo que apresentou correlações positivas, já os minerais ferro, boro, zinco e potássio não apresentaram correlações significativas. Além da diversidade observada entre genótipos para o teor de nutrientes nos grãos, observou-se o efeito do ambiente na concentração de boro, ferro, cálcio, potássio, zinco, manganês, magnésio e fósforo quando cultivados em diferentes locais (MORAGHAN & GRAFTON, 2001). Diferenças no conteúdo de minerais foram encontradas em sementes de genótipos crioulos para micronutrientes como zinco e ferro e macronutrientes como fósforo e cálcio (BLAIR *et al.*, 2005).

Apesar de o feijão apresentar elevados teores de nutrientes nos grãos, a biodisponibilidade dos minerais bem como das proteínas pode variar de acordo com alguns fatores como os fitatos e oxalatos, conhecidos pela sua capacidade de complexação com cátions bivalentes (cálcio, ferro, zinco, magnésio e cobre). O fitato (mio-inositol-hexaquisfosfato) é a principal forma de armazenamento de fósforo nos grãos de cereais e leguminosas (REDDY *et al.*, 1989). Sua capacidade de interação com minerais e proteínas pode diminuir o seu aproveitamento pelo trato digestivo dos mesmos, embora também tenham sido demonstrados que também tem efeitos benéficos, podendo atuar como antioxidante e anticarcinogênico (CHERYAN, 1980). Em trabalhos realizados por Coelho *et al.* (2002), encontrou-se variabilidade genética quanto aos teores de fitato com os valores entre 7 g.kg⁻¹ a 14,8 g.kg⁻¹, e também a presença de correlação alta ($r=0,73$) do fitato com as proteínas para a

dose mais alta de fósforo. Por este motivo, há um grande interesse na manipulação e avaliação dos teores de fitato em grãos, principalmente quando se trabalha com genótipos crioulos, os quais possivelmente apresentam uma ampla variabilidade, tanto para os teores de fitato quanto os teores de minerais.

2.4 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E SOCIAL

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é o mais importante legume para o consumo humano. Sua produção mundial excede 23 milhões de toneladas/ano, sendo sete milhões de toneladas produzidos na América Latina e África (BROUGHTON *et al.*, 2003). Destes 3,34 milhões de toneladas colocam o Brasil como maior produtor mundial de feijão (WANDER, 2007).

A grande parte do feijão cultivado na América Latina ocorre em pequenas propriedades, a qual varia de 1 a 10 hectares de área, com predomínio de baixo nível tecnológico e solos de baixa fertilidade. Algumas estimativas sugerem que até 80% da área cultivada com feijões na América Latina são regiões em encostas. No Brasil 1/3 do total de feijão cultivado, é produzido em áreas menores que de 10 hectares. A cultura do feijoeiro representa no Brasil uma atividade importante por sua expressão tanto em produção quanto em área cultivada e, principalmente porque o feijão representa um alimento importante como fonte de proteína, especialmente para populações de baixa renda (BROUGHTON *et al.*, 2003).

No cenário sócio-econômico do estado de Santa Catarina, a cadeia produtiva de feijão tem importante participação, principalmente como fonte de renda para agricultura familiar, voltada para a subsistência, geralmente cultivada em solos ácidos com baixo nível tecnológico (D' AGOSTINI *et. al.*, 2001). Em Santa Catarina as estimativas indicam um grande número de pequenos produtores de feijão, que denota um número expressivo de genótipos crioulos. Estes genótipos apresentam uma grande variabilidade em termos de tamanho, coloração, brilho e forma da semente, característica essa presente em outros estados do sul do Brasil, como Rio Grande do Sul, qual indicam a presença de 200 mil pequenos produtores e uma grande utilização de genótipos crioulos (ANTUNES *et al.*, 2007).

A variabilidade presente em genótipos crioulos possibilita a utilização destes genótipos, através de técnicas de melhoramento genético, que buscam sua viabilização e agreguem maior valor ao produto final, de modo que possibilitem novas alternativas ao

consumidor e ainda exportação de grãos diferenciais, como exemplo, no Paraná que cultiva este tipo de grão com grande retorno econômico (BIC, 2007).

A biodiversidade do feijão é a base para a manutenção de populações estáveis que garantam meios de subsistência agrícola. A necessidade de utilização de variedades melhoradas constitui uma base genética pouco diversificada, este motivo tem trazido preocupações mundiais devido às modificações ambientais, ação antrópica do homem e número reduzido genótipos em cultivo. Este fato propõe o resgate do patrimônio genético, mantendo bancos de germoplasma e principalmente determinando as características importantes de cada genótipo, para que desta forma estejamos preparados para superar adversidades que incluem os novos patógenos causadores de doenças, pragas, stresse ambiental, baixa qualidade nutricional dos alimentos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados 112 genótipos provenientes do Banco Ativo de feijão (BAF) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) em Lages, SC, o qual representou 100% dos genótipos do banco em 2006.

A origem das sementes inclui principalmente no estado de Santa Catarina, com 65% do total dos genótipos, Rio Grande do Sul (19%), São Paulo (8%), Goiás (5,3%) e Pernambuco (2,7%). Deste total, cinco genótipos foram utilizados como controles do tipo de faseolina: BAF 113 Sanilac (S), 116 Pampa (H), 117 Tendergreen (T), 118 Boyaca (B) e 119 Contender (C), fornecidos através de parcerias com a EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão - CNPAF, Goiânia - GO por intermédio da Dr. Heloísa Torres Silva e incluídos neste banco por ocasião desta pesquisa.

O experimento foi conduzido nos anos agrícolas 2005/06 e 2006/07, em propriedade particular no município de Lages, localizado no Planalto Sul de Santa Catarina. As coordenadas geográficas deste município são 27° 52'30'' de latitude sul e 50° 18'20'' de longitude oeste, com altitude média de 930 m (EPAGRI, 2006). O objetivo do experimento de campo foi obter sementes novas, produzidas na mesma safra.

A semeadura dos 112 genótipos foi efetuada manualmente com 12 sementes por metro linear, em blocos ao acaso, com 3 repetições, em parcelas constituídas por 4 fileiras de 2 m de comprimento espaçadas com 0,5 m entre si. A área útil foi composta por 2 fileiras centrais, descartando 0,3 m das extremidades. A adubação de base foi realizada junto às linhas, previamente a semeadura, na dosagem de 20, 73, 63 kg.ha⁻¹ de N, P₂O₅ e K₂O, respectivamente, segundo análise do solo e recomendações descritas em publicações da Comissão de Química e Fertilidade do Solo - CQFS-RS/SC, (2004). A adubação de cobertura foi realizada duas vezes, nos estádios de três e cinco trifólios (V3 – V4-5), utilizando-se uma dosagem de 30 kg de nitrogênio (N) por hectare em cada aplicação. O controle de plantas invasoras foi realizado através de capinas manual, e o controle de insetos pela aplicação de 500 g.ha⁻¹ de metamidofós (organofosforado).

As sementes foram colhidas, secas, padronizadas para aproximadamente 12% de umidade e posteriormente armazenadas em câmara fria, com temperatura constante de $\pm 8^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $\pm 40\%$.

As análises bioquímicas das sementes foram realizadas no Laboratório de Análises Genéticas do Instituto de Melhoramento e Genética Molecular da UDESC/Lages (IMEGEM/UDESC), as análises químicas no laboratório de Química do solo do CAV/UDESC.

Na safra 2005/06 avaliaram-se todos os genótipos quanto aos teores de proteína total e solúvel, morfologia da semente e determinou-se o centro de origem baseando-se no perfil dos tipos de faseolina.

Para a condução do experimento a campo na safra 2006/07, utilizou-se 34 genótipos. A escolha dos 34 genótipos foi baseada nos genótipos representativos do agrupamento obtido pelo centro de origem e também por características morfológicas, produtividade e qualidade tecnológica avaliadas em trabalhos paralelos, os quais estão publicados ou em trâmite de publicação (BORDIN *et al.*, 2008; COELHO *et al.*, 2008; COELHO *et al.*, 2007c; COELHO *et al.*, 2007d).

Os 34 genótipos selecionados foram avaliados nas duas safras quanto aos teores de nutrientes nos grãos: cálcio, magnésio, fósforo, zinco, ferro, fitato, proteína total e solúvel, com objetivo de comparar estes caracteres em dois anos de cultivo e determinar o efeito da interação entre genótipo e ano de cultivo.

3.2 AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS DA SEMENTE

As avaliações de morfologia da semente foram obtidas de três repetições experimentais, compostas por 10 sementes dentro de cada repetição. Enquanto que o peso de 100 sementes (P100) foi baseado na contagem de 100 sementes para cada repetição, das três repetições obtidas do experimento a campo.

A determinação do peso de 100 sementes (P100), a forma da semente e a cor do tegumento foram baseadas nos descritores mínimos para a cultura do feijoeiro (SILVA, 2005).

A forma da semente foi determinada através dos coeficientes de J(cm) e H(cm). O coeficiente de J é estimado pela razão entre comprimento e espessura da semente e fornece um indicativo de formato da semente (Tabela 01) e o coeficiente de H é a razão entre largura e espessura da semente, e indica o grau de achatamento da semente (Tabela 02) (SILVA, 2005).

Tabela 01 - Classificação do formato da semente baseada na relação entre comprimento/espessura (coeficiente J).

Formato da semente	Variação (cm)
Esférica	1,16 – 1,42
Elíptica	1,43 – 1,65
Oblonga/Reniforme curta	1,66 – 1,85
Oblonga/Reniforme média	1,86 – 2,0
Oblonga/Reniforme longa	> 2,0

Fonte: Silva, 2005.

Tabela 02 - Classificação do grau de achatamento da semente baseado na relação largura/espessura (coeficiente H).

Formato da semente	Variação (cm)
Achatada	< 0,69
Semi-cheia	0,70 – 0,79
Cheia	> 0,80

Fonte: Silva, 2005.

Além do formato da semente, também foram classificados os genótipos em tipos comerciais conforme a coloração do tegumento. O grupo 1: coloridos ou apenas uma cor, que apresentem sementes grandes, quais são representantes do grupo comercial manteigão, grupo 2: coloração branca, grupo 3: coloração bege a marrom sem a presença de listras, grupo 4, 5, 6 e 7: coloração preta, coloridos, cor amarela e vermelha. O grupo 8: comercial carioca marrom a bege com presença de listras característica (coloração havana) desse grupo comercial (Figura 01) (SILVA, 2005).



Figura 01 - Classificação quanto aos tipos comerciais: manteigão (1), branco (2), mulatinho (3), preto (4), colorido (5), amarelo (6), vermelho (7) e carioca (8).

Fonte: Silva (2005).

3.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE RESERVA DOS GRÃOS

Inicialmente retirou-se o tegumento e o embrião das sementes, e os cotilédones foram macerados em almofariz com nitrogênio líquido até se obter pó bem fino. Cem miligramas do macerado foram colocados em micro tubo de 1,5 mL, o qual recebeu 1 mL de NaCl 0,5M, pH 2,4, seguido por agitação durante 30 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas (15000 g/20 minutos) e o sobrenadante obtido foi armazenado em temperatura de -20°C (BROWN *et al.*, 1981).

A partir do sobrenadante armazenado realizou-se a quantificação das proteínas através da comparação com uma curva padrão de BSA (fração 5 - albumina de soro bovino) de acordo com o método de Bradford (1976) (Anexo 01), para determinar a quantidade de proteína solúvel total dos grãos, esta técnica utiliza o corante de "Coomassie blue brilliant" G-250, que por sua vez interage com as ligações peptídicas das proteínas induzindo a formação de um complexo colorido, e a partir dessa interação realiza-se a leitura em espectrofotômetro (SPEKOL – UV VIS), sob um comprimento de onda de 595nm.

3.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURANTE (SDS-PAGE)

A eletroforese foi utilizada com o objetivo de separação das proteínas de reserva dos grãos de feijão. Utilizou-se um sistema vertical SE 600 Ruby – Amersham Biosciences, com sistema de eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE), em uma concentração de 3% (gel empilhador) e 15% (gel separador), com composição descrita no anexo 02, nas dimensões de 20 cm x 23 cm x 7,5 mm.

A proteína previamente extraída e quantificada por Bradford foi aplicada em no gel de acordo com Laemmli (1970), seguindo as modificações realizadas por Ma & Bliss (1978). Após a quantificação, uma alíquota correspondente a 20 µg de proteína foi misturada a uma solução tampão contendo: 0,625 M de Tris-HCl, pH 6,8; 2% de SDS, 40% de sacarose; 5% de 2- β mercaptoetanol (p/v) e 0,001% de azul de bromofenol, na proporção 1:1; seguido por aquecimento em banho-maria a 100°C durante 5 minutos e resfriada por imersão em gelo por 1 minuto, centrifugadas a 15000 g por 10 minutos e submetidas a eletroforese (BROWN *et al.*, 1981). Além das amostras, aplicou-se 10 µL do padrão de peso molecular (6,5 a 200 KDa, Bio-Rad). O sistema de eletroforese contendo as amostras foram colocados em solução tampão com pH em torno de 8,3 (50 mM de Tris, 0,384 M de Glicina, 5mM EDTA, pH 8,8 e 0,25% SDS), sob temperatura constante de 13°C e corrente de 50V durante 1 hora até passagem das proteínas através do gel empilhador. Quando as proteínas alcançaram o gel separador, aplicou-se corrente constante de 80 V até o término da corrida.

3.5 COLORAÇÃO DOS GÉIS COM NITRATO DE PRATA

Com objetivo de visualização do perfil dos variantes da faseolina e posterior determinação do centro de origem do feijão, utilizou-se o método de nitrato de prata para realizar a coloração dos géis, porque o nitrato de prata é um método que possui maior sensibilidade e demonstrou uma melhor interação com este tipo de proteína (faseolinas).

Após a eletroforese, os géis foram lavadas com água ultra pura por 15 minutos, em seguida incubados em solução fixadora (50% de metanol, 10% de ácido acético) por 4 horas. Após a fixação, os géis foram incubados em solução de etanol 30% durante 15 minutos e lavados com água ultra pura. Na sequência, adicionou-se uma solução de tiosulfato de sódio 0,02% (1,5 minutos) e posterior lavagem com água ultra pura, seguido pela adição ao gel uma solução com 1,06 mM de nitrato de prata, por 25 minutos e posterior lavagem com água ultra pura. E por fim a adição da solução reveladora contendo 0,57 M de carbonato de sódio,

0,0004% de tiosulfato de sódio e 0,019% de formaldeído. Os géis foram mantidos em solução reveladora até o surgimento das bandas, padronizado em 20 minutos. Após a revelação o processo foi interrompido com o uso de uma solução de 10% de ácido acético durante 10 minutos. Os géis foram armazenados em solução com 50% de metanol e fotografados com máquina digital (Sony 5,1 mega pixels) (BLUM *et al.*, 1987).

3.6 COLORAÇÃO DOS GÉIS COM COMASSIE BRILLIANT BLUE R 250

Para a coloração dos géis com objetivo de analisar a diversidade quanto ao perfil das lectinas e arcelinas, utilizou-se à técnica com comassie blue R250. Após a eletroforese, os géis foram lavados com água ultra pura por 15 minutos, em seguida incubados por 12 horas em solução contendo: comassie brilliant blue R250, metanol, ácido acético glacial e água na proporção de 0,15:45:9:45,85. O excesso do corante foi retirado com metanol, ácido acético glacial e água na proporção de 45:9:46, até que as bandas protéicas se tornassem nítidas em torno de 2 horas. Os géis foram armazenados em solução com 50% de metanol e fotografados com máquina digital (Sony 5,1 mega pixels) (ALFENAS, 1998).

3.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS DA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURANTE (SDS-PAGE)

O procedimento de avaliação foi por comparação do perfil protéico das amostras em relação aos pesos moleculares padrões para determinar o peso molecular de cada banda de proteína presente no gel. O padrão (Bio-Rad) apresentou peso molecular, composto por miosina (200 KDa), β -galactosidase (116,25 KDa), fosforilase b (97,4 KDa), serum albumina (66,2 KDa), ovoalbumina (45 KDa), anidrase carbônica (31 KDa), inibidor de tripsina (21,5 KDa), lisozima (14,4 KDa) e aprotinina (6,5 KDa).

3.8 DETERMINAÇÃO DOS NUTRIENTES NOS GRÃOS

Para a determinação dos macronutrientes: Nitrogênio (N), Potássio (K), Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg), foi realizada a digestão sulfúrica.

O procedimento para a digestão sulfúrica foi primeiramente pela pesagem de 200 mg de grão moído, em moinho tipo Wiley e submetidas à passagem na peneira de 6 mm, e adicionadas em tubos de digestão (25 x 250 mm), onde se adicionaram 0,7 g de mistura

catalítica (90% de sulfato de sódio, 9% de sulfato de cobre e 1% de selênio), 2 mL de ácido sulfúrico concentrado e 1 mL de água oxigenada 30%. Os tubos foram colocados em blocos digestores à temperatura inicial de 180°C e posteriormente até atingirem 375°C, por um tempo suficiente para tornar a amostra com coloração transparente. Posteriormente, retirou-se os tubos do bloco para esfriar e completou-se com água destilada para um volume final de 50 mL (TEDESCO *et al.*, 1995).

Para a determinação dos seguintes nutrientes: Fósforo (P), Zinco (Zn) e Ferro (Fe), foi realizada a digestão nitro-perclórica.

Inicialmente, pesou-se 500 mg de grão moído, transferiram-se as amostras para tubos de digestão, e adicionou-se ácido nítrico concentrado e ácido perclórico concentrado na proporção de 2:1. Os tubos foram colocados em blocos digestores à temperatura inicial de 160°C durante 30 minutos, até o volume ser reduzido à metade, em seguida à temperatura foi gradualmente aumentada até 210°C, mantendo esta temperatura até obter uma alíquota transparente. Retiraram-se os tubos do bloco para esfriar e completar o volume com água destilada para 20 mL (MALAVOLTA *et al.*, 1989).

Para a preparação das curvas padrão de cada mineral (Ca, Mg, P, K, Fe e Zn), os padrões primários foram secos em estufa a 105 °C, por duas horas e pesados em balança de precisão.

3.8.1 Teor de proteína total dos grãos

A determinação do nitrogênio total dos grãos baseia-se na transformação do nitrogênio orgânico, em sulfato de amônio através da digestão sulfúrica e posterior destilação na presença de hidróxido de sódio com liberação da amônia, que é fixada em solução ácida e titulada através do processo de neutralização (MARTINS & REISSMANN, 2007).

O método utilizado para determinar o teor de proteína total foi o proposto por Kjeldahl (AOAC, 1995), o qual se baseia no teor de nitrogênio total contido na amostra. A partir de uma alíquota de 10 mL da amostra diluída obtida da digestão sulfúrica, procedeu-se a destilação em micro-destilador de nitrogênio (TECNAL TE-036/1). O sal formado, borato de amônio, após processo de destilação, foi titulado com solução padrão de HCl 0,025 N, com fator de 700 µg de N para cada mL gasto da solução padrão de HCl 0,025 N, até ponto de viragem do indicador de ácido bórico, que é a passagem da coloração verde da amostra para coloração rosa claro. A determinação do teor de proteína total foi realizada seguindo a fórmula: % Proteína = conteúdo de N × 6,25 (AOAC, 1995).

3.8.2 Teor de potássio (K)

O princípio da determinação do potássio no grão requer o uso do fotômetro de chama. O fotômetro quantifica os fótons emitidos pelos átomos de potássio excitados pelo calor da chama, com base em uma curva padrão. A quantidade de fótons é proporcional ao número de átomos que estavam no estado fundamental (MARTINS & REISSMANN, 2007).

A partir da alíquota diluída obtida da digestão sulfúrica, determinou-se a concentração de potássio nos grãos pela emissão de luz em fotômetro de chama (TEDESCO *et al.*, 1995). Utilizou-se uma curva padrão obtida da solução (KH_2PO_4 - Tritisol - Merck), nas concentrações de 0, 40 e 80 mg.Kg^{-1} de potássio.

3.8.3 Teores de cálcio (Ca) e magnésio (Mg)

Para a determinação de cálcio e magnésio utilizou-se espectrofotometria de absorção atômica (TEDESCO *et al.*, 1995). O método consiste em determinar a presença de elementos químicos como cálcio, magnésio, manganês, ferro, zinco e cobre usando como princípio a absorção da radiação ultravioleta por parte dos átomos em estado neutro. Onde estabelece que os átomos livres em estado estável possam absorver a luz a certo comprimento de onda. A absorção é específica a cada elemento, nenhum outro elemento absorve este comprimento de onda (MARTINS & REISSMANN, 2007).

Preparação das amostras:

Para determinação de cálcio, utilizou-se uma diluição das amostras digeridas na proporção 1:1 (alíquota diluída: água), depois se acrescentou na mesma proporção o óxido de lantânio (3,4 g de La_2O_3 diluído em 16,7 mL de ácido sulfúrico concentrado, para um volume final de 1L), com objetivo de evitar interferência dos fosfatos durante a leitura do cálcio e do magnésio. Já para o magnésio, foi retirada uma parte da alíquota preparada para o cálcio e adicionado 2 partes de água. Para calibração do aparelho utilizou-se uma curva padrão obtida de solução padrão de cálcio (CaCO_3 - Tritisol - Merck) e magnésio (Mg metálico - Merck), nas concentrações de: 0; 1,5; 3; 6; 12 e 18 mg.kg^{-1} de cálcio e 0; 0,15; 0,3; 0,6; 1,2 e 1,8 mg.kg^{-1} de magnésio.

3.8.4 Teores de ferro (Fe) e zinco (Zn)

A partir da alíquota diluída proveniente da digestão nitro-perclórica determinou-se a concentração de ferro e zinco através de espectrofotometria de absorção atômica (TEDESCO *et al.*, 1995). O princípio deste método é o mesmo descrito para os teores de cálcio e magnésio. Para a preparação da curva padrão de Fe e Zn utilizou-se um padrão (Fe e Zn – Titrisol - Merck), nas seguintes concentrações: 0, 2, 6, 10 e 16 mg.kg⁻¹ de ferro e 0; 0,2 ;0,6; 1,2; e 1,8 mg.Kg⁻¹ de zinco.

3.8.5 Teor de fósforo total

A determinação do fósforo total no grão foi realizada pelo método de colorimetria do metavanadato, o qual se baseia na formação de um composto amarelo do sistema vanadomolibdatofosfórico em acidez 0,2 a 1,6 N (MALAVOLTA *et al.*, 1989). Aos extratos obtidos pela digestão nítrico-perclórica foi adicionado um reativo colorido composto por partes iguais de molibdato de amônio a 5% e metavanadato de amônio a 0,25%, obtendo-se uma coloração final amarela. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (SPEKOL – UV VIS), sob um comprimento de onda de 420 nm. Realizou-se a diluição (1:9) de amostra:água.

A curva padrão para o fósforo foi obtida através de uma solução estoque de 1000 mg.kg⁻¹ de fósforo preparada com um padrão (KH₂PO₄ - Tritisol - Merck) diluído para obter as concentrações de: 0; 4; 8; 12 e 20 mg.kg⁻¹ de fósforo.

3.8.6 Teor de ácido fítico

A metodologia utilizada foi proposta por Latta & Eskin (1980). Esse método se baseia na formação de um composto ferro-ácido-sulfossalicílico de coloração azul escuro (Reagente de Wade). Na presença de fitatos o ferro é deslocado, reduzindo a intensidade da coloração azul.

Preparação das amostras: As amostras foram moídas em moinho tipo Wiley e submetidas à passagem na peneira de 6 mm.

Preparação da resina trocadora de ânions: A resina – Dowex 1x 8-400 aniônica (Sigma) foi hidratada em presença de água ultra pura por 1 hora, em seguida adicionou-se NaCl a 0,7 M e agitou-se por 5 minutos. A mesma permaneceu em repouso por mais 1 hora para ocorrer à saturação da resina com Cl⁻.

Extração de fitato: A extração consistiu na pesagem do material (250 mg) com adição de 10 ml de HCl 2,4%, mantendo-se sob agitação, por um período de 3 horas e posterior centrifugação por 15 minutos a 2000 *g* a temperatura ambiente.

Recuperação do fitato: Retirou-se uma alíquota de 3 mL do sobrenadante e adicionou-se em 1,0 g de resina trocadora de ânions anteriormente saturada com NaCl 0,7 M, contendo 8 mL de água ultra pura. Após este processo, promoveu a agitação em agitador (modelo 109 - Nova Ética) durante 1 hora.

Eluição das impurezas: Descartou-se o sobrenadante, e a resina foi lavada com 8 mL de NaCl 0,07 M para eluir as impurezas, como fósforo-inorgânico.

Eluição do fitato retido na resina: descartou-se a solução de lavagem e adicionaram-se 8 mL de NaCl 0,7 M para eluir o fitato retido na resina com posterior agitação por 30 minutos. Após tal período centrifugou-se as amostras a 400 *g*., por 10 minutos a temperatura ambiente.

Leitura das Amostras: retirou-se uma alíquota de 3 mL do sobrenadante e adicionou 1 mL de reagente de Wade (0,03g de cloreto férrico hexahidratado mais 0,3g de ácido sulfossalicílico num volume de 100 mL). Formou-se neta solução um precipitado de fitato de ferro, deste modo foi necessário centrifugar por 10 minutos a 2000 *g*. Em seguida realizou-se a leitura em espectrofotômetro (SPEKOL – UV VIS), sob um comprimento de onda de 500 nm.

Preparação da Curva: Pesou-se 0,03 g de fitato de sódio ($C_6H_6O_{24}P_6Na_{12}$) e completou para um volume final de 100 mL de água ultra pura. Desta, retirou-se 15 mL e completou-se o volume com água para 100 mL (45 mg.kg^{-1}). Esta solução foi utilizada para preparar a curva padrão com sucessivas diluições, nas concentrações de 7,5; 15; 22,5; 37,5; 45 mg.kg^{-1} .

3.9 ANÁLISE ESTÁTISTICA

Os resultados de teores de proteína total e solúvel e o peso de 100 sementes, dos 112 genótipos foram submetidos à análise de variância univariada para constatar a existência de variabilidade entre os genótipos, a 5% de probabilidade, pelo teste de Fischer (F). A análise multivariada foi executada nos caracteres quantitativos (peso de 100 sementes, proteína total e proteína solúvel). A análise de multivariada foi administrada usando técnica da variável canônica (RAO, 1952).

A contribuição das características para variação total utilizou a distância generalizada de Mahalanobis (D^2) como medida de dissimilaridade, seguindo a metodologia de Singh (1981).

Os testes de Scott-Knott e Tukey foram utilizados no procedimento de separação de médias em nível de significância de 5% de probabilidade (STEEL & TORRIE 1980).

Os resultados dos teores de nutrientes dos grãos de 34 genótipos foram submetidos ao teste F ($p < 0,05$). Posteriormente se fez a análise multivariada, da mesma forma que está descrito acima. Para o processo de agrupamento utilizou-se o processo de otimização proposto por Tocher (RAO, 1952). Nesta primeira parte do trabalho a análise estatística foi executada utilizando o programa Genes (CRUZ & CARNEIRO 2003).

Os resultados referentes ao perfil das proteínas de reserva avaliadas nos 112 genótipos foram submetidos a uma análise multivariada, onde os pesos moleculares de cada proteína foram estimados pela avaliação de presença e ausência de bandas em comparação com padrão de peso molecular conhecido, a partir destes dados as análises foram realizadas através do programa CANOCO versões 4.6 (TER BRAAKS & MILAUER, 1988). Os pesos moleculares das proteínas foram utilizados para obtenção do comprimento do gradiente e seleção do modelo de resposta a ser utilizado pelo programa. Como este gradiente foi maior que três (resposta unimodal), desta maneira optou-se pela análise de correspondência (AC).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CENTRO DE ORIGEM DO FEIJOEIRO

Análises eletroforéticas dos 112 genótipos demonstraram dois tipos principais de faseolina “S” e “T” (Figura 02). O tipo de faseolina “S” foi o perfil mais encontrado, representado 58% do total dos genótipos, enquanto que o tipo “T” representou 38,3%. Os tipos de faseolina H, C e B, foram representados apenas pelos controles (2,7%). Já as cultivares comerciais (BAF: 110, 111, 112, 115, 121 e 80SH) recomendadas para o estado de Santa Catarina apresentaram o tipo de faseolina “S” (Tabela 03). Os resultados obtidos neste trabalho indicam a presença de 2 centros de origem. A presença mais abundante do tipo de faseolina S também foi encontrada em outros bancos de germoplasma, como foi o caso de Pereira & Souza (1992), em 192 feijões provenientes do banco de germoplasma CNPAF (Centro de Nacional Pesquisa de arroz e feijão - EMBRAPA), que observou dois tipos principais de faseolina, tipo “S” (80,6%) e tipo “T” (19,4%). Deste total de genótipos, 20 são oriundos de Santa Catarina, sendo que somente um único genótipo é representado pelo tipo de faseolina “T” (PEREIRA & SOUZA, 1992). Embora outros resultados, em um total de 72 genótipos provenientes do Brasil, o tipo de “T” foi predominante em Minas Gerais e Santa Catarina (GEPTS *et al.*, 1988), porém, estes estudos não incluíram um número representativo de genótipos do estado de Santa Catarina.

Em contraste, outros autores encontraram em genótipos crioulos e comerciais de feijões, no estado do Rio Grande do Sul/Brasil tipos de faseolina T, S, H, A, e C, predominando o tipo “T” (77,27%) (MACIEL *et al.*, 1999).

Os dois tipos de faseolina mais freqüentemente encontrados, reforçam a hipótese da existência de dois centros de origem do feijão no Brasil, provenientes de duas principais rotas, América Central e Europa (GEPTS *et al.*, 1988). Em trabalhos com relação à distribuição das espécies de rizóbios de feijão no Brasil, (AGUILAR *et al.*, 1998; PEREZ-RAMIREZ *et al.*, 1998 citado por STOCCO, 2005) argumentam a entrada destes rizóbios via sementes de feijão pela região Mesoamericana ou norte da Argentina, e ainda possíveis introduções ocorridas por vias comerciais (África e diversos locais da Europa), sendo então trazidos para o Brasil.

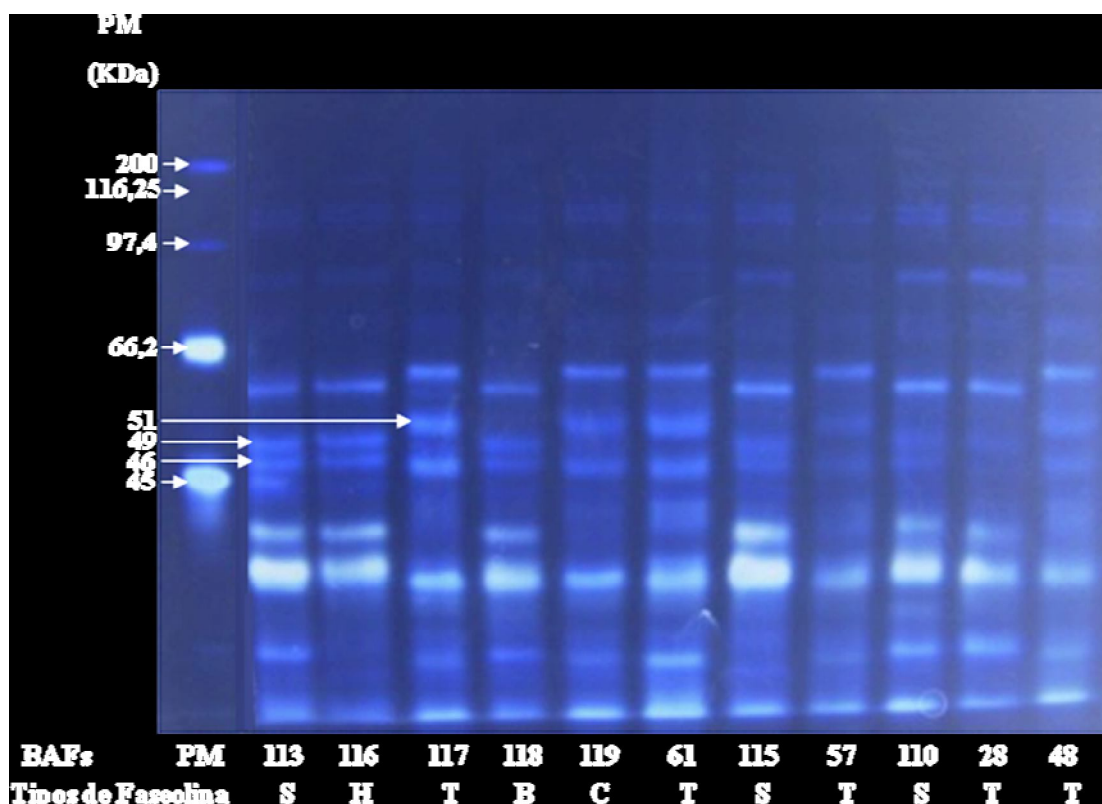


Figura 02 - Gel de poliacrilamida SDS-PAGE (10 µg de proteína, 15%), corado com nitrato de prata, onde PM= padrão de peso molecular (45-200 KDa), contendo o perfil representativo dos tipos de faseolina (S, T, H, B, C) em alguns genótipos (Bafs: 113,116,117,118,119,61,115,57,110,28 e 48), UDESC, Lages.

A diversidade genética também foi evidenciada pelo peso de 100 sementes, que variou entre 15,21 a 64,68 g/100 sementes, tendo em média um peso de 28,12 g/100 sementes. (Tabela 03). Os genótipos do centro de origem Andino apresentaram sementes maiores (36,68 g/100 sementes), enquanto o centro Mesoamericano, sementes menores (20,6 g/100 sementes). Tais resultados apresentaram boa correspondência entre os genótipos representados pelo centro de origem Andino e Mesoamericano, tendo sementes grandes e pequenas, que estão em torno de 40 g e 25 g/100 sementes, respectivamente (MACIEL *et al.*, 1999; SINGH *et al.*, 1991a).

Em termos de proteína total, os dados variaram entre 191,40 g.kg⁻¹ (BAF 34 e 63) a 320,20 g.kg⁻¹ (BAF 49), tendo em média 262 g.kg⁻¹. Esta concentração foi similar à obtida por Santalla *et al.* (2004) em genótipos crioulos de feijão, com valores entre 265-352 g.kg⁻¹ e no Brasil, em genótipos comerciais, entre de 200 a 270 g.kg⁻¹ (DALLA CORTE *et al.*, 2003; ANTUNES *et al.*, 1995). Mas, em trabalhos recentes com 21 linhagens de feijão observou-se uma maior variação de proteína total no grão (223,4 a 362,8 g.kg⁻¹) (MESQUITA *et al.*,

2007). Em outros relatos, Antunes *et al.* (1995) também com linhagens, obtiveram menores variações de proteína total (233,70 a 257,70 g.kg⁻¹).

Particularmente alguns genótipos (BAFs: 04, 07, 13, 49, 53, 60 e 96) superaram os resultados observados na literatura para genótipos comerciais e foram próximos a algumas linhagens de feijão.

O teor de proteína solúvel entre os genótipos variou entre 74,32 (BAF 79) a 104,32 g.kg⁻¹ (BAF 41) (Tabela 03). E constatou-se um teor médio de 88,5 g.kg⁻¹, enquanto que a média de proteína total foi de 262,0 g.kg⁻¹, o que representa 34% da proteína total na forma solúvel no grão. Tais valores foram inferiores aos obtidos por Ramos Junior *et al.* (2005), que observaram um teor entre 144 e 163 g.kg⁻¹, de proteína solúvel e 201 e 214 g.kg⁻¹ de proteína total, quando aplicou 40 e 80 kg.ha⁻¹ de N, respectivamente. Este autor justifica que a grande parte do nitrogênio contido nos grãos de feijão não participa da composição das proteínas, apresentando-se possivelmente na forma de aminoácidos livres ou como outros compostos não protéicos dos grãos.

Tabela 03 - Identificação, origem da coleção, tipo de faseolina, peso de 100 sementes, proteína total e solúvel dos 112 genótipos da safra 2005/06 do BAF, UDESC, Lages.

BAF	Origem da Coleção	Tipo de Faseolina	Peso de 100 sementes (g)	Proteína Total (g.kg ⁻¹)	Proteína Solúvel (g.kg ⁻¹)
01	Ponte Serrada	S	36,64	257,03	84,06
02	Pelotas (RS)	S	22,70	229,69	83,02
03	Palmitos	T	29,14	289,84	89,47
04	Lages	T	40,81	295,31	98,39
05	Cunha (SP)	S	17,25	256,56	88,97
06	Piracicaba (SP)	T	27,21	273,44	80,86
07	Lages	S	17,61	295,31	88,47
08	Nova Erechim (RS)	T	42,37	267,44	85,95
09	Piracicaba (SP)	S	24,26	278,91	91,75
10	Palmitos	S	19,80	268,00	74,82
11	Lages	T	39,93	268,00	83,67
13	Caxambú do Sul	S	22,23	306,25	91,86
14	Piracicaba (SP)	S	21,10	278,91	85,22
15	Pelotas (RS)	S	24,25	289,84	94,73
17	Palmitos	S	17,36	246,09	82,28
18	-	S	19,60	229,69	79,46
19	Palmitos	S	20,97	278,91	98,63
20	Palmitos	T	21,34	278,91	91,49
21	Palmitos	S	22,99	278,91	96,90
22	Palmitos	S	20,20	240,63	85,14
23	Chapecó	S	22,80	251,56	90,11
24	São José do Cerrito	S	42,73	251,56	90,44
25	Palmitos	T	19,66	279,00	98,01

continua

continuação

Tabela 03 - Identificação, origem da coleção, tipo de faseolina, peso de 100 sementes, proteína total e solúvel dos 112 genótipos da safra 2005/06 do BAF, UDESC, Lages.

BAF	Origem da Coleção	Tipo de Faseolina	Peso de 100 sementes (g)	Proteína Total (g.kg ⁻¹)	Proteína Solúvel (g.kg ⁻¹)
26	Palmitos	S	21,95	267,97	94,72
27	Piracicaba (SP)	T	36,21	257,03	85,71
28	Saudades	T	27,94	235,16	90,89
29	Ituporanga	T	36,37	262,50	89,42
30	-	S	33,52	259,24	90,00
31	-	T	29,03	257,03	85,05
32	Coronel Freitas	T	34,02	246,09	96,67
33	Concórdia	T	42,82	262,50	102,37
34	Piracicaba (SP)	S	26,27	191,41	84,53
35	Piracicaba (SP)	S	18,48	256,50	90,40
36	São José do Cerrito	S	25,98	289,84	86,36
37	Piracicaba (SP)	S	23,15	218,75	80,44
38	Pelotas (RS)	S	19,55	221,70	98,54
39	Bom Jardim da Serra	T	37,43	257,03	99,46
40	Capão Alto	S	20,56	267,97	86,01
41	Bom Jardim da Serra	S	21,40	289,84	104,31
42	Capão Alto	S	17,32	267,97	92,73
43	Capão Alto	T	43,71	246,09	77,81
44	Capão Alto	S	19,78	262,50	89,83
45	Capão Alto	S	23,50	240,63	88,63
46	Lages	T	39,19	218,75	98,49
47	Piratuba	S	38,85	278,91	80,68
48	Capão Alto	T	42,57	278,91	92,04
49	Oeste de SC	T	33,91	320,20	82,72
50	Lebon Régis	S	20,45	246,09	90,94
51	Cunha Porá	T	35,25	251,56	92,70
52	Cunha Porá	S	17,96	257,03	79,65
53	Cunha Porá	T	47,73	306,25	82,42
54	Cunha Porá	T	33,59	267,97	89,94
55	Cunha Porá	S	18,43	251,56	81,54
56	Cunha Porá	S	18,89	262,50	79,39
57	Cunha Porá	T	36,01	202,34	83,28
58	Cunha Porá	T	36,93	273,44	88,93
59	Bom Jardim da Serra	S	15,86	262,50	81,93
60	Lebon Régis	S	18,78	310,20	94,03
61	Painel	T	35,50	235,16	84,97
62	São Joaquim	S	20,55	284,38	86,79
63	São Joaquim	T	36,59	191,41	88,51
64	Campo Belo do Sul	T	33,00	240,63	83,20
65	Lebon Régis	S	22,85	262,50	86,41
66	Santa Maria (RS)	T	38,05	270,70	82,28
67	Silveira Martins (RS)	T	35,60	270,76	78,13
68	Lagoa Vermelha (RS)	T	51,51	251,56	80,37
69	Bocaina do Sul	S	51,51	267,97	94,37
70	-	T	31,72	251,56	83,27
73	-	S	21,44	267,97	81,63
74	Irineópolis	T	18,01	295,31	87,72

conclusão

Tabela 03 - Identificação, origem da coleção, tipo de faseolina, peso de 100 sementes, proteína total e solúvel dos 112 genótipos da safra 2005/06 do BAF, UDESC, Lages.

BAF	Origem da Coleção	Tipo de Faseolina	Peso de 100 sementes (g)	Proteína Total (g.kg ⁻¹)	Proteína Solúvel (g.kg ⁻¹)
75	Formigueiro (RS)	S	20,37	273,44	85,77
76	Formigueiro (RS)	T	30,86	238,84	88,37
77	Formigueiro (RS)	S	16,76	282,19	100,23
78	Lebon Régis	S	17,32	257,03	92,55
79	Formigueiro (RS)	S	20,47	285,70	74,32
80	Fraiburgo	S	19,58	267,97	84,09
81	Lebon Régis	S	17,04	251,56	91,46
83	Pinheiro Machado (RS)	S	28,58	246,09	93,83
84	Pinheiro Machado (RS)	S	19,59	257,03	85,66
85	Pinheiro Machado (RS)	S	20,15	236,67	94,16
86	Pinheiro Machado (RS)	S	19,09	273,44	87,89
87	Fraiburgo	S	50,12	262,50	82,49
88	Curitibanos	T	41,45	218,75	74,79
89	Curitibanos	T	47,75	235,16	88,34
90	Lebon Régis	T	31,05	218,75	82,44
91	Fraiburgo	T	33,00	251,56	88,93
92	Fraiburgo	S	16,21	262,50	80,04
93	Bom Retiro	T	39,72	289,84	86,63
95	Pinheiro Machado (RS)	S	18,36	267,97	80,35
96	Pinheiro Machado (RS)	T	35,42	300,78	83,66
97	Irai (RS)	T	47,01	278,91	82,40
98	Bagé (RS)	T	22,10	262,50	83,91
99	Bagé (RS)	T	38,33	278,91	87,38
101	Bagé (RS)	S	18,48	224,22	81,32
102	Goiânia (GO)	S	25,73	229,69	90,74
104	Piracicaba (SP)	S	19,79	235,16	83,00
106	Recife (PE)	T	30,91	248,22	85,56
108	Recife (PE)	S	26,94	245,50	85,96
109	Recife (PE)	S	24,98	229,69	79,32
110	Lages	S	25,25	278,91	129,27
111	Lages	S	21,07	311,72	98,49
112	Lages	S	21,90	278,91	91,83
113	Goiás–CNF5057	S ^a	19,50	311,72	105,12
114	Capão Alto	S	19,56	246,09	82,17
115	Lages	S	15,21	295,31	96,12
116	Goiás–CNF5493	H ^b	17,03	267,97	95,20
117	Goiás–CNF6551	T ^c	27,67	267,97	102,18
118	Goiás–CNF11513	B ^d	27,47	267,97	118,80
119	Goiás–CNF1446	C ^e	50,85	306,25	95,21
120	Lages	T	64,68	235,16	79,86
121	Lages	S	24,72	289,84	85,44
80SH	Lages	S	25,50	229,69	82,07
Média	-	-	28,12	262,00	88,50
CV %	-	-	2,93	4,00	4,00

BAF = Número da coleção dos genótipos do banco ativo de feijão do CAV-UDESC;

S^a = Sanilac, H^b = Pampa, T^c = Tendergreen, B^d = Boyaca e C^e = Contender;

Genótipos comerciais BAFs: 110 = Guará, 111 = Pérola, 112 = Uirapuru, 115 = BRS-Valente, 121 = Iapar 81 e 80SH = Carioca 80SH.

As características quantitativas (peso de 100 sementes, proteína total e proteína solúvel) apresentaram diferenças entre os genótipos através de análise univariada ($p < 0,05$). A análise multivariada indicou a contribuição relativa de cada característica para a diversidade genética (Tabela 04). O peso de 100 sementes foi o caractere que apresentou maior contribuição relativa para a divergência genética (D^2), com 91,67% (Tabela 04). Esta alta contribuição do peso de 100 sementes foi observada em análise com descritores de características agronômicas (COELHO *et al.*, 2007c) e por outros autores em estudos de diversidade genética (CHIORATO *et al.*, 2005; BENIN *et al.*, 2002; FONSECA & SILVA, 1999). As outras características avaliadas (proteína total e solúvel), apresentaram uma menor contribuição (8%) (Tabela 04).

Tabela 04 - Importância relativa dos caracteres analisados com base na divergência genética (D^2) para os 112 genótipos de feijão da safra 2005/06, BAF, UDESC, Lages.

Variáveis	Valor em %
Peso de 100 sementes	91,67
Proteína Solúvel	4,48
Proteína Total	3,85

Após a constatação da maior contribuição relativa baseada na distância genética, realizou-se uma análise de agrupamento (Scoot-Knoot) baseada no peso de 100 sementes, que revelou a separação de 11 grupos. Mas quando associado o peso de 100 sementes ao tipo de faseolina observou-se 2 grupos (Tabela 05). O primeiro grande grupo (grupos A, B, C, D, E, F, G e H) apresentou maior peso de 100 sementes (36,86 g), e a grande maioria foi classificada pelo tipo de faseolina “T” (77%). O segundo grande grupo obteve um menor peso de 100 sementes, em torno de 20,26 g (grupos I, J e K), com predominância do tipo de faseolina “S” (88%). As médias de peso de 100 sementes e tipo de faseolina foram similares aos resultados de outros autores, os quais observaram dois centros: Andes e América Central, com tipo de faseolina “T” e sementes grandes (>40 g/100 sementes) e cultivares exibindo predominantemente faseolina tipo “S”, sementes pequenas (<25 g/100 sementes), respectivamente (SINGH *et al.*, 1991a).

A análise de agrupamento apresentou diversidade genética também para a coloração do tegumento das sementes. No grupo Andino observaram-se sementes de tipo comercial: amarelo (7,6%), manteigão (32%), mulatinho (3,8%), colorido (22,6%), vermelho (15%), preto (15%), carioca (2%) e branco (2%). No grupo Mesoamericano foi verificado sementes

do grupo carioca (11,9%), branco (5%), vermelho (13,6%), preto (39%), colorido (18,6%), mulatinho (8,5%), amarelo (1,7%) e manteigão (1,7%) (Tabela 05, Figura 03 e 04). Os resultados obtidos concordam com a diversidade genética para a cor de sementes em outras cultivares (LOGOZZO *et al.*, 2006; DE LA CRUZ *et al.*, 2005). A maior fração de sementes com tegumento de coloração preto foi próxima à encontrada em sementes provenientes da América, de tipo de faseolina “S”, com a maior parte feijões pretos (47,2%) (LOGOZZO *et al.*, 2006). Esta variação observada no tamanho de sementes associada com a cor do tegumento preto reflete na preferência do consumidor do sul do Brasil.

O formato das sementes foi avaliado pelo coeficiente de J, o grau de achatamento pelo coeficiente de H, os quais apresentaram similaridades no agrupamento feito pelo peso de 100 sementes. O grupo Andino apresentou sementes com coeficiente J variando entre 2,25 a 1,50 cm, e o coeficiente de H variou entre 0,82 a 0,74 cm. Enquanto o grupo Mesoamericano apresentou sementes com coeficiente J variando entre 1,59 a 1,53 cm e coeficiente H entre 0,75 a 0,74 cm (Tabela 05). Os agrupamentos através do peso de 100 sementes, formato da semente ou grau de achatamento da semente podem ser usados em estudos de diversidade genética, porque apresentam alta correlação (85%). Estas variações das sementes com relação aos coeficientes (J e H) apresentadas no grupo Andino foram similares as cultivares de feijão comum e snap bean (SANTALLA *et al.*, 2004).

Tabela 05 - Agrupamento para os 112 genótipos de feijão baseado no peso de 100 sementes, classes comerciais, tipo de faseolina, coeficiente de J e H, na safra 2005/06 do BAF, UDESC, Lages.

Grupos	Genótipos (BAF)	Variação do Peso de 100 sementes (g)	Tipo de faseolina	Classes comerciais	Coeficiente J*	Coeficiente H*
A	120	64,68	T	M	2,25	0,74
B	69,87,119	51,51–50,12	S,C	M,V	2,17	0,82
C	53,89,97	47,75–47,00	T	M,V,A	2,14	0,81
D	08,24,33,43,48,66,88	43,71–41,17	S,T	C,M,P	1,65	0,82
E	04,11,46,47,67,93,99	40,81–38,05	T,S	V,M,A,P	1,64	0,75
F	01,27,29,39,51,57, 58,61,63,68,96	37,43–35,25	T,S	M,P,V,C	1,53	0,79
G	30,32,49,54,64,70, 90,91	34,02–31,05	T	M,C,A,Mu	1,50	0,82

continua

conclusão

Tabela 05 - Agrupamento para os 112 genótipos de feijão baseado no peso de 100 sementes, classes comerciais, tipo de faseolina, coeficiente de J e H, na safra 2005/06 do BAF, UDESC, Lages.

Grupos	Genótipos (BAF)	Variação do Peso de 100 sementes (g)	Tipo de faseolina	Classes comerciais	Coeficiente J*	Coeficiente H*
H	03,06,28,31,34,36, 76,83,102,106,108, 117,118	30,91–25,58	T,S,B	C,M,V,P, Mu,Ca,B	1,62	0,76
I	02,09,13,15,21,23, 37,45,65,98,109, 110,121,SH80	25,50–22,23	S	Ca,V,C,P, M,Mu	1,59	0,75
J	10,14,18,19,20,22, 25,26,35,38,40,41, 44,50,56,60,62,73, 75,79,80,84,85,86, 104,111,112,113,114	21,90–18,80	S,T	P,V,Ca,C, B,A	1,57	0,74
K	05,07,17,42,52,55, 59,74,77,78,81,92, 95,101,115,116	18,40–15,20	S,T,H	B,P,C,Mu	1,53	0,75

Classes comerciais: M= manteigão, V = vermelho, P = preto, C = colorido, B = branco, Ca = carioca, Mu = mulatinho, A = amarelo.

* = Os resultados foram baseados nas médias dos genótipos dos grupos.

Diferenças significativas (Tukey, $p < 0,05$) foram encontradas conforme o tipo de faseolina e o formato da semente (comprimento, largura, espessura, coeficiente J, e coeficiente H), onde os genótipos do grupo Andino apresentaram maior tamanho das sementes (1,22 cm de comprimento; 0,73 cm de largura e 0,57 cm de espessura) comparado aos genótipos do grupo Mesoamericano (Tabela 06). As médias das dimensões das sementes e os tipos de faseolina foram similares à média observada no centro de origem Andina e Mesoamericana, por exemplo, tipo de faseolina “T” (Andes) apresentou 1,36 cm de comprimento, 0,82 cm de largura e 0,63 cm de espessura (GEPTS *et al.*, 1986).

O tamanho das sementes do grupo Andino apresentou 1,66 para coeficiente J e 0,78 para o coeficiente H (Tabela 06), estes foram próximos aos resultados obtidos por Santalla *et al.* (2004) nas cultivares das classes de feijão comum e snap bean do grupo Andino (1,9 e 0,76), respectivamente. Os resultados obtidos também foram similares aos encontrados em variedades comerciais do Brasil, tendo valores ao redor de 1,68 para o coeficiente J e 0,79 para o coeficiente H (DALLA CORTE *et al.*, 2003).

Com relação à classificação do formato da semente (coeficiente de J) e grau de achatamento da semente (coeficiente de H), observou-se que o grupo Mesoamericano (grupos I, J, K) predominou sementes elíptica e semi-cheia (Tabela 01 e 02). Já no agrupamento

Andino, observaram-se sementes: oblonga reniforme longa e semi-cheia (grupo A), oblonga reniforme longa e cheia (grupo B e C), formato elíptico e grau de achatamento caracterizado como semi-cheio (grupos D, E, F, H) e o grupo G sementes elípticas e cheias (Tabela 01 e 02).

Estes resultados demonstraram uma ampla variação de formato e grau de achatamento dentro dos grupos, confirmando a variabilidade existente no banco de germoplasma estudado.

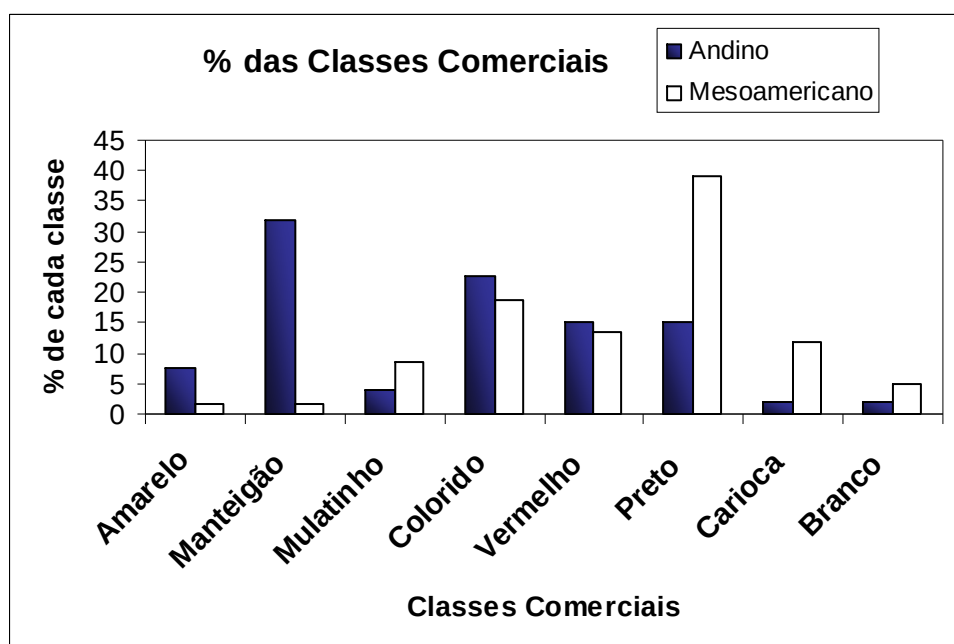


Figura 03 - Percentual das classes comerciais (amarelo, manteigão, mulatinho, colorido, vermelho, preto, carioca e branco) nos grupos Andino e Mesoamericano, da safra 2005/06 do BAF, UDESC, Lages.

Tabela 06 - Morfologia da semente dos 112 genótipos de feijão e sua relação com o grupo Andino e Mesoamericano, da safra 2005/06 do BAF, UDESC, Lages.

Média do tamanho das sementes (cm)*					
Grupos	Comprimento	Largura	Espessura	Coeficiente J	Coeficiente H
Andino	1,22a	0,73a	0,57a	1,66a	0,78a
Mesoamericano	0,99b	0,63b	0,47b	1,58b	0,74b

* Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($p < 0,05$).



Figura 04 - Diversidade de cor e tamanho de genótipos representativos do banco ativo de feijão (BAF), com seus agrupamentos (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e K), da safra 2005/06, UDESC, Lages.

4.2 DIVERSIDADE PARA O PERFIL TOTAL DAS PROTEÍNAS DE RESERVA

Com o objetivo de representar o comportamento das distribuições dos diferentes tipos de proteínas de reserva em um espaço de ordenação e comparar a correspondência entre os genótipos e as proteínas de reserva encontradas, realizou-se uma análise de correspondência

(AC), a partir da tabela de freqüência de pesos moleculares referentes a cada proteína gerada pelo método SDS-PAGE (Figura 05).

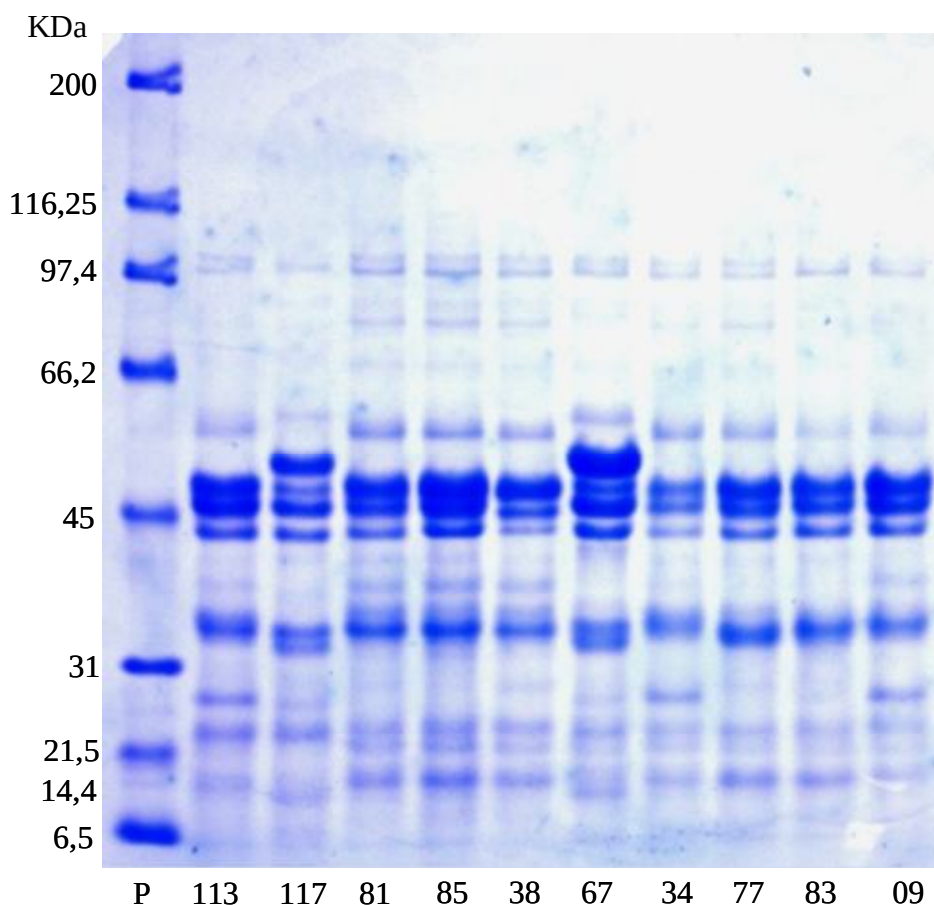


Figura 05 - Gel de poliacrilamida SDS-PAGE, com 20 µg de proteína, numa concentração de 15%, mostrando o perfil das proteínas de reserva de genótipos de feijão (BAFs: 113, 117, 81, 85, 38, 67, 34, 77, 83 e 09), onde a coluna P = padrão de peso molecular (6,5 a 200 KDa), da safra 2005/06, BAF, UDESC, Lages.

O modelo multivariado proposto pela AC permitiu a simplificação da complexação dos dados pela ordenação dos mesmos em eixos/dimensões. A alta variabilidade dos dados permitiu a decomposição em vários eixos, sendo os dois primeiros eixos responsáveis por explicarem conjuntamente 24,4% da variabilidade total dos dados. As dimensões 1 e 2 (eixos principais 1 e 2) explicaram 12,6% e 11,8%, respectivamente, da variabilidade total dos dados (Figura 06). A análise permitiu observar a maior ou menor associação das diferentes proteínas de reserva da semente com os genótipos avaliados, por meio da proximidade entre as variáveis (diferentes pesos das proteínas e genótipos), ou seja, quanto mais próximas as variáveis, mais freqüentes são suas ocorrências conjuntas. A análise de correspondência permitiu a visualização através do gráfico a formação de cinco grupos distintos formados por

diferentes genótipos associados pela maior frequência relativa de ocorrência de diferentes proteínas.

Desta forma visualizou ao longo da dimensão 1 (eixo principal 1), o grupo I formado pelos genótipos (BAFs: 92, 96, 90, 101, 93, 98, 102, 97, 95, 91, 89 e 99) , os quais estão dispostos na porção mediana superior. Estes genótipos estão fortemente associados a maior frequência de ocorrência conjunta das proteínas encontradas em faixas de peso molecular de 14 a 26 KDa e de 55 a 184 KDa. (Figura 06)

Os genótipos (BAFs: 44, 37, 38, 47, 38, 39, 43, 48, 40, 45, 37, 44), representados pelo grupo II encontram-se na porção mediana, e estão associados a altas frequências das proteínas representadas nas faixas de peso molecular de 55-184 KDa e em menores frequências encontram-se proteínas de 14-26 KDa, lectinas (27-34 KDa) e arcelinas (36-42 KDa), o que permitiu constatar uma grande variabilidade com relação à frequência das proteínas de reserva (Figura 06).

O grupo III está disposto na porção inferior à extrema esquerda, este grupo é composto por 25 genótipos (BAFs: 4, 6, 27, 11, 2, 10, 13, 1, 7, 8, 9, 88, 5, 76, 80, 86, 3, 83, 84, 79, 77, 78, 81, 85 e 87). Neste grupo houve uma alta frequência das proteínas de reserva dentro de faixas de peso de 14-26 KDa e 55- 184 KDa, e as faseolinas em menor frequência (Figura 06).

O grupo IV pode ser identificado na porção inferior central, está composto por 13 genótipos (BAFs: 112, 121, 18, 21, 22, 15, 20, 24, 17, 19, 13, 14 e 16), e apresentou uma alta frequência de proteínas variando de 55-184 KDa.

O último grupo visualizado é o grupo V, localizado na porção inferior a extrema direita, foi composto pelos genótipos BAFs: 118, 104, 108, 112, 116, 110, 115, 111, 114 e 109 e foram agrupados por apresentarem uma maior frequência de proteínas de 14-26 KDa e menor expressão das faseolinas. As proteínas dispostas na porção mediana da Figura 06 não se associaram especificamente a nenhum genótipo e apresentaram pouca contribuição para a variabilidade total (Figura 06).

A análise de correspondência demonstrou que as faseolinas apesar de representar a maior fração das proteínas de reserva no grão de feijão apresentou pouca contribuição para a variabilidade total dos genótipos. Portanto, as demais proteínas de reserva contribuíram mais representativamente para a diversidade avaliada entre os genótipos. A faixa de peso molecular das proteínas que foram mais abundantes variaram entre 54-184 KDa. Tal caracterização das proteínas de reservas dos grãos nos diferentes genótipos permite o uso de genótipos contrastantes em estudos ligados à especificidade destas proteínas de reserva.

Apesar dos genótipos (BAFs: 48, 33, 113, 65) não se enquadrarem em nenhum dos grupos observados, estes tem uma forte associação com as lectinas e estas podem estar diretamente relacionadas a mecanismo de defesa da planta, como também na germinação da semente, portanto estes genótipos devem ser estudados a nível bioquímico e fisiológico da semente, para entender a presença e a atuação destas proteínas de reserva dos grãos.

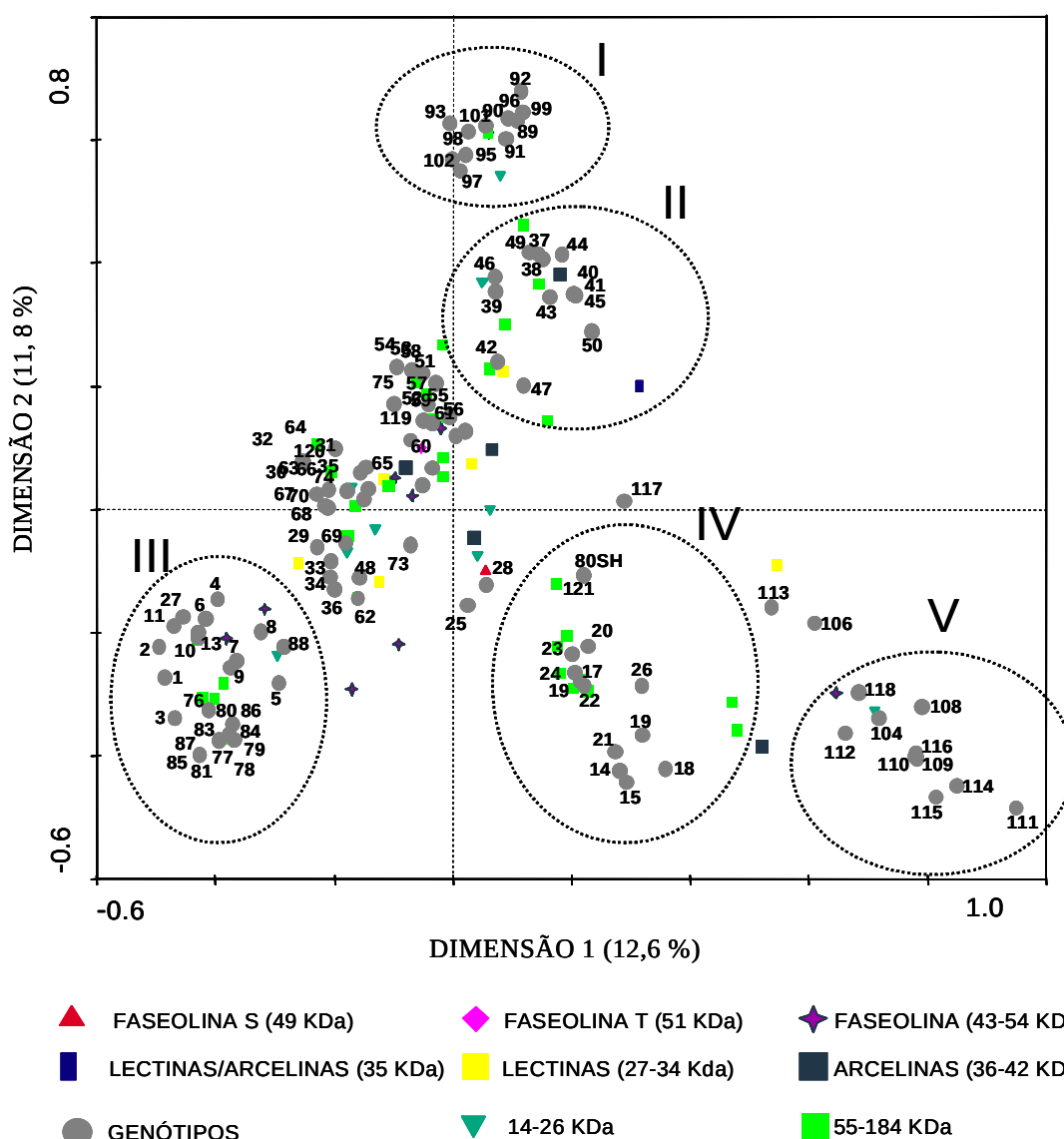


Figura 06 - Relação entre os eixos (dimensões) 1 e 2 da análise de correspondência (AC), baseado as faixas representativas dos pesos moleculares do perfil total das proteínas de reserva dos grãos de 112 genótipos da safra 2005/06 do BAF, UDESC, Lages.

Somente o grupo II apresenta associação com as frequências das arcelinas e lectinas. Os genótipos pertencentes a este grupo, particularmente os mais ligados as arcelinas podem ser indicados para identificar características de resistência a insetos, especificamente os brucídeos, que são comuns durante o armazenamento das sementes de feijão.

Os grupos IV e V associaram somente as faixas de proteína entre 55-184 KDa e 14 - 26 KDa, respectivamente. Estas faixas protéicas não representam as frações de proteína de reserva mais abundantes no grão, porém merecem estudos mais detalhados, para identificar a função destas proteínas como possíveis pontos de controle.

4.3 DIVERSIDADE DE NUTRIENTES NOS GRÃOS DE FEIJÃO

A análise de variância mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os genótipos avaliados nas duas safras, para todos os nutrientes estudados. Observou-se que os teores de ferro variaram entre 62 (BAF 33) a 124 mg.kg⁻¹ (BAF 04) na safra 1 e de 90,67 (BAF 75) a 161,68 mg.kg⁻¹ (BAF 36) para safra 2. Tendo em média 87,95 e 101,90 mg.kg⁻¹ na safra 1 e 2 respectivamente (Tabela 07). Estes resultados foram superiores tanto aos trabalhos realizados com linhagens, que apresentam uma variação entre 71,37 a 126,9 mg.kg⁻¹ (MESQUITA *et al.*, 2007) ou trabalhos com cultivares e genótipos crioulos, com uma variação entre 60 a 96 mg.kg⁻¹ para os crioulos e 55 a 89 mg.kg⁻¹ em feijões cultivados (BEEBE *et al.*, 2000a).

Sabendo da importância do ferro na dieta de adultos e principalmente crianças, observaram-se genótipos crioulos (BAFs: 36, 108 e 39) que contribuíram neste aspecto, pois tais genótipos apresentaram altos teores de ferro 161, 124 e 119 mg.kg⁻¹, respectivamente (Tabela 07), o que enfatiza a importância da caracterização dos genótipos provenientes de bancos de germoplasma.

Os teores de zinco nos grãos, no presente estudo, variaram de 32 (BAF 74) a 54,58 mg.kg⁻¹ (BAF 25) na safra 1; e 34 (BAF 75) a 68 mg.kg⁻¹ (BAF 108) na safra 2 (Tabela 07); os quais foram superiores a vários trabalhos (HOUSE *et al.*, 2002; BEEBE *et al.*, 2000a; SGARBIERI, 1989). Pois, Beebe *et al.* (2000b), que relatam uma faixa de 29 a 43 mg.kg⁻¹ para genótipos selvagens e 35 a 54 mg.kg⁻¹ para genótipos comerciais.

A caracterização destes genótipos é apontada como um fator importante também por outros autores, os quais sugerem que o conteúdo de ferro e zinco dos grãos de feijão pode ser incrementado a partir de genótipos crioulos. Tais trabalhos citam um incremento no conteúdo de ferro entre 60 a 80%; e para zinco em 50% (BEEBE *et al.*, 2000b).

O Zn e Fe apresentaram teores contrastantes nos genótipos aqui estudados, os quais possuem potencial para serem incorporados em programas de melhoramento com o intuito de aumentar o teor destes micronutrientes nos grãos para consumo, visto que os grãos de leguminosas, na sua maioria, apresentam elevados teores de antinutrientes, como o fitato (COELHO *et al.*, 2007a).

O teor cálcio encontrado nos grãos de feijão apresentou uma variação entre 0,28 g.kg⁻¹ (BAF 07) a 0,56 g.kg⁻¹ (BAF 56) a para a safra 2; e 0,25 g.kg⁻¹ (BAF 58) a 0,95 g.kg⁻¹ (BAF 108) na safra 1 (Tabela 07). Estes teores foram mais baixos dos que se observou por alguns autores em trabalho com feijões crioulos (0,32 a 0,64 g.kg⁻¹) (BEEBE *et al.*, 2000b), como também apresentados em variedades comerciais, 0,6 a 2,0 g.kg⁻¹ (SGARBIERI, 1989).

Os teores de magnésio foram maiores na safra 1 e variaram entre 1,70 – 2,79 g.kg⁻¹, enquanto para a safra 2 os teores apresentaram-se entre 0,63 – 1,23 g.kg⁻¹ (Tabela 07), estes teores estão próximos aos encontrados em variedades comerciais (1,23 – 2,20 g.kg⁻¹) (SGARBIERI, 1989). O magnésio é requerido por muitas enzimas, atribuindo papel importante como cofator enzimático.

Já para o teor de fósforo, observou-se uma variação entre 2,84 (BAF 67) a 5,87 g.kg⁻¹ (BAF 121) para a safra 1; e 4,0 (BAF 62) a 5,45 g.kg⁻¹ (BAF 07) na safra 2. Enquanto, o teor de ácido fítico variou de 3,48 (BAF 110) a 10,93 g.kg⁻¹ (BAF 58) na safra 1; e 2,38 (BAF 112) a 7,55 g.kg⁻¹ (BAF 115) na safra 2 (Tabela 08). Os teores de ácido fítico e fósforo total encontrados foram menores do que os apresentados por Coelho *et al.* (2002). Sabendo da função do fitato como antinutriente, ou seja, da sua característica de complexar minerais e proteínas, na ausência da enzima fitase. Estes baixos teores de fitato encontrados em vários genótipos no banco de germoplasma podem ser indicados para estudos tanto em nível de melhoramento da cultura, quanto a nível bioquímico.

Os teores de potássio nos grãos variaram entre 11,82 (BAF 39) a 15,65 g.kg⁻¹ (BAF 07) na safra 2, e 12,84 (BAF 110) a 20,21 g.kg⁻¹ (BAF 13). Com base nos resultados médios de K de todos os genótipos, observou-se 16,4 e 12,98 g.kg⁻¹ nas safras 1 e 2, respectivamente (Tabela 7). Como o potássio é um nutriente facilmente eliminado em condições de baixa qualidade fisiológica da semente, estes altos teores de potássio encontrados sugerem uma melhor qualidade fisiológica, mas esta hipótese ainda precisa ser estudada. O potássio tanto para o ser humano, como para os vegetais está envolvido no balanço e distribuição de água, no equilíbrio osmótico, no equilíbrio ácido-base, e promove o crescimento celular.

O BAF 108, na safra 2, destacou-se com altos teores de ferro, zinco, proteína total e fósforo: 124 mg.kg⁻¹, 68 mg.kg⁻¹, 246,09 g.kg⁻¹ e 5,34 g.kg⁻¹, respectivamente, e apresentou baixos teores de fitato (4,3 g.kg⁻¹) (Tabela 07 e 08). Isto corrobora com outros autores que encontram um alto teor de proteína associado ao alto teor de ferro (MESQUITA *et al.*, 2007), e contraria outros trabalhos que citam uma correlação positiva entre proteína e fitato (COELHO *et al.*, 2002; RABOY *et al.*, 1984). Esta correlação positiva é uma dificuldade para os programas de melhoramento, pois com o aumento da proteína normalmente ocorre o

aumento no teor de fitato, o qual é um antinutriente. Além do BAF 108, tal relação foi observada em outros genótipos do banco (BAFs: 60, 69) o que enfatiza o uso destes genótipos para consumo, serem incorporados nos programas de melhoramento, e estudos a nível bioquímico, para entender os mecanismos fisiológicos envolvidos no acúmulo destes nutrientes nos grãos. Como por exemplo, o gene da MIPS, que foi considerado um ponto de controle na síntese de fitato (COELHO *et al.*, 2007b).

Dentre os genótipos avaliados também se destacaram o BAF 67 e 68 por terem baixos teores da grande maioria dos nutrientes avaliados. Ambos apresentaram baixos teores de: fósforo BAF 67 (2,84 g.kg⁻¹) e BAF 68 (4,16 g.kg⁻¹), ferro BAF 67 (77,76 mg.kg⁻¹) e BAF 68 (68 g.kg⁻¹), zinco BAF 67 (34 mg.kg⁻¹) e BAF 68 (40 mg.kg⁻¹), cálcio BAF 67 e BAF 68 (0,3 g.kg⁻¹) (Tabela 7 e 8). Esta diversidade genética observada nos teores de nutrientes associada aos valores contrastantes é uma característica fundamental na seleção dos parentais para obter maior segregação gênica para tais caracteres e conseqüentemente maior ganho genético (MACHADO *et al.*, 2000).

Além da aplicação da diversidade para o melhoramento, esta pode ser utilizada para estudar os mecanismos de controle de acúmulo destes nutrientes nos grãos. Em concordância com Guzmán-Maldonado *et al.* (2000), o qual cita que tais compostos são facilmente encontrados em genótipos selvagens e crioulos, e pouco compreendidos os mecanismos de controle destes nutrientes.

Através da análise univariada, detectou-se efeito significativo de genótipo ($p < 0,05$), para todos os caracteres avaliados (proteína total e solúvel, cálcio, magnésio, ferro, zinco, fósforo total, fitato e potássio), indicando a presença de diversidade genética para tais caracteres.

Depois de identificado o efeito de genótipo, realizou-se a análise multivariada separadamente para cada safra (1, 2), com o objetivo de indicar a contribuição relativa dos caracteres (nutrientes) para diversidade, com base na distância generalizada de Mahalanobis (SINGH, 1981), e posterior agrupamentos dos genótipos mais semelhantes.

Com base na análise multivariada, observou-se na safra 1 uma maior contribuição relativa do teor de cálcio (23%), seguido pelo teor de fitato (17,76%), zinco (13,94%), fósforo total (11,42%) e ferro (9,56%), o que o representou um total de 76%. As outras características (proteína solúvel, magnésio, potássio e proteína total) contribuíram em 24% da divergência observada (Tabela 09). Tais percentuais obtidos na contribuição demonstraram que os nutrientes contribuem de forma semelhante na separação dos genótipos.

Na safra 2, o teor de fitato foi o caráter que apresentou maior contribuição relativa para a divergência genética (D^2), com 26,2%. Seguido pelo teor de magnésio (16%), ferro (10,86%), proteína solúvel (10,40%) e zinco (10,13%). As outras características avaliadas (cálcio, fósforo total, potássio e proteína total) apresentaram menores contribuições (Tabela 09).

Apesar das contribuições relativas de cada nutriente para a diversidade serem diferentes em cada safra, observou-se que a maioria dos genótipos do grupo 1 (safra 1) foi coincidente como os genótipos do grupo 1 (safra 2), quais foram: 40, 13, 115, 55, 56, 19, 50, 41, 121, 74, 62, 28, 68, 04, 60 e 69, demonstrando que estes genótipos foram mais estáveis em diferentes anos de cultivo, ou seja pouco efeito do ambiente sobre o teor de nutrientes acumulados nos grãos (Tabela 10).

A partir do cálculo da distância generalizada (Mahalanobis), fez-se o agrupamento dos genótipos considerando todos os caracteres avaliados. O método usado foi pela otimização de Tocher, fundamentado na dissimilaridade, expressa pelas distâncias de Mahalanobis possibilitou a distribuição dos 34 genótipos em 7 grupos distintos na safra 1 e 2 (Tabela 9).

Na safra 1, o grupo I foi composto por 26 genótipos, correspondendo a 76% dos genótipos estudados, predominou o tipo de faseolina “S” (69%). O grupo 2, foi constituído por 3 genótipos, todos com tipo de faseolina “T”. Com exceção do grupo 3, os demais grupos (4, 5, 6 e 7) apresentaram tipo de faseolina “S” e foram compostos por apenas 1 genótipo (Tabela 10).

Na safra 2, o grupo 1 foi constituído pela maior parte dos genótipos analisados (22), e contribuiu com 63% de genótipos do tipo de faseolina “S”, muito próximo ao obtido na safra 1 (69%). O grupo 2 apresentou 5 genótipos, destes 3 com tipo de faseolina T. O grupo 3 e 4 apresentou 2 genótipos, enquanto os grupos 5, 6 e 7 por apenas 1 genótipo, com a maioria tipo de faseolina “S” (Tabela 10).

A grande maioria dos genótipos safra 1 (76%) e safra 2 (65%) foram agrupados pelo método de Tocher no grupo 1. Este método não foi sensível suficientemente para separar os genótipos quanto à diversidade observada para os teores de nutrientes nos grãos, nas duas safras de avaliação. Além disso, não existe um nutriente específico para separar os genótipos quanto à diversidade observada.

Tabela 07 - Teor de ferro, zinco (mg.kg^{-1}) e cálcio, magnésio e potássio (g.kg^{-1}) em grãos de feijão na safra (1) 2005/06 e safra (2) 2006/07, referente a 34 genótipos do BAF, UDESC, Lages.

BAF	Ferro (mg.kg^{-1})		Zinco (mg.kg^{-1})		Cálcio (g.kg^{-1})		Magnésio (g.kg^{-1})		Potássio (g.kg^{-1})	
	Safra 1	Safra 2	Safra 1	Safra 2	Safra 1	Safra 2	Safra 1	Safra 2	Safra 1	Safra 2
03	106,00	109,57	46,00	43,83	0,53	0,46	2,25	1,15	19,51	13,54
04	124,00	100,00	34,00	40,00	0,45	0,31	2,31	0,95	18,25	12,32
07	120,00	99,47	44,00	45,78	0,33	0,28	2,79	1,07	18,48	14,56
10	106,00	107,90	42,00	63,86	0,48	0,38	2,34	0,92	17,06	12,76
13	88,00	82,16	47,30	51,90	0,43	0,49	2,09	0,94	20,21	13,90
19	76,00	103,47	40,00	41,80	0,55	0,39	2,46	1,13	18,58	14,14
25	80,00	95,70	54,58	52,50	0,33	0,54	2,46	0,95	18,29	11,93
28	88,00	81,67	43,28	40,00	0,28	0,29	1,95	1,04	17,06	14,43
33	62,00	106,00	38,00	39,92	0,33	0,44	1,79	1,02	16,01	13,52
36	74,00	161,68	41,30	45,91	0,33	0,36	2,09	1,21	17,81	14,04
39	80,00	119,52	34,00	39,84	0,28	0,39	2,10	0,91	18,48	10,92
40	86,00	95,82	44,00	45,91	0,58	0,38	1,95	1,01	19,35	13,65
41	88,00	110,00	38,98	41,96	0,45	0,45	2,15	0,99	18,06	11,71
42	102,00	104,00	46,00	40,00	0,53	0,49	2,10	0,96	19,98	13,27
44	85,00	94,00	66,00	40,00	0,63	0,44	2,01	1,05	17,11	13,15
46	88,00	107,80	44,00	42,00	0,33	0,30	1,98	0,63	14,76	11,32
50	78,00	113,77	40,00	43,78	0,35	0,34	2,48	1,03	16,14	12,61
55	94,00	100,00	46,00	44,00	0,58	0,43	2,54	1,17	15,20	12,54
56	86,00	99,88	40,00	42,00	0,61	0,56	2,27	1,01	17,68	14,03
57	92,00	84,00	44,00	38,00	0,53	0,33	2,18	1,08	16,73	12,67
58	72,00	105,45	44,00	40,00	0,25	0,48	1,88	1,02	13,28	13,38
60	82,00	100,00	44,00	47,90	0,30	0,30	2,52	1,04	14,79	13,28
62	66,00	95,81	38,00	35,86	0,65	0,40	2,24	1,06	14,04	12,21
67	82,36	77,76	34,00	41,88	0,55	0,33	1,95	1,09	11,54	11,85
68	68,00	83,45	40,00	40,00	0,30	0,30	1,94	0,98	18,38	14,33
69	104,50	104,00	40,00	40,00	0,60	0,39	1,80	0,95	13,99	13,41
74	88,00	104,00	32,00	40,00	0,55	0,38	2,09	1,17	13,04	11,79
75	96,00	90,67	40,00	34,00	0,43	0,35	1,85	1,06	15,53	13,88
108	86,00	124,00	40,00	68,00	0,95	0,45	2,46	1,05	14,25	14,03
110	90,50	85,40	50,00	43,86	0,41	0,35	1,82	0,96	12,84	12,30
111	94,00	94,00	52,00	50,00	0,38	0,56	2,42	1,31	13,68	12,80
112	74,00	88,00	42,00	54,00	0,48	0,35	2,00	1,07	16,63	11,23
115	88,00	132,00	50,00	40,00	0,55	0,35	1,99	0,89	17,59	12,35
121	96,00	103,70	42,00	53,47	0,63	0,40	1,70	1,25	13,48	13,78
Média	87,95	101,90	42,98	44,47	0,47	0,39	2,14	1,03	16,40	12,99
CV %	5,45	4,37	3,88	3,38	6,50	3,08	5,20	2,00	5,50	2,50

Tabela 08 - Teor de fósforo, fitato, proteína total e proteína solúvel (g.kg^{-1}) em grãos de feijão na safra (1) 2005/06 e safra (2) 2006/07, referente a 34 genótipos do BAF, UDESC, Lages.

	Fósforo		Fitato		Proteína Total		Proteína Solúvel	
	g.kg ⁻¹							
BAF	Safra 1	Safra 2	Safra 1	Safra 2	Safra 1	Safra 2	Safra 1	Safra 2
03	5,18	4,96	7,96	5,85	289,84	278,91	89,48	102,10
04	4,88	5,51	7,50	4,36	295,31	232,42	98,39	84,06
07	5,64	5,77	9,46	3,41	295,31	254,30	88,48	86,83
10	4,68	4,83	6,88	6,58	267,97	223,13	74,82	92,74
13	5,29	4,53	8,23	4,40	306,25	248,83	91,86	83,91
19	5,60	5,28	7,42	5,33	278,91	224,22	98,64	90,99
25	5,27	5,38	7,70	5,30	278,91	270,70	98,02	94,08
28	4,95	5,17	7,25	5,58	235,16	226,95	90,89	98,99
33	3,48	4,50	5,70	5,84	262,50	218,75	102,37	87,92
36	5,07	5,65	8,95	7,03	289,84	246,09	86,36	81,82
39	4,23	5,53	5,62	5,03	257,03	243,79	99,46	94,65
40	4,78	4,04	8,09	5,42	267,97	246,09	86,01	70,37
41	5,44	4,36	9,75	4,50	289,84	248,83	104,31	88,00
42	5,22	5,49	7,63	8,01	267,97	235,16	83,85	93,39
44	3,95	4,71	6,21	6,65	262,50	265,23	89,84	76,34
46	5,21	4,22	7,55	4,33	218,75	245,78	98,50	91,60
50	4,65	5,13	8,03	5,43	246,09	231,65	90,95	77,04
55	4,86	5,16	9,42	4,59	251,56	234,56	81,54	74,44
56	5,73	4,53	9,24	5,45	262,50	202,34	79,39	86,98
57	3,95	4,34	4,79	3,00	202,34	199,61	83,28	81,23
58	4,35	4,78	10,93	5,11	273,44	267,97	88,93	77,71
60	5,27	4,47	5,81	4,35	322,66	218,75	94,04	74,74
62	4,18	4,39	6,83	6,36	284,38	232,42	86,80	81,50
67	2,84	4,37	5,26	6,21	270,76	224,22	78,13	70,58
68	4,16	5,39	8,47	5,53	251,56	237,89	80,37	85,59
69	4,41	4,85	4,06	3,52	267,97	235,16	94,38	74,10
74	4,91	5,44	6,30	3,84	295,31	213,28	87,73	81,58
75	4,72	5,18	10,56	7,83	273,44	251,56	85,77	91,24
108	4,57	5,14	6,54	4,62	245,50	257,03	85,96	75,74
110	5,27	4,31	3,48	6,15	278,91	259,87	129,28	73,77
111	5,48	4,81	5,61	3,93	311,72	226,95	98,49	72,89
112	4,17	4,41	7,80	2,38	278,91	218,75	91,83	74,30
115	5,31	4,46	7,55	7,55	295,31	226,95	96,12	71,32
121	5,87	4,68	7,58	5,55	289,84	262,50	85,25	77,42
Média	4,81	4,88	7,36	5,27	272,54	238,55	91,16	82,94
CV %	3,54	2,63	5,12	3,34	4,34	2,42	3,47	2,04

Tabela 09 - Importância relativa dos caracteres analisados com base na divergência genética (D^2) para 34 genótipos de feijão, nas safras 1 (2005/06) e 2 (2006/07), do BAF, UDESC, Lages.

Variáveis	Valor em %	
	Safra 1	Safra 2
Cálcio (g.kg^{-1})	23,02	8,11
Fitato (g.kg^{-1})	17,76	26,20
Zinco (mg.kg^{-1})	13,94	10,13
Fósforo Total (g.kg^{-1})	11,42	9,18
Ferro (mg.kg^{-1})	9,56	10,86
Proteína Solúvel (g.kg^{-1})	7,66	10,40
Magnésio (g.kg^{-1})	7,52	16,00
Potássio (g.kg^{-1})	5,78	3,90
Proteína Total (g.kg^{-1})	3,34	5,22

Tabela 10 - Agrupamento com padrões de comportamento similares pelo método de Tocher, com base em 9 características avaliadas em 34 genótipos de feijão referente à safra 1 (2005/06) e 2 (2006/07), utilizando-se a distância generalizada de Mahalanobis (D^2), do BAF, UDESC, Lages.

Grupos	Genótipos	
	Safra 1	Safra 2
1	03, 04 ,10, 13 , 19 ,25, 28 ,36, 40 , 41 ,42,46, 50 , 55 , 56 ,57, 60 , 62 , 68 , 69 , 74 ,75,111,112, 115 , 121	04 ,07, 13 , 19 , 28 ,33, 40 , 41 ,44, 50 , 55 , 56 ,58, 60 , 62 ,67, 68 , 69 , 74 ,110, 115 , 121 ,
2	33,39,67	03,10,25,39,42
3	58	57,112
4	110	108,111
5	07	36
6	108	75
7	44	46

5 CONCLUSÕES

Conclui-se que existem dois grupos de feijão bem definidos no banco de germoplasma do CAV/UDESC, os quais foram relacionados com o centro de origem: Mesoamericano composto por sementes pequenas (20,6 g/100 sementes), predominando tipo de faseolina “S” (88%) e outro Andino com sementes grandes (36,68 g/100 sementes) e predominância do tipo de faseolina “T” (77%).

O peso de 100 sementes juntamente com tamanho, formato e cor das sementes contribuiu para diversidade genética.

A análise de correspondência identificou 2 grupos bem distintos entre si (IV e V), com maior frequência das proteínas na faixa 55-184 KDa e 14-26 KDa, os quais devem ser estudados mais a fundo para relacionar tais proteínas com características agronômicas importantes.

Os 34 genótipos de feijão que foram selecionados como representativos do banco de germoplasma também apresentaram uma ampla diversidade quanto ao teor de nutrientes nos grãos, o que foi evidenciado pela diferente contribuição de cada um destes nutrientes no agrupamento dos genótipos em ambas as safras (2005/06 e 2006/07).

Observaram-se genótipos que se destacaram em determinadas concentrações de nutrientes nos grãos, como o BAF 36 alto teor de ferro (161,68 mg.kg⁻¹), BAF 108 alto teor de ferro, zinco, proteína total e fósforo: 124 mg.kg⁻¹, 68 mg.kg⁻¹, 246,09 g.kg⁻¹ e 5,34 g.kg⁻¹, respectivamente, e apresentou baixos teores de fitato (4,3 g.kg⁻¹).

6 PERSPECTIVAS E APLICAÇÕES

A ampla diversidade constatada no banco ativo de feijão do CAV/UDESC serve de base para o agricultor como fonte de renda voltada à subsistência e para futuras pesquisas, como possibilitar diretamente através de programas de extensão de incentivo ao pequeno e médio agricultor, a preservação desta diversidade genética e uso destes genótipos diferenciais para agregar valor ao feijão produzido.

Outras alternativas, referem-se a estudos moleculares, particularmente, o gene da faseolina, para comprovar as diferenças entre os genótipos a nível de DNA. Em complementação, tais informações sobre os genótipos contrastantes nos teores de nutrientes possibilitam estudos de herança gênica destes caracteres e particularmente algumas proteínas que participem nos mecanismos regulatórios dos nutrientes nos grãos avaliados neste trabalho.

As perspectivas de estudos bioquímicos também devem ser consideradas, baseando-se nos genótipos contrastantes quanto aos teores de nutrientes e antinutrientes, visando identificar, durante o desenvolvimento dos grãos, pontos de controle que alterem o acúmulo final destes nutrientes nos grãos, preferencialmente aumentar proteínas e diminuir fitato, por exemplo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 1998. 574p.

ANTUNES, I.F.; TEIXEIRA, M.G.; CAMPOS, A.D.; *et. al.* Diversidade intrapopulacional em feijão crioulo como fonte de cultivares para nichos de mercado diferenciados. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v.2, p.1247-1250, 2007.

ANTUNES, P.L.; BILHALVA, A.B.; ELIAS, M.C.; *et. al.* Valor nutricional do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivares: Rico 23, Carioca, Piratã-1 e Rosinha-G2. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.1, p.12-18, 1995.

AOAC. Association of official analytical chemists. **Official Methods of Analysis**. 16 th. Washington: Association of official analytical chemists. 1995. 394p.

ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; *et. al.* **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS. 1996. 786p.

BALDI, G. & SALAMINI, F. Variability of essential amino acid content in seed of 22 *Phaseolus* species. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v.43, p.75-78, 1973.

BALLVE, R.M.L.; MEDINA-FILHO, H.P.; BORDIGNON, R. Identification of reciprocal hybrids in citrus by the broadness of the leaf petiole wing. **Brazilian Journal of Genetics**, São Paulo, v.20, n.4, p.697-702, 1997.

BEEBE, S.; GONZALEZ, A.V.; RENGIFO, J. Research on trace minerals the common bean. **Food and Nutrition Bulletin**, Boston, v.21, n.1, p.387-391, 2000a.

BEEBE, S.; SKROCH, P.W.; DUQUE, M.C.; *et. al.* Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. **Crop Science**, Canada, v.40, p.262-272, 2000b.

BENIN, G.; DE CARVALHO, F.I.F.; ASSMANN, I.C.; *et. al.* Identificação da dissimilaridade genética entre genótipos de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) do grupo preto. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.8, n.3, p.179-184, 2002.

BIC. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**. 50, 2007, Michigan. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative. Michigan: Michigan State University, 2007.

BLAIR, M.W.; ASTUDILLO, C.; BEEBE, S. Analysis of nutritional quality traits in an andean recombinant inbred line population. **Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v.48, n.1, p.52-53, 2005.

BLUM, H.; BEIER, H.; CROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p.93-99, 1987.

BORDIN, L.C.; COELHO, C.M.M.; SOUZA, C.A. Diversidade genética para a padronização do tempo e percentual de hidratação preliminar ao teste de cocção de grãos de feijão [Genetic diversity for standardization of the soaking content previously to the cooking quality test in common bean grains]. **Ciência Rural**, Santa Maria, 2008. No prelo.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye banding. **Analytical Biochemistry**, Amsterdam, v.72, n.3, p.248-259, 1976.

BROUGHTON, W.G.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; *et. al.* Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. **Plant and Soil**, Hague, v.252, p.55-128, 2003.

BROWN, J.W.S.; MA, Y.; BLISS, F.A.; *et. al.* Genetic variation in the subunits of globulin-1 storage protein of french bean. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v.59, p.83-88, 1981.

BROWN, J.W.S.; OSBORN, T.C.; BLISS, F.A.; *et. al.* Bean lectins 2: relationship between qualitative lectin variation in *Phaseolus vulgaris* L. and previous observations on purified bean lectins. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v.62, p.361-367, 1982.

BUCHBINDER, B.U. **Polysomal and messenger RNA directed in vitro synthesis and processing of phaseolin, the G1 seed storage protein of *Phaseolus vulgaris* L.** 1981. 89 p. Ph.D. Thesis – Department of Horticulture, University of Wisconsin, Wisconsin, 1981.

CHACÓN, M.I.; PICKERSGILL, S.B.; DEBOUCK, D.G. Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v.110, p.432-444, 2005.

CHERYAN, M. Phytic acid interactions in food systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Amherst, v.13, n.4, p.297-335, 1980.

CHIORATO, A.F.; CHIAVEGATO, M.B.; CARBONELL, S.A.M.; *et. al.* Diversidade genética de feijoeiro por meio de dados morfoagronômicos e moleculares. **Anais-VIII-Congresso Nacional de Feijão**, Goiânia, v.2, p.413-416, 2005.

COELHO, C.M.M.; BELLATO, C.M.; SANTOS, J.C.P.; *et. al.* Effect of phytate and storage conditions on the development of the hard to cook phenomenon in common beans. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Hoboken, v.87, p.1237-1243, 2007a.

COELHO, C.M.M.; BENEDITO, V.A.; FIGUEIRA, A.; *et. al.* Variation in the enzyme activity and gene expression of myo-inositol-3-phosphate synthase (MIPS) and phytate accumulation during seed development in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Acta Physiologia Plantarum**, v.29, p.265-271, 2007b.

COELHO, C.M.M.; COIMBRA, J.L.M.; SOUZA, C.A.; *et. al.* Diversidade Genética em acessos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.5, p.1241-1247, 2007c.

COELHO, C.M.M.; GARCIA, A.K.; CERONI, C.E.; *et. al.* Proteínas de reserva possivelmente relacionadas com a síntese de fitato em grãos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Anais: 50 Congresso Brasileiro de Genética**, Florianópolis, v.1, p.1237-1237, 2004.

COELHO, C.M.M.; SANTOS, J.C.P.; TSAI, S.M.; *et. al.* Seed phytate content and phosphorus uptake and distribution in dry bean genotypes. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Pelotas, v.14, n.1, p.51-58, 2002.

COELHO, C.M.M.; SCHMIDT, D.; ZÍLIO, M. Uso das características morfológicas dos grãos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) como indicativo do menor tempo cocção. **Ciência Rural**, Santa Maria, 2008. No prelo.

COELHO, C.M.M.; TSAI, S.M.; VITORELLO, V.A. Dynamics of inositol phosphate pools (tris-, tetrakis- and pentakisphosphate) in relation to the rate of phytate synthesis during seed development in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Plant Physiology**, Amsterdam, v.162, p.1-9, 2005.

COELHO, C.M.M.; ZÍLIO, M.; PIAZZOLI, D.; *et. al.* Influência das Características Morfológicas e Físicas dos Grãos de Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) na sua Capacidade de Hidratação e Cocção. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, n.1, p.105-107, 2007d.

CONAFE. VIII Congresso Nacional de Feijão, 8, 2005, Goiânia. **Anais do VIII Congresso Nacional de Feijão**. Goiânia:Embrapa Arroz e Feijão, 2005.

CONNER, A.J.; MERCER, C.F. Breeding for success: diversity in action. **Euphytica**, Wageningen, v.154, p.261-262, 2007.

CQFS-RS/SC. **Manual de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo - Núcleo Regional Sul/UFRGS, 2004. 400p.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. 579p.

D' AGOSTINI, V.; LOURENÇO, F.X.; DIAS, H.T.E. O feijão pela ótica do agricultor familiar. **Anais da III Reunião Técnica Catarinense do Milho e do Feijão**, Chapecó, v.1, p.68-70, 2001.

DALLA CORTE, A.; MODA-CIRINO, V.; SCHOLZ, M.B.S.; *et. al.* Environment effect on grain quality in early common bean cultivars and lines. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v.3, n.3, p.193-202, 2003.

DE LA CRUZ, E.P.; GEPTS, P.; MARÍN, P.C.G.; *et. al.* Spatial distribution of genetic diversity in wild populations of *Phaseolus vulgaris* L. from Guanajuato and Michoacán, México. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Witzenhhausen, v.52, p.589-599, 2005.

EPAGRI. **Atlas climatológico do Estado de Santa Catarina**. Disponível em: <<http://ciran.epagri.rct-sc.br>>. Acesso em: 20 Set 2006.

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.

FONSECA, J.R. & SILVA, H.T. Identificação de duplicidades de acessos de feijão por meio de técnicas multivariadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.3, p.409-414, 1999.

GEPTS, P. Plant genetic resources conservation and utilization: The accomplishments and future of a societal insurance policy. **Crop Science**, Canada v.46, p.2278-2292, 2006.

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

GEPTS, P.; KMIECIK, K.; PEREIRA, P.; *et. al.* Dissemination pathways of the common beans (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability. I. The Americas. **Economic Botany**, Louis, v.42, p.73-85, 1988.

GEPTS, P.; OSBORN, T.C.; RASHKA, K.; *et. al.* Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common beans (*Phaseolus vulgaris*): Evidence for multiple centers of domestication. **Economic Botany**, Louis, v.40, p.451-468, 1986.

GRATTAPAGLIA, D.; CHAPARRO, J.; WILCOX, P.; *et.al.* Genetic diversity among wild common beans from northwestern Argentina based on morpho-agronomic and RAPD data. **Applications of RAPD Technology to Plant Breeding**, Minneapolis, v.1, p.37-40, 1992.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O.; REIS, M.S.; *et. al.* A diversidade dos recursos genéticos vegetais e a nova pesquisa agrícola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.3, p.521-528, 1998.

GUUZMÁN-MALDONADO, S.H.; GALLEGOS-ACOSTA, J.; LÓPEZ-PAREDES, O. Protein and mineral content of a novel collection of wild and weedy common bean (*Phaseolus vulgaris* L). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Hoboken, v.80, n.1, p.1874-1881, 2000.

HOUSE, W.A.; WELCH, R.M.; BEEBE, S.; *et. al.* Potential for increasing the amounts of bioavailable zinc in dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) through plant breeding. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Hoboken, v.82, n.1, p.1452-1457, 2002.

KLOZOVÁ, E. & TURKOVÁ, V. Variability of some seed proteins of the species *Phaseolus vulgaris* and their relationship to phytohemagglutinating activity. **Plant Biology**, Berlin, v.20, p.129-133, 1978.

KOENIG, R. & GEPTS, P. Segregation and linkage of genes for seed proteins, isozymes, and morphological traits in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Heredity**, Oxford, v.80, p.455-459, 1989.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970.

LATTA, M. & ESKIN, M. A simple method for phytate determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v.28, n.6, p.1313-1315, 1980.

LIENER, I.E. Phytohemagglutinins (phytolectins). **Plant Physiology**, Rockville, v.27, p.291-319, 1976.

LIS, H. & SHARON, N. The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.42, p.541-574, 1973.

LOGOZZO, G.; DONNOLI, R.; MACALUSO, L.; *et. al.* Analysis of the contribution of Mesoamerican and Andean gene pools to European common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm and strategies to establish a core collection. **Genetic Resources Crop Evolution**, Heidelberg, v.54, p.1763-1779, 2006.

MA, Y. & BLISS, F.A. Seed proteins of common bean. **Crop Science**, Canada, v.18, p.431-437, 1978.

MACHADO, C.F.; SANTOS, J.B.; NUNES, G.H.S. Escolha de genitores de feijoeiro por meio da divergência avaliada a partir de caracteres morfo-agronômicos. **Bragantia**, Campinas, v.59, n.1, p.547-560, 2000.

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

MACIEL, F.L.; GERALD, L.T.S.; ECHEVERRIGARAY, S. Variation of phaseolin and other soluble proteins among cultivars and landraces of common beans of south-Brazil. **Journal of Genetics and Breeding**, Ithaca, v.53, p.149-154, 1999.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, A.S. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2 ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989. 201p.

MARTINS, A.P.L. & REISSMANN, C.B. Material vegetal e as rotinas de laboratoriais nos procedimentos químico-analíticos. **Scientia Agrária**, Piracicaba, v.8, n.1, p.1-17, 2007.

MESQUITA, F.R.; CORRÊA, A.D.; ABREU, C.M.P.; *et. al.* Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): Composição química e digestibilidade protéica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.1, p.1114-1121, 2007.

MORAGHAN, J.T. & GRAFTON, K. Genetic diversity and mineral composition of common bean seed. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Hoboken, v.81, n.1, p.404-408, 2001.

OSBORN, T.C. Genetic control of bean seed protein. **Plant Science**, v.7, n.1, p.93-116, 1988.

OSBORN, T.C.; BLAKE, T.; GEPTS, P.; *et. al.* Bean arcelin 2. Genetic variation, inheritance and linkage relationships of a novel seed protein of *Phaseolus vulgaris* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v.71, n.1, p.847-855, 1986.

OSBORN, T.C.; BROWN, J.W.S.; BLISS, F.A. Bean arcelins 5: quantitative genetic variation, in seed lectins of *Phaseolus vulgaris* L. and relationship to qualitative lectin variation. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v.70, n.1, p.22-33, 1985.

PEREIRA, P.A.A. & SOUZA, C.R.B. Tipos de faseolina em raças crioulas de feijão no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, n.8, p.1219-1221, 1992.

RABOY, V.; DICKINSON, D.B.; BELOW, F.E. Variation in seed total phosphorus, phytic acid, zinc, calcium, magnesium, and protein among lines of *Glycine max* and *Glycine soja*. **Crop Science**, v.24, n.3, p.431-434, 1984.

RAMOS JUNIOR, E.U.; LEMOS, L.B.; SILVA, T.R.B. Componentes da produção, produtividade de grãos e características tecnológicas de cultivares de feijão. **Bragantia**, Campinas, v.64, n.1, p.75-82, 2005.

RAO, R.C. **Advanced statistical methods in biometric research**. 1 ed. New York: J. Wiley, 1952. 390p.

REDDY, N.R.; PIERSON, M.D.; SATHE, S.K.; *et. al.* **Phytates in cereals and legumes**. Boca Raton: CRC Press, 1989. 159p.

RIBEIRO, N.D.; LONDERO, P.M.G.; FILHO, A.C.; *et. al.* Composição de aminoácidos de cultivares de feijão e aplicações para o melhoramento genético. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.42, p.1393-1399, 2007.

SANTALLA, M.; SEVILLANO, M.C.M.; MONTEAGUDO, A.B.; *et. al.* Genetic diversity of Argentinean common bean and its evolution during domestication. **Euphytica**, Wageningen, v.135, p.75-87, 2004.

SATHE, S.K. Dry bean protein functionality (Review). **Critical Reviews in Biotechnology**, London, v.22, n.2, p.175-223, 2002.

SGARBIERI, S.C. Composition and nutritive value of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) (Review). **Revista de Nutrição e Dietética**, Campinas, v.60, p.132-198, 1989.

STEEL, R.G.D. & TORRIE, J.H. Principles and procedures of statistics a biometrical approach. 2 ed. Meagraic Hill: Statistics Series, 1980, 633p.

STOCCO, P. **Biodiversidade de rizóbios microssimbionte do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em regiões produtoras do estado de Santa Catarina**. 2006. 57 p. Dissertação-(Mestrado em Ciências do Solo) – Departamento de Solos, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2006.

SILVA, H.T. **Descritores mínimos indicados para caracterizar cultivares/variedades de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1. ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e feijão, 2005. 32p.

SILVA, H.T. & FONSECA, J.R. Banco ativo de germoplasma de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Anais-VIII-Congresso Nacional de Feijão**, v.2, p.1131-1135, 2005.

SILVA, M.R. & DA SILVA, M.A.P. Fatores Antinutricionais: Inibidores de proteases e lectinas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.13, n.1, p.3-9, 1976.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetics and plant Breeding**, v.41, n.2, p.237-245, 1981.

SINGH, S.P. Patterns of variation in cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, Louis, v.43, p.39-57, 1989.

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

SINGH, S.P.; GUTIERREZ, J.A.; MOLINA, A.; *et. al.* Genetic diversity in cultivated common bean II. Marker-based analyses of morphological and agronomic traits. **Crop Science**, Canada, v.31, p.23-29, 1991b.

SOLANO, J.P.L. Patterns of phaseolins and RAPD analysis in domesticated species of phaseolus. **Revista Fitotecnia México**, Chapingo, v.28, n.3, p.195-202, 2005.

TEDESCO, M.J.; VOLKWEISS, S.J.; BOHNEN, H. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 1 ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p.

TER BRAAK, C.J.F. & SMILAUER, P. **Canoco reference manual and user's guide to canoco for windows: software for canonical community ordination (version 4)**. 1 ed. New York: Icrocomputer power, 1988. 500p.

VAN SCHOONHOVEN, A. & VOYSEST, O. **Common beans: research for crop improvement**. 1 ed. Cali: Center International of Agriculture Tropical, 1991. 980p.

WANDER, A.E. Produção e consumo de feijão no Brasil, 1975-2005. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.37, n.2, p.7-21, 2007.

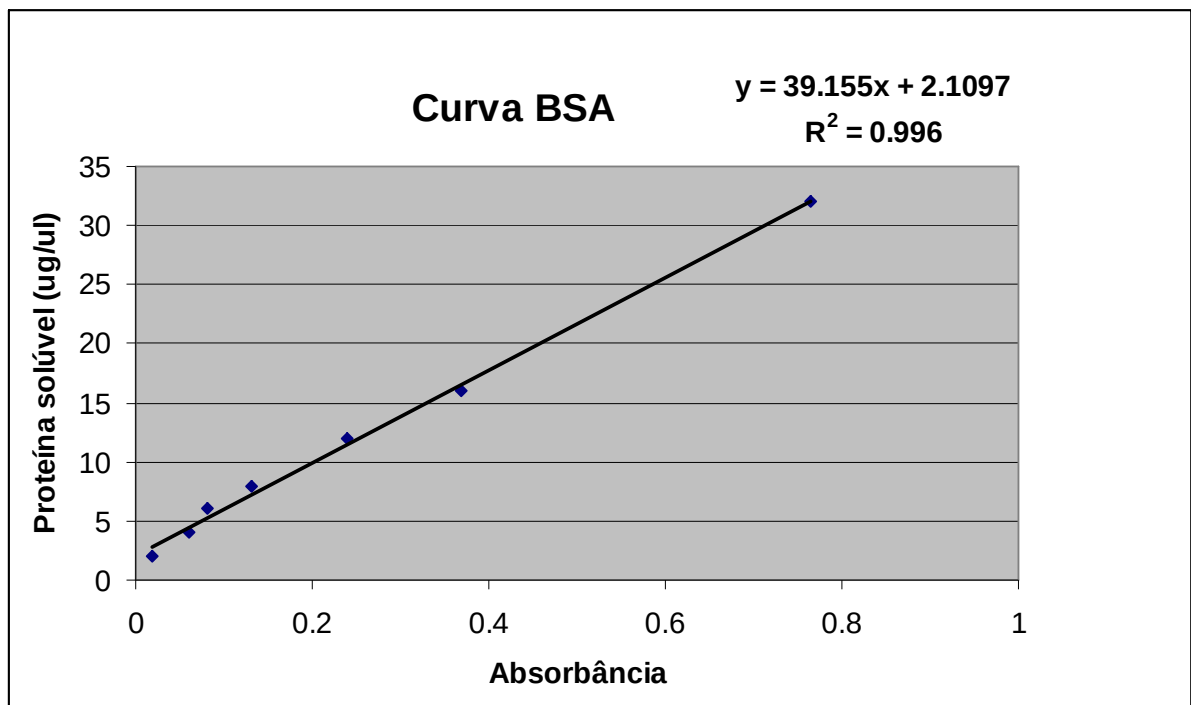
ANEXOS

ANEXO 01 - Gráfico 01. Demonstrativo da curva de BSA (Soro Albumina Bovina), utilizada para a quantificação de proteína solúvel

ANEXO 02 – Tabela 01. Composição de um gel de poliacrilamida para eletroforese SDS-PAGE.

ANEXO 01

Gráfico 01 - Demonstrativo da curva de BSA (Soro Albumina Bovina), utilizada para a quantificação de proteína solúvel.



ANEXO 02

Tabela 01. Composição de um gel de poliacrilamida para eletroforese SDS-PAGE.

Componentes	Gel de Empacotamento (3%)	Gel de Resolução (15%)
Água Ultra pura	8,8 mL	13,44 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30/0,15	-	13 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30/1,5	1,0 mL	-
TRIS-HCl, 3,5M, pH 8,8	-	4,0 mL
TRIS-HCl, 2,5M, pH 6,8	1,0 mL	-
Sódio Dodecil Sulfato 20%	100 µl	200 µl
EDTA, 0,25M, pH 8,8	-	160 µl
EDTA, 0,5M, pH 6,8	50 µl	-
Persulfato de Amônia 7,5%	100 µl	320 µl
TEMED	10 µl	40 µl