



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FELIPE ARANHA DE ANDRADE

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, AGRONÔMICA E
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FEIJÃO-DE-VAGEM COM
POTENCIAL USO EM PROGRAMAS DE MELHORAMENTO**

FELIPE ARANHA DE ANDRADE

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, AGRONÔMICA E
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FEIJÃO-DE-VAGEM COM
POTENCIAL USO EM PROGRAMAS DE MELHORAMENTO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Édison Miglioranza

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Andrade, Felipe.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, AGRONÔMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FEIJÃO-DE-VAGEM COM POTENCIAL USO EM PROGRAMAS DE MELHORAMENTO / Felipe Andrade. - Londrina, 2016.
92 f.

Orientador: Édison Miglioranza.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Phaseolus vulgaris L. - Teses. 2. Compostos Fenólicos - Teses. 3. Crestamento Bacteriano Comum - Teses. 4. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) - Teses. I. Miglioranza, Édison. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

FELIPE ARANHA DE ANDRADE

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, AGRONÔMICA E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE FEIJÃO-DE-VAGEM COM POTENCIAL USO EM
PROGRAMAS DE MELHORAMENTO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Édison Miglioranza
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Lúcia Sadayo Assari Takahashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Orcial Ceolin Bortolotto
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Josemeyre Bonifácio da Silva
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 29 de fevereiro de 2016.

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, pela vida e saúde. À minha amada esposa Daiani. Aos meus pais, apoiadores incondicionais.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina (UEL) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade e pela qualidade dos ensinamentos transmitidos.

À CAPES pela responsabilidade na avaliação dos Programas de Pós-Graduação, pelo apoio dado ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UEL, e pelas bolsas de estudo (doutorado - UEL e doutorado-sanduíche - NDSU).

À North Dakota State University (NDSU) – EUA pela oportunidade da realização do doutorado-sanduíche.

Ao meu amigo e orientador, professor Dr. Édison Miglioranza pela sua competência, paciência, compreensão, conselhos e ensinamentos passados a mim durante todos esses anos juntos.

Ao co-orientador (NDSU), Professor Dr. Kalidas Shetty pelos ensinamentos, paciência e conselhos passados a mim durante o período do doutorado-sanduíche.

Ao amigo e professor, Dr. Leandro Azeredo Gonçalves pelos ensinamentos, amizade, colaboração e presente prontidão.

À professora Dra. Lucia Helena Miglioranza pela amizade, ensinamentos e confiança na minha capacidade profissional.

À amiga e professora, Dra. Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade pelos conselhos, paciência, ensinamentos e incentivo em todas as etapas do mestrado e doutorado.

Ao professor Dr. Orcial Ceolin Bortolotto por aceitar o convite como membro da banca e principalmente pelas contribuições para aprimorar o trabalho.

À professora Dra. Lúcia Sadayo Assari Takahashi por aceitar o convite para participar da banca, pelos ensinamentos, e por ter mantido o banco de germoplasma de feijão-de-vagem da UEL até o presente momento.

À professora Dra. Josemeyre Bonifácio da Silva por ter participado da banca, pelas conversas sempre produtivas e pelas correções a fim de melhorar a qualidade do trabalho.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Agronomia pela

amizade e principalmente pelos conhecimentos transmitidos que muito colaboraram para meu crescimento pessoal e profissional.

À secretária da Pós-Graduação em Agronomia, Weda Aparecida Westin, por sua competência profissional e por todo auxílio prestado a mim durante o mestrado e doutorado.

Aos amigos Bruna Delgado Góes, Camila Lucas Chaves, Camila Ronchi Macedo, Gabriela Barbosa Navarro de Paula, Kátia Real Rocha, Nataiane Cristina Bejatto, Sara Mataroli de Godoy, Murilo Kiichi, Willian Scabora, William Roesler, Diego Fink, Lucas Sanches Pereira, Anderson Yusei Suzuki Fukuji, Eli Carlos de Oliveira e Carla Liege Lonardoni.

Aos amigos Dipayan Sarkar, Jordan Orwat, Ashish Christopher, Ramnarain Ramakrishna, Ayadah Alhadeethi, Jamie Holding Eagle pelo apoio e ensinamentos prestados a mim, durante o período em que estive na NDSU.

Aos funcionários do Departamento de Agronomia, em especial, José Vicentini Neto (seu "Bié"), Geraldo Lopes da Silva, Idael Jerônimo da Silva ("Irmão"), Cícero Carreteiro Hernandes, Fernando José Pereira da Silva, João Machado e Márcio Praxedes, pela amizade e por toda ajuda durante a condução dos experimentos.

E, por fim, à todos que me ajudaram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho.

“Escolha um trabalho que você ame e não terá
que trabalhar um único dia em sua vida”

(Confúcio)

ANDRADE, Felipe Aranha de. **Caracterização molecular, agrônômica e atividade antioxidante de feijão-de-vagem com potencial uso em programas de melhoramento**. 2016. 92f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo geral caracterizar e avaliar genótipos de feijão-de-vagem com potencial uso em programas de melhoramento. Sendo assim, foram realizados quatro trabalhos (capítulos da tese). No primeiro, o objetivo foi estimar e caracterizar, com base em marcadores AFLP, a divergência genética entre 40 e 32 acessos de feijão-de-vagem com hábitos de crescimento determinado e indeterminado, respectivamente. Para análise do AFLP, sete combinações de primers *EcoR1* e *Mse1* foram testadas, sendo selecionadas as combinações E-AAG/M-CTC, E-ACT/M-CTT, E-ACC/M-CTT. Esses produtos foram desnaturados e submetidos à eletroforese capilar. Para estimar as distâncias genéticas entre os acessos foi utilizada a distância de Jaccard e para análise de agrupamento os métodos UPGMA, coordenadas principais e estatística Bayesiana. As três combinações de iniciador/enzima revelaram um total de 485 lócus informativos. No segundo trabalho, o objetivo foi selecionar acessos de hábito determinado, do banco de germoplasma da UEL, para desenvolvimento de um programa de melhoramento para manejo orgânico, e verificar o nível de resistência desses acessos em relação ao cretamento bacteriano comum (CBC). Para avaliação do desempenho agrônômico foram conduzidos dois experimentos de campo em blocos ao acaso, enquanto a avaliação de resistência ao CBC foi conduzida em casa de vegetação, sob delineamento inteiramente ao acaso, utilizando dois isolados bacterianos, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. fuscans* subsp. *fuscans*. No terceiro, o objetivo foi determinar, por meio de ensaios *in vitro*, os compostos fenólicos totais (CFT), atividade antioxidante (AA) dos extratos aquosos de cinco diferentes genótipos e estudar o papel dos bioativos destes extratos no metabolismo da glicose ligada ao *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM tipo 2). O quarto objetivou avaliar CFT, AA e percentagem de inibição da enzima alfa-amilase (%IAA) em 28 genótipos de feijão-de-vagem, via REML/BLUP. De acordo com os resultados obtidos concluiu-se, no primeiro trabalho, que os acessos de crescimento determinado e indeterminado, do banco de germoplasma da UEL, apresentam variabilidade genética. No segundo, os acessos testados agronomicamente, sob manejo orgânico, UEL 402; UEL 405; UEL 407; UEL 408; UEL 412; UEL 417 e UEL 420 apresentaram maiores valores relacionados às características produtivas, e podem ser indicados aos produtores orgânicos da região de Londrina-PR, e, também, utilizados em programas de melhoramento. Em relação ao CBC, após 30 dias de avaliação, todos os acessos foram moderadamente suscetíveis aos dois isolados utilizados. De acordo com os resultados obtidos no terceiro trabalho concluímos que o consumo de feijão-de-vagem contribui para uma dieta saudável, favorecendo na gestão do DM tipo 2. Com os resultados do quarto concluiu-se que os genótipos avaliados podem contribuir geneticamente no desenvolvimento de novas variedades de feijão-de-vagem com maiores teores de CFT, AA e %IAA.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L. Enzimas digestivas. Cretamento Bacteriano Comum. Compostos fenólicos. REML/BLUP.

ANDRADE, Felipe Aranha de. **Molecular characterization, agronomic and antioxidant activity of green bean with potential use in breeding programs.** 2016. 92p. Doctoral Thesis in Agronomy– Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

This study aimed to characterize and evaluate genotypes of green bean with potential use in breeding programs. So it was performed four works (thesis chapters). At first, the goal was to estimate and characterize, based on AFLP markers, the genetic divergence between 40 and 32 green bean access to certain growth habits and indeterminate, respectively. For AFLP analysis of seven combinations of *EcoR1* and *Mse1* primers were tested, and selected combinations E-AAG / M-CTC, E-ACT / M-CTT, E-ACC / M-CTT. These products are denatured and subjected to capillary electrophoresis. To estimate the genetic distances between accessions was used Jaccard distance and the UPGMA cluster analysis methods, main coordinates and Bayesian statistics. The three combinations of primer / enzyme revealed a total of 485 informative locus. In the second study, the goal was to select accessions with determinate growth habits, the germplasm bank of UEL, to develop a breeding program for organic management, and check the level of resistance of these accesses in relation to common bacterial blight (CBB). To evaluate the agronomic performance were conducted two field experiments in blocks, while the assessment of resistance to CBB was conducted in a greenhouse, in a completely randomized design, using two bacterial isolates, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *X. fuscans* subsp. *fuscans*. The third, the objective was to determine, by means of in vitro tests, total phenolics compounds (TPC), antioxidant activity (AA) of aqueous extracts of five different genotypes and study the role of bioactive these extracts glucose metabolism linked to diabetes mellitus type 2 (DM type 2). The fourth aimed to evaluate TPC, AA and percentage of inhibition of the enzyme alpha-amylase (% IAA) in 28 genotypes of green bean by REML / BLUP. According to the results it was concluded in the first work, the access to determinate and indeterminate growth, genebank UEL present genetic variability. In the second, access agronomically tested under organic management, UEL 402; UEL 405; UEL 407; UEL 408; UEL 412; UEL UEL 417 and 420 showed higher values related to production characteristics, and can be given to organic producers of Londrina-PR region, and also used in breeding programs. Regarding the CBB, after 30 days of evaluation, all accesses were moderately susceptible to both isolates used. According to the results obtained in the third work concluded that the consumption of green bean contributes to a healthy diet, favoring the DM type 2 management. The results of the fourth work showed that the genotypes can contribute genetically to development new varieties of green bean with higher levels of TPC, AA and IAA%.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L. Digestive enzymes. Common bacterial blight. Phenolic compounds. REML/BLUP.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 3.1** – Box plot de dissimilaridade baseado em marcadores AFLP entre 72 acessos de feijão-de-vagem de crescimento determinado e indeterminado43
- Figura 3.2** – Dendograma UPGMA das relações genéticas entre 72 acessos de feijão-de-vagem de hábitos de crescimento determinado e indeterminado baseado em marcadores AFLP. Os valores Bootstrap são correspondents ao nó de cada cluster44
- Figura 3.3** – Bar plot baseado em três combinações AFLP de primer/enzima (E-AAG/M-CTC, E-ACT/M-CTT, e E-ACC/M-CTT) para os 72 acessos de feijão-de-vagem de hábitos de crescimento determinado e indeterminado, que mostra as distribuições de ambos os grupos45
- Figura 3.4** – PCoA de 72 acessos de feijão-de-vagem de hábitos de crescimento determinado e indeterminado baseado em marcadores AFLP46
- Figura 5.1** – Fenólicos totais (μg ácido gálico equivalente (GAE)/ g peso fresco (FW)) dos extratos aquosos dos diferentes genótipos de feijão-de-vagem70
- Figura 5.2** – Percentagem (%) da atividade antioxidante, pelo método ABTS⁺, dos extratos aquosos dos diferentes genótipos de feijão-de-vagem71
- Figura 5.3** – Percentagem (%) de inibição da enzima alfa-amilase dos extratos aquosos dos genótipos de feijão-de-vagem73

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1** – Médias aritméticas de 25 acessos de feijão-de-vagem de hábito determinado para quatro caracteres agronômicos.....58
- Tabela 4.2** – Área abaixo da curva do progresso do crestamento bacteriano (AACPCBC) em 25 acessos de feijão-de-vagem inoculados com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) e *X. fuscans* subsp. *fuscans* (Xff).....61
- Tabela 5.1** – Atividade de inibição da enzima (%) Alfa-glicosidase, com dose-dependente (10, 25 e 50 µL de extrato aquoso), dos diferentes extratos aquosos dos genótipos de feijão-de-vagem74
- Tabela 6.1** – Parâmetros genéticos estimados para compostos fenólicos totais (CFT), percentagem de inibição da enzima alfa-amilase (%IAA) e atividade antioxidante (AA) e a média geral dos genótipos.85
- Tabela 6.2** – Ganho genético (g), valor genético predito ($\mu+g$) e nova média predita (NM) estimados para os genótipos selecionados para as características compostos fenólicos totais (CFT), percentagem de inibição da enzima alfa-amilase (%IAA) e atividade antioxidante (AA).....86

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	ORIGEM E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO FEIJÃO-DE-VAGEM	14
2.2	ASPECTOS BOTÂNICOS DO FEIJÃO-DE-VAGEM	16
2.3	CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS DO FEIJÃO-DE-VAGEM	18
2.3.1	Antioxidantes.....	19
2.3.2	Métodos de Avaliação da Atividade Antioxidante.....	20
2.4	MELHORAMENTO GENÉTICO DO FEIJÃO-DE-VAGEM	21
2.5	CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM	22
2.6	AGRICULTURA ORGÂNICA	24
2.7	MARCADORES MOLECULARES	25
	REFERÊNCIAS	28
3	ARTIGO A – ANÁLISE DE AFLP NA DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE FEIJÃO-DE-VAGEM DE HÁBITO DETERMINADO E INDETERMINADO	37
3.1	INTRODUÇÃO	38
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4	ARTIGO B – SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO-DE- VAGEM PARA CULTIVO ORGÂNICO E IDENTIFICAÇÃO DE FONTES DE RESISTÊNCIA AO CRESTAMENTO BACTERIANO	51
4.1	INTRODUÇÃO	52
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	54
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5	ARTIGO C – AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DE BIOATIVOS FENÓLICOS EM FEIJÃO-DE-VAGEM PARA A GESTÃO DA <i>DIABETES MELLITUS</i> TIPO 2 EM FASE INICIAL	65

5.1	INTRODUÇÃO	66
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	67
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
6	ARTIGO D – ANÁLISE DE ANTIOXIDANTE E ALFA-AMILASE EM GENÓTIPOS DE FEIJÃO-DE-VAGEM VIA REML/BLUP.....	80
6.1	INTRODUÇÃO	81
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	82
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
7	CONCLUSÕES GERAIS	92

1 INTRODUÇÃO

Consumido e cultivado em diversos países, o feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) ou vagem pertence a mesma família e espécie botânica do feijão comum. Segundo os dados da Food And Agriculture Organization of the United Nations (FAO) sua produção mundial foi em torno de 20 milhões de toneladas, em 2013, sendo a China o principal produtor, com mais de 15 milhões de toneladas, seguido pela Indonésia, Turquia, Índia e Tailândia (FAO, 2015).

A principal diferença entre o feijão-de-vagem e o comum é que no primeiro as vagens utilizadas para o consumo humano quando imaturas, e no segundo o grão está seco. O feijão-de-vagem contém compostos antioxidantes capazes de promover efeitos benéficos à saúde humana; proteínas, cálcio, fósforo, ferro e vitaminas dos complexos A, B e C (TESSARIOLI NETO; GROppo, 1992; BAARDSETH et al., 2010; ABUREIDAH et al., 2013).

Além de ser um alimento saudável, incrementa a renda de seus produtores, podendo ser cultivado no período entressafra de outras olerícolas, a fim de aproveitar a adubação residual, tutoramento, e quebrar o ciclo de algumas doenças, sendo importante alternativa para diversificar a produção (SANTOS et al., 2012). Dentre estas doenças, encontra-se o crestamento bacteriano comum, que é considerado a principal bacteriose do feijoeiro no Brasil (SILVA et al., 2013).

Essa hortaliça é classificada em função do tipo e coloração das vagens e do hábito de crescimento das plantas. Os hábitos de crescimento são basicamente classificados em determinado e indeterminados. As vagens consistem em dois tipos, manteiga e macarrão, e as colorações podem ser amarelas, verdes e púrpuras. Os genótipos apresentam divergências genéticas (SILVA et al., 2005). As cultivares, quando comparadas entre si, apresentam diferenças em relação às suas características nutricionais, produtivas e resistência às doenças (MIGLIORANZA et al., 2003; KRAUSE; RODRIGUES; LEAL, 2009; MOREIRA et al., 2009).

Desse modo, os objetivos específicos deste trabalho foram estimar e caracterizar a divergência genética entre 72 acessos de feijão-de-vagem (determinado e indeterminado) do banco de germoplasma da UEL com base em marcadores AFLP; selecionar acessos de feijão-de-vagem de hábito determinado do banco de germoplasma da UEL para desenvolvimento de um programa de melhoramento genético para manejo orgânico, e verificar o nível de resistência desses acessos em relação ao crestamento bacteriano comum; determinar por meio de ensaios “*in vitro*” os compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos aquosos de cinco diferentes genótipos de feijão-de-vagem e estudar o papel dos bioativos destes extratos no metabolismo da glicose ligada ao DM tipo 2; avaliar genótipos de feijão-de-vagem quanto à variabilidade genética para caracteres relacionados aos compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e porcentagem de inibição da enzima alfa-amilase, via REML/BLUP, visando programas de melhoramento genético. Sendo assim, o objetivo geral da pesquisa foi caracterizar e avaliar genótipos de feijão-de-vagem com potencial uso em programas de melhoramento genético.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ORIGEM E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO FEIJÃO-DE-VAGEM

Compondo o gênero *Phaseolus* que apresenta origem e diversificação primária nas Américas, populações silvestres de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cresceram em regiões desde o norte do México ao norte da Argentina, em altitudes que variavam de 500 a 2000 m (DEBOUCK, 1986; DEBOUCK, 1991).

Estas populações ocorreram em uma ampla área, o que contribuiu para o surgimento de diversas raças locais e dificultou a localização exata dos lugares de domesticação da espécie (FREITAS, 2006). Vestígios arqueológicos datando cerca de 10000 anos foram encontrados na forma de sementes, fragmentos de vagens e plantas inteiras (GEPTS; DEBOUCK, 1991).

Os múltiplos eventos de domesticação contribuíram para o surgimento de variedades de *Phaseolus vulgaris* L. com dois centros de origem. Um desses localizados na América Central e o outro ao Sul dos Andes (Sul do Peru, Bolívia e Norte da Argentina). Sugere-se um terceiro centro localizado na região da Colômbia (DEBOUCK, 1986; GEPTS; DEBOUCK, 1991). Os eventos de domesticação que ocorreram nos dois centros primários levaram a formação de dois grupos gênicos (Mesoamericano e Andino). Dentro dos quais, a evolução resultou em mudanças significativas (GEPTS; DEBOUCK, 1991; SINGH, 1991), que apresentaram modificações morfológicas e fisiológicas, como: diferenças de hábito de crescimento; dormência das sementes; sensibilidade ao fotoperíodo; tamanho, forma e cor da planta e os mecanismos de dispersão. Estes fatores tornaram a espécie diversa geneticamente de seus ancestrais selvagens (GEPTS; PAPA, 2002).

Há pesquisas moleculares com o objetivo de identificar os locais de origem da espécie *P. vulgaris* L. que utilizam como alvo principal o gene *Phs*, capaz de codificar a proteína faseolina, a mais utilizada em estudos evolutivos sobre a cultura. Pelo menos, dez tipos dessa proteína já foram

identificados em variedades cultivadas e populações silvestres da espécie, demonstrando alta correlação entre o tipo e o local geográfico de origem (GEPTS et al., 1986).

O feijão comum e o feijão-de-vagem são da mesma espécie botânica. Sendo assim, os dois deveriam apresentar o mesmo centro de origem.

Porém, de acordo com De Oca (1987), o feijão-de-vagem originou-se no continente europeu, sendo resultado de mutações genéticas do feijão comum introduzido da América. A espécie evoluiu e modificou geneticamente na França e nos Países Baixos. No início do século XIX, oriundos de cruzamentos entre feijões cultivados na Europa e genótipos procedentes da América Central, apareceram os primeiros materiais apropriados para colheita e consumo das vagens imaturas. Em seguida, essas plantas foram introduzidas na América do Norte, onde novos cruzamentos com feijões locais foram realizados, obtendo-se, novas cultivares com maiores produtividades.

Singh et al. (1991) sugere que o feijão-de-vagem originou-se do feijão comum, pois maiores mudanças genéticas seriam necessárias para que o feijão-de-vagem fosse originado de espécies silvestres de feijão.

Os centros de origem da diversidade das espécies de *Phaseolus* estão distribuídos em quatro *pools* gênicos (DEBOUCK, 1991). O *pool* primário abrange populações cultivadas e silvestres. As populações silvestres são os ancestrais mais próximos do *P. vulgaris* L., distribuindo-se desde o norte mexicano até o Noroeste da Argentina (GEPTS et al., 1986). Os feijões originados do cruzamento de materiais cultivados e silvestres desse *pool* são férteis e não há impedimento de cruzamento entre eles. Espécies como *P. coccineus* L., *P. costaricensis* e *P. polyanthus* encontram-se no *pool* secundário. As espécies *P. acutifolius* L., *P. parvifolius* e *P. filiformis* e *P. angustissimus* encontram-se nos *pools* terciário e quaternário, respectivamente (SINGH, 2001).

De acordo com Delgado-Salinas; Bibler e Lavin (2006) o *pool* genético dos programas de melhoramento está constituído pelas espécies

domesticadas *P. vulgaris* L., *P. dumosus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* L e *P. lunatus* L. Há algumas com escassa domesticação que apresentam contribuições adicionais.

Os genótipos utilizados no Brasil podem ter sido introduzidos a partir do México, percorrendo a Guatemala, Colômbia e Venezuela. Outro caminho seria através dos Andes, no Peru; e uma terceira rota por meio de imigrantes vindos da Europa (GEPTS; DEBOUCK, 1993).

Em relação à importância econômica, é cultivado e consumido em diversos países, sendo considerada uma das olerícolas mais importantes no mundo, apresentando teores significativos de vitaminas, sais minerais e atividade antioxidante (BLAIR et al., 2010; ABU-REIDAH et al., 2013). Segundo dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) a estimativa de produção mundial, em 2013, é em torno de 20 milhões de toneladas, sendo a China, Indonésia, Índia, Turquia e Tailândia os maiores produtores (FAO, 2015).

No Brasil, os dados referentes à produção e importância do mercado são escassos em virtude da falta de estatísticas e de informação sistematizada. Vem sendo amplamente cultivado por pequenos produtores, considerado uma fonte de renda alternativa, para diversificar a produção, com uso crescente em rotação de culturas ou no período de entressafra de outras olerícolas, como a do pimentão e tomate (FRANCELINO et al., 2011; SANTOS et al., 2012). A produção em território brasileiro é destinada principalmente ao consumo de vagens “*in natura*”, com reduzidas quantidades destinado à indústria de conservas e para às exportações das vagens refrigeradas (VIGGIANO, 1990). No ano de 2003, os principais estados produtores eram São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, que produziam juntos cerca de 80% de toda a produção do país (IBGE, 2003).

2.2 ASPECTOS BOTÂNICOS DO FEIJÃO-DE-VAGEM

O feijão-de-vagem pertence ao gênero *Phaseolus*, que está associado à subtribo Phaseolinae, tribo Phaseoleae, subfamília Papilionoideae

e família Leguminosae. Composto por, aproximadamente, 55 espécies (DEBOUCK, 1991). Dentre estas, cinco foram domesticadas: *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus coccineus*, *Phaseolus acutifolius* e *Phaseolus polvynthus* (DEBOUCK, 1986).

A planta é diploide ($2n = 2x = 22$) e apresenta larga adaptação a climas quentes e amenos, o que permite seu cultivo em uma ampla faixa térmica, que varia de 18 a 30° C (VIEIRA; BORÉM; RAMALHO, 1999). Temperaturas superiores a 35° C provocam deficiência de polinização, resultando em vagens deformadas, e queda na produtividade (PEIXOTO et al., 2002). Quando as plantas encontram-se em intenso crescimento vegetativo, o excesso de calor aumenta a fotorrespiração, o que contribui para reduzir a taxa de crescimento, influencia no aborto de flores, vigor e retenção final das vagens (SUZUKI et al., 2001; TSUKAGUCHI et al., 2003). Temperaturas menores do que 15° C, e geada contribuem para baixa germinação das sementes, desenvolvimento lento, (SILBERNAGEL, 1986; MARIOT, 2000), redução na altura das plantas e ramos, diminuindo a produção de vagem (FILGUEIRA, 2003).

A cultura é classificada quanto ao tipo de vagem, cor das vagens e hábito de crescimento de plantas. Analisando o tipo de vagem, estas podem ser classificadas em Macarrão, com formato cilíndrico, e Manteiga, com formato achatado (MALUF, 2001; FILGUEIRA, 2003). Em relação à cor, as vagens possuem quatro tipos diferentes: verde-escura, verde-clara, amarela e púrpura. Com base no hábito de crescimento, são classificadas em determinado - quando a porção terminal da haste se encerra em uma inflorescência, e indeterminado - quando a extremidade da haste termina em um meristema vegetativo que possibilita a continuidade do crescimento da planta (MYERS; BAGGETT, 1999).

Os cultivares de crescimento determinado geralmente não ultrapassam 50 cm de altura (BARBOSA et al., 2001). Por outro lado, os indeterminados exigem o tutoramento de suas hastes (TESSARIOLI; GROppo, 1992). Segundo Filgueira (2003), os determinados são mais precoces do que os indeterminados, porém menos produtivos.

As plantas são autógamas. A autogamia é devido à sua estrutura floral, onde os órgãos masculinos e femininos são protegidos pelas pétalas, e também pelo fato de os grãos de pólen caírem sobre o estigma antes da abertura da flor (SILBERNAGEL, 1986). Em relação ao fruto, este é do tipo legume, ou seja, uma vagem, podendo ser reta ou ligeiramente curvada (VIEIRA, 1988).

As vagens são colhidas ainda imaturas, apresentando sementes pouco desenvolvidas. O ponto ideal de colheita é quando as vagens atingem o máximo desenvolvimento, porém antes de tornarem-se fibrosas e com sementes salientes (FILGUEIRA, 2003).

2.3 CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS DO FEIJÃO-DE-VAGEM

O feijão-de-vagem pode ser consumido congelado, em conservas ou “*in natura*”. As vagens são tenras, alongadas, firmes e flexíveis. Quando consumidas frescas apresentam baixos teores calóricos (40 Kcal/100g de vagens de feijão cru), são ricas em fibras (3,4 g por 100 g); apresentam vitamina A (519 UI por 100 g), vitamina B6 (0,063 mg por 100 g), tiamina ou vitamina B1 (0,073 mg por 100 g), e vitamina C (11,0 mg por 100 g). Os grãos contêm boas quantidades de minerais, como: ferro (0,80 mg por 100 g), cálcio (61 mg por 100 g), magnésio (29 mg por 100 g), manganês (0,216 mg por 100 g) e potássio (237 mg por 100 g), que são essenciais para o metabolismo do corpo (USDA, 2016; DAVIS; EPP; RIORDAN, 2004).

De acordo com Hervatin e Teixeira (1999), essa espécie contém fibras, necessárias para o funcionamento do aparelho digestivo. As vagens fornecem, em peso fresco, cerca de 7 % de carboidratos; 1,9 % de proteínas; 0,2 % de lipídeos e 1,0 % de fibras. Segundo Cobbe (1983) em 100 g de vagens frescas há, em média, 11 mg de ácido ascórbico, 0,5 mg de niacina, 110 mcg de riboflavina, 80 mcg de tiamina e 600 UI de vitamina A.

O feijão-de-vagem apresenta atividade antioxidante (PLUMB; PRICE; WILLIAMSON, 1999). Os antioxidantes presentes na dieta alimentar protegem contra os radicais livres (NILSSON; STEGMARK; AKESSON, 2004),

e contribuem para proteção contra doenças degenerativas do envelhecimento (ATOUI et al., 2005), como a diabetes.

Venkateswaran, Pari e Saravanan (2002) administrando um extrato aquoso de vagens (200 mg / kg de peso corporal) de *P. Vulgaris* L., via oral, durante 45 dias em ratos diabéticos, observaram que tal substância reduziu significativamente o aumento da glicemia, triglicerídeos, ácidos graxos livres, fosfolípidios e colesterol total, e concluíram que o feijão-de-vagem apresenta ação anti-diabética.

2.3.1 Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias que apresentam a capacidade de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis tendo como principal função proteger os constituintes celulares e manter o estado redox da célula, agindo contra danos de oxidação em tecido animal. Algumas destas substâncias antioxidantes são produzidas naturalmente pelo corpo humano, e outras são adquiridas na dieta alimentar (HALLIWELL, 2001; ARAÚJO, 2004).

De acordo com Bianchi e Antunes (1999) há diversos agentes de defesa antioxidantes, podendo ser não-enzimático e enzimático. Os principais agentes não-enzimáticos são a L-cisteína, curcumina, β -caroteno, α -tocoferol (vitamina E), proteínas do plasma, selênio, glutathione, clorofilina, flavonoides e ácido ascórbico (vitamina C). Os enzimáticos são superóxido dismutase, catalase, NADPH-quinona oxidoreductase, glutathione peroxidase e enzimas de reparo. As substâncias antioxidantes doam elétrons para determinados substratos, porém não se tornam radicais livres, por serem estáveis em ambas as formas. Os antioxidantes encontram-se em duas classes, os sintéticos e os naturais (HALL; CUPPET, 1997).

Os antioxidantes sintéticos são utilizados nas indústrias de óleos e de derivados lipídicos, como butil-hidroxianisol (BHA) e o butil-hidroxitolueno (BHT), e, apresentam problemas em quem os consome. Algumas pesquisas têm mostrado que estes compostos podem favorecer efeitos carcinogênicos, mutagênicos, além da proliferação do retículo

endoplasmático e o aumento do peso do fígado. O fato de estes antioxidantes apresentarem malefícios à saúde tem contribuído com a busca por antioxidantes naturais, para serem utilizados na alimentação e em produtos farmacêuticos (MELO; GUERRA, 2002; SIMÃO, 1985; YILDIRIM; MAVI; KAKA, 2001; ZHENG; WANG, 2001).

As substâncias naturais, com capacidade antioxidante, podem apresentar efeitos benéficos sobre várias doenças, como: alergias, cardiopatias, úlceras pépticas, retinopias diabéticas, inflamações, doenças circulatórias, diabetes mellitus, câncer, aterosclerose (WANG; CAO; PRIOR, 1997).

2.3.2 Métodos de Avaliação da Atividade Antioxidante

Os métodos ABTS, DPPH e β -caroteno/ácido linoleico medem a capacidade antioxidante “*in vitro*” e baseiam-se na habilidade do antioxidante em sequestrar os radicais livres.

Um dos mais utilizados é o ABTS (2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), que é um teste indireto de avaliação da atividade antioxidante, e monitora o decaimento do radical ABTS produzido pela oxidação do 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), provocada pela adição de fenólicos contidos em uma amostra. A quantidade consumida de ABTS está relacionada com a reação dos fenólicos da amostra (RUFINO et al., 2007).

O DPPH (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila) também é muito utilizado, e consiste em um radical estável numa solução que reage com compostos que doam elétrons. Neste processo, utiliza-se uma solução alcoólica de DPPH, que absorve num comprimento de onda próximo de 517 nm. A absorção decresce e a coloração muda frente às moléculas antioxidantes testadas à medida que seu elétron deixa de ser desemparelhado (DI MAMBRO; MARQUELE; FONSECA, 2005).

β -caroteno/ácido linoleico consiste de um ensaio espectrofotométrico e baseia-se na descoloração do composto β -caroteno que

é induzida pelos produtos da degradação oxidativa de um ácido graxo. A determinação deste método é realizada a 470 nm, na presença e ausência de um antioxidante (RUFINO et al., 2006).

2.4 MELHORAMENTO GENÉTICO DO FEIJÃO-DE-VAGEM

A cultura do feijão-de-vagem tem sido estudada por instituições brasileiras, como, universidades, empresas públicas e privadas, porém, ainda, necessita de mais pesquisas, a fim de incrementar sua produção, melhorar a qualidade das vagens e resistências a estresses bióticos e abióticos (ABREU et al., 2004).

No Brasil, o melhoramento tem recebido pouca atenção. Os agricultores são os principais responsáveis pela seleção e manutenção dos cultivares. As sementes utilizadas pelos produtores são muitas vezes mantidas por eles, ou adquiridas de companhias de sementes (MALUF, 1994). As empresas privadas são as principais responsáveis pela liberação de novas cultivares, e muitas são importadas (RODRIGUES, 1997), o que aumenta o valor do custo das sementes.

Os genótipos de crescimento indeterminado apresentam maiores produções quando comparados com os de crescimento determinado. Porém, necessitam de cuidados mais intensos, e principalmente mão-de-obra, devido ao tutoramento, e, por apresentarem ciclo maior, estão mais sujeitos a ataques de pragas e doenças, aumentando, os custos de produção (FILGUEIRA, 2003; FRANCELENO et al., 2011).

Cultivares com hábito de crescimento determinado apresentam florescimento em um período reduzido, quando comparado com os de crescimento indeterminado, e sua produção pode ser concentrada em uma determinada época do ano. O ciclo menor otimiza o uso do solo e da mão-de-obra, contribuindo na redução dos custos de produção. O florescimento concentrado contribui para realização de apenas uma única colheita (FILGUEIRA, 2003). O ciclo menor das plantas de hábito de crescimento

determinado e a possibilidade de mecanização total favorecem a produção (COSTA; RAVA, 2003; MOREIRA et al., 2009).

O desenvolvimento de genótipos resistentes a pragas e doenças é importante, pois essa cultura é sensível a estresses bióticos e abióticos, que podem afetar a produção, crescimento e qualidade das vagens (EL-TOHAMY; EL-GREADLY, 2007).

Os principais estresses abióticos que prejudicam a produtividade do feijão-de-vagem são baixa e alta temperatura, a seca, a salinidade, a deficiência de nutrientes do solo e a fixação de nitrogênio. A tolerância das plantas a estes estresses variam de acordo com o genótipo utilizado e estágio fenológico de crescimento (PROHENS; NUEZ, 2008). Estresses bióticos como densidades de plantas, pragas e doenças também afetam a produtividade (PROHENS; NUEZ, 2008).

Dentre as principais doenças da espécie está o crestamento bacteriano comum (CBC), causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) (= *X. campestris* pv. *phaseoli*) (XAP) (TRINDADE et al., 2012). Essa doença reduz a produção de forma significativa e apresenta difícil controle (VALE; COSTA; ZAMBOLIM, 1997). A alta variabilidade genética observada nesta bactéria em função do ambiente limita a obtenção de cultivares resistentes (OPIO; ALLEN; TERIL, 1996; MKANDAWIRE et al., 2004).

2.5 CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM

Doença da parte aérea encontrada em todo o mundo, o crestamento bacteriano comum (CBC) tem como sua principal via de transmissão as sementes, podendo o inóculo permanecer viável por, até, 15 anos, causando perdas de produção de 10 a 70%, pois reduz a taxa fotossintética das folhas infectadas (DIAZ et al., 2001; TAR'NA; MICHAELS; PAULS, 2001; MIKLAS et al., 2003).

De acordo com Rava e Sartorato (1994), os sintomas do CBC aparecem na parte aérea das plantas, afetando as folhas, caules, vagens e sementes. O ataque da bactéria às sementes causa descoloração no hilo,

manchas amarelas no tegumento e enrugamento. As sementes infectadas podem originar pequenas lesões nas plantas, além de causarem necroses foliares, provocando a morte das folhas e desfolha das plantas. O caule sofre estrangulamento por pequenas lesões, manchas avermelhadas e compridas. Nas vagens, ocorre o aparecimento de manchas aquosas que ampliam com o passar do tempo, tornando-se avermelhadas, além de exsudatos de bactérias que podem ser vistos cobrindo esta lesão (GILBERTSON; MAXWELL 1992).

A fim de manejar o CBC algumas medidas preventivas devem ser tomadas, como: plantio de genótipos resistentes, cultivo em áreas livres do patógeno, uso de sementes sadias, rotação de culturas e o uso adequado de irrigação (MARINGONI; LAURETTI, 1999; MUTLU et al., 2005; DARRASSE et al., 2007; RODRIGUES et al., 1999; TAR'NA; MICHAELS; PAULS, 2001; MIKLAS et al., 2003). A utilização de cultivares resistente tem se apresentado como a melhor alternativa, pois tem maior adesão pelos produtores, por apresentarem baixo custo, e não causarem impactos ambientais, como a utilização de agrotóxicos (COSTA; RAVA, 2003).

Os programas de melhoramento com o intuito de produzirem materiais resistentes ao CBC apresentam certas limitações. Dentre elas, encontra-se a estreita base genética das fontes de resistência utilizadas. Sendo as cultivares Great Northern Nebraska 1 Sel. 27 e Tlalnepantla 64 (PI 207.262) os principais materiais utilizados como fonte de resistência. Além do mais, diversos fatores podem influenciar a complexa interação entre o *P. vulgaris* L. e o agente causador do CBC, o que contribui para dificultar, ainda mais, a obtenção de materiais resistentes (SANTOS et al., 2003).

A relação da resistência é oligo ou poligênica, uma vez que os genes que controlam a suscetibilidade da doença em folhas não são os mesmos que controlam nas vagens, demonstrando a complexidade da resistência e o efeito do ambiente no desenvolvimento dos sintomas (RODRIGUES et al., 1999; KELLY et al., 2003; MUTLU et al., 2005; O'BOYLE; KELLY; KIRK, 2007).

A produção de genótipos resistentes ao CBC é importante, pois, podem ser facilmente adquiridos pelos produtores, além de diminuir ou

até evitar o uso de agrotóxicos, contribuindo também, para o cultivo em agricultura orgânica.

2.6 AGRICULTURA ORGÂNICA

De acordo com Campanhola e Valarini (2001) o termo agricultura orgânica faz parte de um conceito, que, abrange a agricultura alternativa, que engloba a natural, a biodinâmica, a biológica, a ecológica e a permanacultura, e apresentam similaridades práticas.

Essas semelhanças consistem em: reciclar os recursos naturais da propriedade, favorecendo a liberação de nutrientes para as plantas, devido à decomposição da matéria orgânica; transformar os resíduos vegetais em húmus no solo; a utilização de rochas moídas, semi-solubilizadas, ou que tenham sido tratadas termicamente, com teores baixos de nutrientes prontamente hidrossolúveis; diversificar e integrar as explorações vegetais na propriedade; uso de esterco animal, biofertilizantes, rotação e consorciação de culturas, controle biológico de pragas e doenças, adubação verde; não utilizar agrotóxicos; utilizar extratos vegetais, métodos vegetativos, mecânicos e físicos no controle de pragas e doenças; eliminar a utilização de produtos sintéticos e reguladores de crescimento na dieta alimentar dos animais; usar quebra-ventos; utilizar genótipos vegetais e/ou animais adequados para cada manejo no sistema ecológico (CAMPANHOLA; VALARINI, 2001).

O cultivo orgânico de hortaliças tem apresentado desenvolvimento agrônomo em diversas espécies, com produtividade e elevado padrão de comércio (SOUZA et al., 2001; SOUZA; RESENDE, 2003). O *Phaseolus vulgaris* L., no cultivo orgânico, pode apresentar maiores produtividades e preços de venda quando comparado com o convencional (VIDAL et al., 2003; SANTOS, 2011).

O fato de a agricultura orgânica promover mudanças nos sistemas tradicionais de cultivo vegetal contribui para o desinteresse das grandes empresas na produção de sementes orgânicas (MALUF, 2002).

No estado do Paraná, o cultivo orgânico de feijão-de-vagem é incipiente devido à falta de estrutura e genótipos adaptados ao ambiente.

2.7 MARCADORES MOLECULARES

De acordo com Ferreira e Grattapaglia (1998) qualquer fenótipo molecular, proveniente de um gene expresso ou de um determinado segmento específico de DNA correspondente a uma região do genoma podendo ser expresso ou não, pode ser conhecido como um marcador molecular e, apresenta características qualitativas com herança mendeliana simples, cujo ambiente não influencia a expressão.

Market e Moller (1959) utilizaram marcadores isoenzimáticos em espécies vegetais. Este fato corroborou como a revolução causada por uso de marcadores moleculares (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Em plantas que não apresentavam diferenças morfológicas, a utilização de isoenzimas tornou capaz a detecção de polimorfismos entre estas, possibilitando maior visualização das informações genéticas presentes em determinadas populações (TORGGLER; CONTEL; TORGGLER, 1995).

As pesquisas de conservação de espécies e de biologia populacional em plantas e animais tiveram suas variações analisadas no nível de DNA devido ao descobrimento de enzimas de restrição e avanços da biologia molecular. As enzimas de restrição foram utilizadas pela primeira vez na técnica RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), na década de 70, que baseava o polimorfismo pelo tamanho do fragmento (GRODZICKER et al. 1974; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Mullis et al. (1986) desenvolveram a tecnologia da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) que possibilitou a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA. A técnica foi aperfeiçoada possibilitando o aparecimento de diferentes tipos de marcadores moleculares capazes de detectar polimorfismo no nível de DNA.

Há diversos marcadores moleculares que apresentam como base a PCR, como: marcadores dominantes RAPD (Random Amplified

Polymorphic DNA) e AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism) e os marcadores SSR (Simple Sequence Repeats), SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), que são co-dominantes, e permitem distinguir o fenótipo homocigoto do heterocigoto (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Segundo Ribeiro, Bertolucci e Grattapaglia (1997) as técnicas de PCR são muito eficazes e apresentam várias utilizações, como: construção de mapas genéticos, monitoramento da variabilidade genética, identificação de loci relacionado a caracteres quantitativos, identificação de indivíduos ou famílias divergentes, podendo ser utilizadas em estudos evolutivos e taxonômicos.

De acordo com Vos et al., (1995), quando comparado com as demais técnicas de marcadores moleculares, o AFLP destaca-se pelo número de marcadores gerados por loci, repetitividade no ensaio e poder de detecção de variabilidade genética. Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998) a metodologia combina o poder de amostragem da digestão por enzimas de restrição com a rapidez e praticidade da detecção dos polimorfismos via PCR.

O método AFLP consiste em quatro etapas: 1-) O DNA genômico é clivado com duas enzimas de restrição, uma de corte raro, que reconhece um sítio de corte com seis a oito nucleotídeos, como a EcoR1, e uma outra de corte frequente, que reconhece sítio de corte com quatro nucleotídeos, como a MseI; 2-) Ligação de adaptadores (primers) que possuem extremidades complementares às extremidades geradas na clivagem pelas enzimas de restrição; 3-) Amplificação pré-seletiva, onde se utiliza primers contendo um nucleotídeo seletivo na extremidade 3' dos adaptadores; 4-) Amplificação seletiva utilizando primers com dois ou três nucleotídeos adicionais na extremidade 3' dos primers pré-seletivos.

Para realização da AFLP não há a necessidade de conhecimento prévio do genoma, e a técnica apresenta algumas vantagens em relação às demais, como: em um único gel é gerado e visualizado grande número de fragmentos, o que proporciona uma amostragem ampla e simultânea de um genoma; grande poder de detecção da variabilidade genética; maior robustez quando comparado com RAPD, pois primers mais

longos são utilizados na etapa de PCR, o que aumenta a especificidade da amplificação (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

De acordo com Ferreira (2003), a metodologia de AFLP apresenta algumas limitações, como: geração de um menor conteúdo de informações por locus, devido ao seu caráter dominante, que impossibilita a diferenciação entre genótipos heterozigotos e homozigotos; apresenta um custo de implementação maior quando comparado ao RAPD, porém, depois os primers podem ser utilizados em qualquer genoma; o DNA utilizado deve ser puro e de qualidade, a fim de que as enzimas de restrição façam a digestão completa.

Svetleva et al. (2006) utilizando a técnica de AFLP e ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) com o objetivo de analisar o DNA de 78 genótipos de *Phaseolus vulgaris* L. (33 oriundos da Bulgária e 45 estrangeiros), concluíram que as análises deram informações para a caracterização genética, bem como para a identificação da variedade, e verificaram a importância da técnica de AFLP em estudos de similaridade genética a fim de evitar erros causados pela digestão incompleta do DNA genômico.

Outros estudos utilizando a metodologia de AFLP caracterizaram a estrutura genética de uma coleção selvagem de *Phaseolus vulgaris* L. (TOHME et al. 1996). Kumar et al., (2008) aplicaram a técnica de AFLP em 44 acessos, sendo seis acessos exóticos, 15 provenientes de terras indianas e 23 cultivares lançadas, e avaliaram a diversidade genética do germoplasma do feijão indiano, concluindo que a técnica forneceu boa perspectiva de diversidade genética entre os acessos do feijoeiro indiano.

REFERÊNCIAS

- ABREU, F. B.; LEAL, N. R.; RODRIGUES, R.; AMARAL JÚNIOR, A. T. do.; SILVA, D. J. H. da. Divergência genética entre acessos de feijão-de-vagem de hábito de crescimento indeterminado. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, jul./set. 2004.
- ABU-REIDAH, I. M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Phytochemical characterization of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by using high-performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 24, n. 2, p. 105-116, fev. 2013.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3ª ed. – Viçosa: UF, 2004.335p.
- ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 27–36, jan. 2005.
- BAARDSETH, P.; BJERKE, F.; MARTINSEN, B. K.; SKREDE, G. Vitamin C, total phenolics and antioxidative activity in tip-cut green beans (*Phaseolus vulgaris*) and swede rods (*Brassica napus* var. *napobrassica*) processed by methods used in catering. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 7, p. 1245-1255, mai. 2010.
- BARBOSA, M. L.; REZENDE, M. R. R.; COSTA, H. S. C.; MALUF, W. R. **A Cultura do Feijão-de-vagem**. Lavras: UFLA, 2001. 5 p. (UFLA. Boletim Técnico de Hortaliças, 65).
- BLAIR, M. W.; CHAVES, A.; TOFIÑO, A.; CLADERÓN, J. F.; PALACIO, J. D. Extensive diversity and inter-genepool introgression in a world-wide collection of indeterminate snap bean accessions. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 120, n. 7, p. 1381-1391, mai. 2010.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- CAMPANHOLA, C.; VALARINI, P. J. A agricultura orgânica e seu potencial para o pequeno agricultor. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 69-101, set./dez. 2001.
- COBBE, R. V. Reavaliando as hortaliças. **Horticultura brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 10-17, nov. 1983.

COSTA, J. G. C. da.; RAVA, C. A. Linhagens de feijoeiro comum com fenótipos agrônômicos favoráveis e resistência ao crestamento bacteriano comum e antracnose. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 5, p. 1176-1182, out. 2003.

DARRASSE, A.; BUREAU, C.; SAMSON, R.; MORRIS, C. E.; JACQUES, M. Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. phaseoli associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, p. 203–215, jun. 2007.

DAVIS, D. R.; EPP, M. D.; RIORDAN, H. D. Changes in USDA Food Composition Data for 43 Garden Crops, 1950 to 1999. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. 6, p. 669–682, 2004.

DEBOUCK, D. G. *Phaseolus* germplasm exploration. In: GEPTS, P. (Ed.). **Genetic resources of *Phaseolus* beans**. Dordrecht: Kluwer, 1986. p. 3-29.

DEBOUCK, D.G. Primary diversification of *Phaseolus* in the Americas: three centers? **Plant Genetic Resources Newsletter**, v. 67, p. 2-8, 1986.

DEBOUCK, D.G. Systematics and morphology. In: SCHOONHOVEN, A. van; VOYSEST, O. (Ed.). **Common beans: research for crop improvement**. Cali: CIAT, 1991. p. 55-118.

DELGADO-SALINAS, A.; BIBLER, R.; LAVIN, M. Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): A recent Diversification in an Ancient Landscape. **Systematic Botany**, v. 31, n. 4, p. 779-791, out. 2006.

DE OCA, G. M. Mejoramiento genético de la habichuela en el CIAT y resultados de viveros internacionales. In: DAVIS, J.; JASSEM, W. (Ed.) **El Mejoramiento genético de la habichuela in America Latina: memorias de un taller**. Cali. Colombia. CIAT. 1987, p. 60-72.

DIAZ, C. G.; BASSANEZI, R. B.; GODOY, C. V.; LOPES, D. B.; BERGAMIN FILHO, A. Quantificação do efeito do crestamento bacteriano comum na eficiência fotossintética e na produção do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 71-76, mar. 2001.

DI MAMBRO, V. M.; MARQUELE, F. D.; FONSECA, M. J. V. Avaliação in vitro da ação antioxidante em formulações antienvhecimento. **Cosmetics & Toiletries**, v. 17, n. 4, p. 74- 78, jul./ago. 2005.

EL-TOHAMY, W. A.; EL-GREADLY, N. H. M. Physiological Responses, Growth, Yield and Quality of Snap Beans in Response to Foliar Application of Yeast, Vitamin E and Zinc under Sandy Soil Conditions. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 1, n. 3, p. 294-299, 2007.

FAO - Food and Agriculture Organization. Statistical databases – Agriculture. Home: FAO. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acessado 20 junho. 2015.

FERREIRA, M. A. J. F. **Utilização das técnicas de marcadores moleculares na genética de populações, na genética quantitativa e no melhoramento de plantas.** Boa Vista: Embrapa Roraima, 2003. 63p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p. 220 (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: Agrotecnologia Moderna na produção e comercialização de hortaliças.** Viçosa. Editora UFV, 2003. 412p.

FRANCELINO, F. M. A.; GRAVINA, G. A.; MANHÃES, C. M. C.; CARDOSO, P. M. R.; ARAÚJO, L. C. Avaliação de linhagens de feijão-de-vagem para as regiões norte e noroeste fluminense. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 554-562, abr./jun. 2011.

FREITAS, F de O. Evidências genético-arqueológicas sobre a origem do feijão comum no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 7, p. 1199-1203, jul. 2006.

GEPTS, P.; OSBORN, T. C.; RASCA, K.; BLISS, F. A. Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): evidence for multiple centers of domestication. **Economic Botany**, v. 40, n. 4, p. 451-468, 1986.

GEPTS, P., DEBOUCK, D.G. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). In: SCHOONHOVEN, A. van.; VOYSEST, O. (Ed.). **Common beans: research for crop improvement.** Cali: CIAT, 1991. p. 7-53.

GEPTS, P.; DEBOUCK, D.G. Origin, domestication and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Schoonhoven, A.V.; Voyesest, (eds). **Common beans: research for crop improvement.** Cali: CIAT, 1993. p. 7-53.

GEPTS, P.; PAPA, R. **Evolution during domestication.** In: Encyclopedia of Life Sciences 1-7 LONDON: Nature Publishing Group. Macmillan Publishers Ltd (UK). 2002.

GILBERTSON, R. L., MAXWELL, D. P. (1992) Common bacterial blight of bean. In: CHAUBE, H. S.; KUMAR, J.; MUKHOPADHYAY, A. N.; SINGH, U. S. Plant diseases of international importance. Volume II. **Diseases of vegetables and Oil Seed Crops.** (eds) Englewood Cliffs, USA: Prentice Hall, Inc., 1992. p. 18-39.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutation of adenoviruses. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 39, p. 439-446, 1974.

HALL, C. A.; CUPPET, S. L. Structure-activities of natural antioxidants. In: ARUOMA, O. I.; CUPPET, S. L. (Ed.) **Antioxidants methodology in vivo and in vitro concepts**. Illinois: AOCS, 1997. p. 141-172.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: ENCYCLOPEDIA of Life Sciences. [S. 1.]: **Nature**, 2001. p. 1-7.

HERVATIN, C. M.; TEIXEIRA, N. T. Micronutrientes na produtividade do feijão-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) **Revista Ecosistema**, Espírito Santo do Pinhal, v. 24, p. 15-19, 1999.

IBGE (2003). **Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA**. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 05 de dezembro de 2015.

KELLY, J.D.; GEPTS, P.; MIKLAS, P. N.; COYNE, D. P. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. **Field Crops Research**, n. 82, p. 135–154, 2003.

KRAUSE, W.; RODRIGUES, R.; LEAL, N. R. Identificação de fontes de resistência e avaliação de métodos de inoculação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijão-de-vagem. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1901-1907, 2009.

KUMAR, V.; SHARMA, S.; KERO, S.; SHARMA, S.; SHARMA, A. K.; KUMAR, M.; BHAT, K. V. Assessment of genetic diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm using amplified fragment length polymorphism (AFLP). **Scientia Horticulturae**, v. 116, p. 138-143, 2008.

MALUF, W. R. **Melhoramento do Feijão-vagem: melhoramento de hortaliças**. Lavras: UFLA, 1994. 6 p. (Apostila).

MALUF, W. R. Heterose e emprego de híbridos F1 em hortaliças. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 327-355.

MALUF, W. R. Sementes orgânicas de hortaliças. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. s2, 2002.

MARINGONI, A. C.; LAURETTI, R. L. B. Reação de genótipos de feijoeiro comum a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Macrophomina phaseolina* e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 4, p. 535-532, abr. 1999.

MARIOT, E. J. Aptidões climáticas, ideótipos e épocas de cultivo do feijoeiro no Paraná. In: IAPAR. **Feijão: tecnologia e produção**. Londrina: IAPAR, Informe de Pesquisa, 2000. p. 5-13.

MARKET, C.; MOLLER, F. **Multiple forms of enzymes: Tissue, autogene and species specific patterns**. Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington, v. 45, p. 753-763, 1959.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MIGLIORANZA, E.; ARAUJO, R.; ENDO, R. M.; SOUZA, J. R. P.; MONTANARI, M. A. Teor de cálcio em frutos de diferentes cultivares de feijão-vagem. **Horticultura Brasileira**, v. 21, p. 158-161, 2003.

MIKLAS, P. N.; COYNE, D. P.; GRAFTON, K. F.; MUTLU, N.; REISER, J.; LINDGREN, D. T.; SINGH, S. P. A major QTL for common bacterial blight resistance derives from the common bean great northern landrace cultivar Montana No. 5. **Euphytica**, v. 131, n. 1, p. 137–146, 2003.

MKANDAWIRE, A. B. C.; MABAGALA, R. B.; GUZMÁN, P.; GEPTS, P.; GILBERTSON, R. L. Genetic diversity and pathogenic variation of common blight bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) suggests pathogen co-evolution with the common bean. **Phytopathology**, v. 94, p. 593-603, 2004.

MOREIRA, R. M. P.; FERREIRA, J. M.; TAKAHASHI, L. S. A.; VANCONCELOS, M. E. C.; GEUS, L. C.; BOTTI, L. Potencial agrônômico e divergência genética entre genótipos de feijão-vagem de crescimento determinado. **Semina**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 1051-1060, 2009.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 51, p. 263-273, 1986.

MUTLU, N.; MIKLAS, P.; REISER, J.; COYNE, D. Backcross breeding for improved resistance to common bacterial blight in pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Breeding**, v. 124, p. 282 – 287, 2005.

MYERS, J. R.; BAGGETT, J. R. **Improvement of snap beans**. In: Common bean improvement for the 21 st century. (Ed. Singh S.), 1999.

NILSSON, J.; STEGMARK, R.; AKESSON, B. Total antioxidant capacity in different pea (*Pisum sativum*) varieties after blanching and freezing. **Food Chemistry**, v. 86, p. 501–507, 2004.

OPIO, A. F.; ALLEN, D. J.; TERIL, J. M. Pathogenic variation in *Xanthomonas campestri* pv. *phaseoli*, the causal agent of common bacterial blight in *Phaseolus beans*. **Plant Pathology**, v. 45, p. 1126-1133, 1996.

O'BOYLE, P. D.; KELLY, J. D.; KIRK, W. W. Use of Marker-assisted Selection to Breed for Resistance to Common Bacterial Blight in Common Bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 132, n. 3, p. 381–386, 2007.

PEIXOTO, N.; BRAZ, L. T.; BANZATTO, D. A.; OLIVEIRA, A. P. Adaptabilidade e estabilidade em feijão-vagem de crescimento indeterminado. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 616-618, 2002.

PLUMB, G. W.; PRICE, K. R.; WILLIAMSON, G. Antioxidant properties of flavonol glycosides from green beans. **Redox Report**, v. 4, n. 3, p. 123-127, 1999.

PROHENS, J.; NUEZ, F. 2008. Handbook of Plant Breeding. **Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae and Umbelliferae**, v. 2. Springer Science; New York; p. 30–40.

RAVA, C. A.; SARTORATO, A. Crestamento bacteriano comum. In: Sartorato, A.; Rava, C. A. (eds.) **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.217-242.

RIBEIRO, V. J.; BERTOLUCCI, F. L.; GRATTAPAGLIA, D. RAPD marker-guided mating in a reciprocal recurrent selection program of *Eucalyptus*. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, Salvador, 1997. **Proceedings**. Colombo: EMBRAPA/CNPF, 1997. v. 2, p. 156-160.

RODRIGUES, R. **Análise genética da resistência ao crestamento bacteriano comum e outras características agronômicas em *Phaseolus vulgaris* L.** 1997. 103 fls. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 1997.

RODRIGUES, R.; LEAL, N. R.; PEREIRA, M. G.; LAM-SÁNCHEZ, A. Combining ability of *Phaseolus vulgaris* L. for resistance to common bacterial blight. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 22, n. 4, dez. 1999.

RUFINO, M. do S. M; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. da; MANCINI FILHO, J.; MOREIRA, A. V. B. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas no sistema β -caroteno/ácido linoléico**. Comunicado Técnico EMBRAPA. n. 126: Fortaleza, 2006.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica:

Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS+. Comunicado Técnico EMBRAPA. n. 128: Fortaleza, 2007.

SANTOS, A. S.; BRESSAN-SMITH, R. E.; PEREIRA, M. G.; RODRIGUES, R.; FERREIRA, C. F. Genetic linkage map of *Phaseolus vulgaris* and identification of QTLs responsible for resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 5-10, 2003.

SANTOS, N. C. B. Potencialidades de produção do feijão orgânico. **Pesquisa & Tecnologia**, Campinas, v. 8, n. 2, 2011. Disponível em: < <http://www.apta regional.sp.gov.br/acesse-os-artigos-pesquisa-e-tecnologia/edicao-2011/2011-julho-dezembro/1254-potencialidades-deproducao-do-feijao-organico-1/file.html>>. Acesso em: 04 fev. 2015.

SANTOS, D.; HAESBAERT, F. M.; DAL`COL LÚCIO, A.; LOPES, S. J.; CARGNELUTTI FILHO, A.; BENZ, V. Aleatoriedade e variabilidade produtiva de feijão-de-vagem. **Ciência Rural**, v. 42, n. 7, p. 1147-1154, 2012.

SILBERNAGEL, M. J. Snap breeding. In: BASSET, M. J. (Ed.). **Breeding vegetable crops**. Avi Publishing, 1986. p. 243-282.

SILVA, F. C.; SOUZA, R. M.; ZACARONI, A. B.; LELIS, F. M. V.; FIGUEIRA, A. R. Otimização da técnica de PCR para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão. **Summa Phytopathologica**, v. 39, p. 45-50, 2013.

SILVA, M. P.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; PEREIRA, M. G.; RODRIGUES, R.; DAHER, R. F.; POSSE, S. C. P. Diversidade genética e identificação de híbridos por marcadores RAPD em feijão-de-vagem. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 27, p. 531-539, 2005.

SIMÃO, A. M. **Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico**. São Paulo: Nobel, 1985.

SINGH, S. P.; GUTIERREZ, J. A.; MOLINA, A.; URREA, C.; GEPTS, P. Genetic diversity in cultivated common bean. II. Marker-based analysis of morphological and agronomic traits. **Crop Science**, v. 31, p. 23-29, 1991.

SINGH, S. P. Broadening the genetic base of common bean cultivars: a review. **Crop Science**, v. 41, n. 6, p. 1659-1675, 2001.

SOUZA, J. L.; BALBINO, J. M. S.; COSTA, H.; PREZOTTI, L. C.; VENTURA, J. A.; BOREL, R. M. Pesquisas em Hortaliças Orgânicas: a experiência do INCAPER. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, n. s2, 2001.

SOUZA, J. L.; RESENDE, P. **Manual de Horticultura Orgânica**. Viçosa: Aprenda Fá- cil. 564p, 2003.

SUZUKI, K.; TAKEDA, H.; TSUKAGUCHI, T.; EGAWA, Y. Ultrastructural study on degeneration of tapetum in anther of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under heat stress. **Sexual Plant Reproduction**, v. 13, n. 6, p. 293–299, jul, 2001.

SVETLEVA, D.; PEREIRA, G.; CARLIER, J.; CABRITA, L.; LEITÃO, J.; GENCHEV, D. Molecular characterization of *Phaseolus vulgaris* L. genotypes included in Bulgarian collection by ISSR and AFLP™ analyses. **Scientia Horticulturae**, v. 109, p. 198-206, 2006.

TAR'AN, B.; MICHAELS, T. E.; PAULS, K. P. Mapping genetic factors affecting the reaction to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* L. under field conditions. **Genome**, n. 44, p. 1046–1056, 2001.

TESSARIOLI NETO, J.; GROppo, G. A. **A Cultura do Feijão-de-Vagem**. Campinas CATI (CATI. Boletim técnico, 212), 1992, 12p.

TOHME, J.; GONZALES, D. O.; BEEBE, S.; DUQUE, M. C. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. **Crop Science**, v. 36, n. 5, p. 1375-1384, 1996.

TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. (1995). **Isoenzimas – Variabilidade Genética em Plantas**, Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 175p.

TRINDADE, R. S.; RODRIGUES, R.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; GONÇALVES, L. S. A.; DAHER, R. F.; SUDRÉ, C. P. Critical disease components of common bacterial blight to effectively evaluate resistant genotypes of snap bean. **Journal of General Plant Pathology**, v. 78, p. 201–206, 2012.

TSUKAGUCHI, T.; KAWAMITSU, Y.; TAKEDA, H.; SUZUKI, K.; EGAWA, Y. Water status of flower buds and leaves as affected by high temperature in heat-tolerant and heat-sensitive of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Production Science**, v. 6, n. 1, p. 24-27, 2003.

USDA - United States Department of Agriculture, National Nutrient Database for Standard Reference, Basic Report 11062, Beans, snap, green, frozen, all styles, microwaved, 04 fevereiro, 2016.

VALE, F. X. R.; COSTA, H.; ZAMBOLIM, L. Feijão comum: doenças da parte aérea causada por fungos. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. v. 1, p. 341-350.

VENKATESWARAN, S.; PARI, L.; SARAVANAN, G. Effect of *Phaseolus vulgaris* on circulatory antioxidants and lipids in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Journal of Medical Food**, v. 5, n. 2, p. 97-103, 2002.

VIDAL, V. L.; PEIXOTO, N.; MORAES, E. A.; MOREIRA, J. A. Avaliação de genótipos de feijões especiais em sistema orgânico. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. s1, 2003.

VIEIRA, C. Perspectiva da cultura do feijão e de outras leguminosas de grãos no país e no mundo. In: ZIMMERMANN, M. J. O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Associação Brasileira da Potassa e do Fosfato. 1988, p.02-19.

VIEIRA, C.; BORÉM, A.; RAMALHO, M. A. P. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. (ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, 1999, p.273-349.

VIGGIANO, J. Produção de sementes de feijão-vagem. In: CASTELLANE, P. D.; NICOLOSI, W. M.; HASEGAWA, M. **Produção de sementes de hortaliças**. Jaboticabal, FUNEP/FCAV/UNESP, 1990, p.127-140.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 2, p. 304-309, fev. 1997.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v. 49, p. 4083-4089, 2001.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v. 49, p. 5165-5170, 2001.

3 ARTIGO A - ANÁLISE DE AFLP NA DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE FEIJÃO-DE-VAGEM DE HÁBITO DETERMINADO E INDETERMINADO

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo estimar e caracterizar a divergência genética entre acessos de feijão-de-vagem com hábitos de crescimento determinado e indeterminado do banco de germoplasma da UEL com base em marcadores AFLP. Para tanto foram caracterizados 40 e 32 acessos de hábito determinado e indeterminado, respectivamente. Para análise do AFLP, sete combinações de primers *EcoR1* e *Mse1* foram testadas, sendo selecionadas as combinações E-AAG/M-CTC, E-ACT/M-CTT, E-ACC/M-CTT. Esses produtos foram desnaturados e submetidos à eletroforese capilar. Para estimar as distâncias genéticas entre os acessos foi utilizada a distância de Jaccard e para análise de agrupamento os métodos UPGMA, coordenadas principais (PCoA) e estatística Bayesiana. As três combinações de iniciador/enzima revelaram um total de 485 lócus informativos, sendo a combinação E-ACC/M-CTT a que detectou o maior número de lócus informativos (49%). A análise da distribuição das frequências da dissimilaridade revelou que a distribuição foi uniforme variando de 0.1285 a 0.7310, com média de 0.4801, com os acessos de hábito indeterminado apresentando uma maior variabilidade quando comparado com os de hábito determinado. Pelas análises de agrupamento UPGMA, PCoA e Bayesiana verificou-se a formação de dois grandes grupos, para os quais se sugere uma possível predominância do hábito de crescimento do feijão-de-vagem quanto ao pool gênico. Os determinados podem estar mais associados ao pool gênico Andino, enquanto o indeterminado ao pool gênico Mesoamericano. Pela análise Bayesiana, verificou-se acessos intermediários aos dois grupos sugerindo-se uma introgressão entre os pool gênicos Andino e Mesoamericano.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L.. Marcadores moleculares. Polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados. Banco de germoplasma.

ABSTRACT: The present study aimed to estimate and characterize the genetic divergence between determinate and indeterminate snap bean accessions from the Universidade Estadual de Londrina (UEL) germplasm bank based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. A total of 40 and 32 accessions with determinate and indeterminate growth habits, respectively, were characterized for this purpose. Seven combinations of primers corresponding to *EcoR1* and *Mse1* were tested for the AFLP analysis, and the combinations E-AAG/M-CTC, E-ACT/M-CTT and E-ACC/M-CTT were selected. The resulting products were denatured and subjected to capillary electrophoresis. The Jaccard distance was used to estimate the genetic distances between accessions, and the Unweighted Pair Cluster Method with Arithmetic Mean (UPGMA), principal coordinates analysis (PCoA) and Bayesian statistics were used for the clustering analysis. The three combinations of

primer/enzyme revealed 485 informative loci in total, and the combination E-ACC/M-CTT detected the greatest number of informative loci (49%). The analysis of dissimilarity frequency distribution showed that the distribution was uniform, ranging from 0.1285 to 0.7310 with a mean of 0.4801, and the accessions with indeterminate growth habits exhibited greater variability than the accessions with determinate growth habits. The clustering UPGMA, PCoA and Bayesian analyses showed the formation of two large clusters, wherein there is a possible association between snap bean growth habit and gene pool. The determinate accessions may be more closely associated with the Andean gene pool, while the indeterminate ones may be associated with the Mesoamerican gene pool. The Bayesian analysis showed accessions intermediate to both groups, suggesting introgression between the Andean and Mesoamerican gene pools.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L.. Molecular markers. Amplified fragment length polymorphism. Gene bank.

3.1 INTRODUÇÃO

O feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) é considerado uma das olerícolas mais importantes no mundo, sendo relativamente rica em vitaminas, sais minerais e atividade antioxidante (BLAIR et al., 2010; ABU-REIDAH et al., 2013). Segundo dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), a estimativa de produção de feijão-de-vagem no mundo é de em torno de 21 milhões de toneladas, sendo a China, Indonésia, Índia e Turquia os maiores produtores (FAO, 2015).

No Brasil, os dados de produção e a importância do mercado de feijão-de-vagem são escassos em virtude da falta de estatísticas e de informação sistematizada. No entanto, essa cultura vem sendo amplamente cultivada por pequenos produtores, sendo considerada uma boa fonte de renda e uma alternativa para diversificar a produção, com uso crescente em rotação de culturas ou no período de entressafra de outras olerícolas, como a do pimentão e tomate (FRANCELINO et al., 2011; SANTOS et al., 2012).

O feijão-de-vagem é classificado em função de três caracteres: tipo de vagem, coloração da vagem e o hábito de crescimento. Em relação ao tipo de vagem, podem ser classificadas como tipo “manteiga” (formato achatado) e “macarrão” (formato arredondado). No quesito cor de vagem,

existem quatro tipos básicos de coloração (verde-escura, verde-clara, amarela e púrpura). Quanto ao hábito de crescimento, as plantas são classificadas em crescimento determinado, quando a porção terminal da haste se encerra em uma inflorescência; e crescimento indeterminado, quando a extremidade da haste termina em um meristema vegetativo que possibilita a continuidade do crescimento da planta (KWAK et al., 2012).

Dois loci fenotípicos têm sido reportados no controle do hábito de crescimento no feijoeiro, sendo o *lóco fin* o primeiro identificado, em 1915, e posteriormente mapeado no cromossomo Pv01, e o segundo *lóco*, sem identificação, mapeado no cromossomo Pv07 (KOINANGE; SINGH; GEPTS, 1996; KOLKMAN; KELLY, 2003). O *fin* é responsável por determinar a maioria das variedades com hábito de crescimento determinado, dos quais têm origem do *pool* gene Andino, enquanto o segundo *loco* é responsável por determinar algumas cultivares de feijoeiro Michigan Navy, que surgiram de um programa de mutagênese artificial (KELLY, 2001). Kwak et al. (2012) concluíram que o hábito de crescimento determinado é uma característica de domesticação, no qual visa diminuir a biomassa vegetal e otimizar a alocação de fotossintetizados entre o crescimento vegetativo e reprodutivo.

A Universidade Estadual de Londrina (UEL) mantém um banco de germoplasma de feijão-de-vagem, sendo que uma grande parte desses acessos foi cedida pelo International Center for Tropical Agriculture (CIAT), no qual, são constituídos por variedades locais, cultivares tradicionais e linhagens provenientes do programa de melhoramento do CIAT. Nesse sentido, a caracterização desses acessos é de elevada importância, pois podem contribuir para identificação de possíveis duplicatas e fornecer dados que facilitem a organização dos acessos no banco de germoplasma, facilitando a sua utilização em programas de melhoramento (GONÇALVES et al., 2008a; SUDRÉ et al., 2010; MOULIN et al., 2012).

A caracterização do germoplasma pode ser realizada por meio de características agronômicas, morfológicas, bioquímicas, fisiológicas, moleculares, dentre outras (GONÇALVES et al., 2008b). Entretanto, os marcadores moleculares possuem vantagem sobre os demais, por revelarem

diferenças genéticas com maiores detalhes e sem as interferências causadas pelo efeito ambiental, sendo técnicas rápidas na discriminação da diversidade presente (LEAL et al., 2010).

Existem diferentes tipos de marcadores moleculares, no qual, diferenciam-se pelo potencial para detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade dos resultados (GUPTA; RUSTGI; MIR, 2013). Dentre os tipos de marcadores, o AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) (VOS et al., 1995) destaca-se como uma poderosa ferramenta para caracterização do germoplasma, devido à reprodutibilidade, robustez, geração de poucos artefatos e ampla cobertura do genoma (MEUDT; CLARKE, 2007; SANTOS et al., 2011).

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo estimar e caracterizar a divergência genética entre 72 acessos de feijão-de-vagem de hábito de crescimento determinado e indeterminado do banco de germoplasma da UEL com base em marcadores AFLP.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 72 acessos de feijão-de-vagem pertencente ao banco de germoplasma da Universidade Estadual de Londrina (UEL – BGFV), sendo 40 e 32 acessos de hábito de crescimento determinado e indeterminado, respectivamente.

O DNA total foi extraído das folhas jovens dos acessos utilizando o protocolo de Doyle e Doyle (1987). Após a extração do DNA, foi verificada a integridade do DNA em gel de agarose a 1.0%, sendo corado em solução de brometo de etídeo ($0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e visualizada por meio do fotodocumentador. A quantificação do DNA das amostras foi obtida pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000/2000c (Thermo Scientific).

O AFLP foi realizado conforme Vos et al. (1995), com algumas modificações. Aproximadamente 700 ng de DNA de cada acesso foram duplamente digeridos pelas enzimas *EcoR1* e *Mse1*, com 5U cada, por 18 horas a 37 °C. Os fragmentos gerados foram ligados aos adaptadores, *EcoRI*

0.5 μM e *MseI* 5.0 μM , com a enzima T4 DNA ligase 1U, tampão T4 DNA ligase 1X, NaCl 0.05 M, BSA 50 ng/ μL , DTT 0.25 mM para um volume final de 10 μL . A reação foi incubada a 37 °C por 3 horas, 17 °C por 30 minutos e 70 °C por 10 minutos, no termociclador. Em seguida, foi diluída (1:1) com água ultrapura. Posteriormente, os fragmentos foram amplificados com um par de primers, contendo uma base seletiva.

A amplificação pré-seletiva foi realizada para um volume final de 10 μL , utilizando 3.5 μL do kit GoTaq® *Green Master Mix* (Promega); primer pré-seletivo 4.75 μM ; e 3.0 μL da diluição da reação de restrição/ligação. A programação do termociclador consistiu de: 2 minutos a 72 °C, seguidos de 20 ciclos de 1 segundo a 94 °C, 30 segundos a 56 °C e 2 minutos a 72 °C, e por fim, 30 minutos a 60 °C. As reações de amplificação seletiva foram compostas de 0.54 μL de cada primer seletivo de *MseI* 5 μM e *EcoRI* 1 μM ; 3.5 μL GoTaq® *Green Master Mix* (Promega); e 3 μL do DNA pré-amplificado diluído (1:8) com água ultrapura, para um volume final de 10 μL . Para o seletivo foram testados sete combinações de primers *EcoRI* e *MseI* (E-AAG/M-CTC, E-ACT/M-CTT, E-ACC/M-CTT, E-ACG/M-CTT, E-ACA/M-CTT, E-AAC/M-CTT, E-ACT/M-CTA), contendo três nucleotídeos seletivos. As reações com os nucleotídeos seletivos foram realizadas, no termociclador, da seguinte maneira: ciclo inicial de 2 minutos a 94°C; 30 segundos a 65°C e 2 minutos a 72°C; 8 ciclos de 1 segundo a 94°C, 30 segundos a 64°C e 2 minutos a 72°C, decrescendo 1°C a cada ciclo; 23 ciclos de 1 segundo a 94°C, 30 segundos a 56°C e 2 minutos a 72°C, e por fim, 30 minutos a 60°C. Das sete combinações testadas, três foram selecionadas (E-AAG/M-CTC, E-ACT/M-CTT, E-ACC/M-CTT), nas quais os primers *EcoRI* estavam marcados com fluoróforos: azul (FAM), verde (HEX) e amarelo (NED), respectivamente.

Aos produtos da reação seletiva foram adicionados 0.2 μL de *size standard* ROX-500 (Applied Biosystems) e 8.8 μL de formamida Hi-Di. Posteriormente, foram desnaturados e submetidos à eletroforese capilar pelo sistema automatizado 3500 xL (Applied Biosystems). Todas as amplificações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Para a análise do AFLP, os dados foram interpretados por presença e ausência de bandas, gerando-se uma matriz binária. Para estimar as distâncias genéticas entre os acessos de feijão-de-vagem foi utilizado o complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard. A representação simplificada das distâncias genéticas entre os acessos foi obtida pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average*), pela análise de coordenadas principais (PCoA) e pela estatística Bayesiana. Para verificar a confiabilidade dos agrupamentos formados pelo método UPGMA foi realizada a análise de Bootstrap com 1000 replicações. A estimação da matriz de distância e os agrupamentos UPGMA e PCoA foram realizadas utilizando o programa R (<http://www.r-project.org>), enquanto para estatística bayesiana foi utilizado o programa Structure v.2.3.2 (PRITCHARD et al., 2000).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As três combinações de iniciador/enzima (E-AAG/M-CTC, E-ACT/M-CTT, E-ACC/M-CTT) revelaram um total de 485 lócus. A combinação E-ACC/M-CTT detectou o maior número de lócus informativos (237), enquanto as combinações E-AAG/M-CTC e E-ACT/M-CTT obtiveram 105 e 143 lócus informativos, respectivamente. Maciel et al. (2003) e Blair et al. (2010) avaliando a variação genética e relação entre acessos de feijão comum e feijão-de-vagem, respectivamente, utilizando marcador AFLP, verificaram também maior número de polimorfismo para combinação E-ACC/M-CTT.

A análise da distribuição das frequências da dissimilaridade de 2.556 combinações para os pares dos 72 acessos de feijão-de-vagem revelou que a distribuição foi uniforme variando 0.1285 a 0.7310 com média de 0.4801 (± 0.1327) (Figura 3.1). O intervalo entre 0.40 a 0.60 revelou as maiores frequências, com 51.4%.

Quando foram avaliados por grupo, os acessos de hábito determinado variaram de 0.1285 (BGFv 31 x BGFv 32) a 0.6446 (BGFv 31 x BGFv 06) com média de 0.3683 (± 0.1111), enquanto para os acessos de

hábito indeterminado variaram de 0.1523 (BGFv 76 x BGFv 83) a 0.7011 (BGFv 65 x BGFv 84) com média de 0.4402 (\pm 0.1097) (Figura 3.1). Ambos os grupos de acessos são na grande maioria provenientes do banco de germoplasma do CIAT.

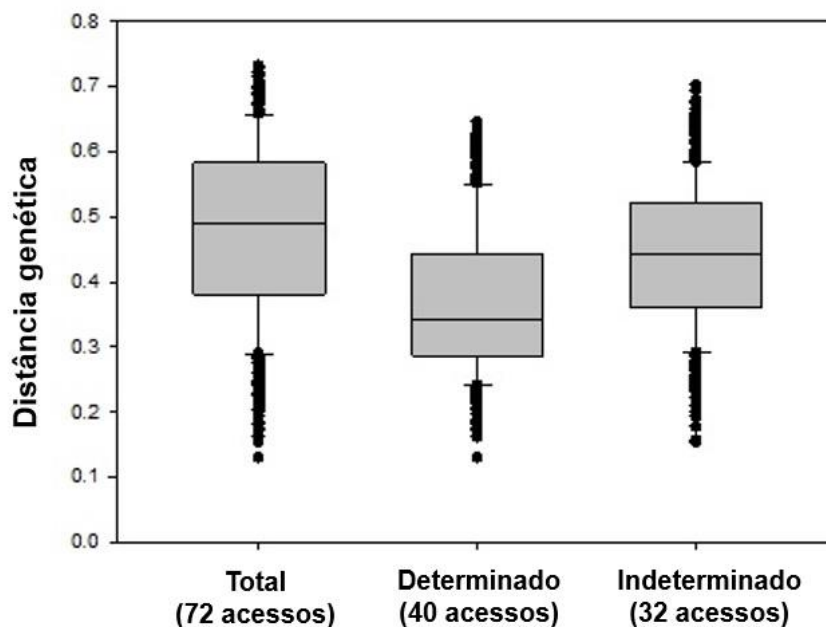


Figura 3.1. Box plot de dissimilaridade baseado em marcadores AFLP entre 72 acessos de feijão-de-vagem de crescimento determinado e indeterminado.

Pela análise do agrupamento hierárquico UPGMA verificou-se a formação de dois grandes grupos, sendo o primeiro grupo formado exclusivamente por acessos de hábito determinado, enquanto o segundo grupo foi formado por acessos de hábito indeterminado e seis acessos de hábito determinado (Figura 3.2). Este resultado foi corroborado pela estatística Bayesiana, que mostrou que o maior valor de ΔK foi alcançado mediante a formação de dois grandes grupos. Grupo I (em vermelho) foi formado pela maioria dos acessos com hábitos de crescimento indeterminado, enquanto que o grupo II (em verde) foi formado por acessos com hábitos de crescimento determinado. Além disso, alguns acessos mostraram um padrão de classificação intermediária, como apresentado no gráfico de barras (Figura 3.3).

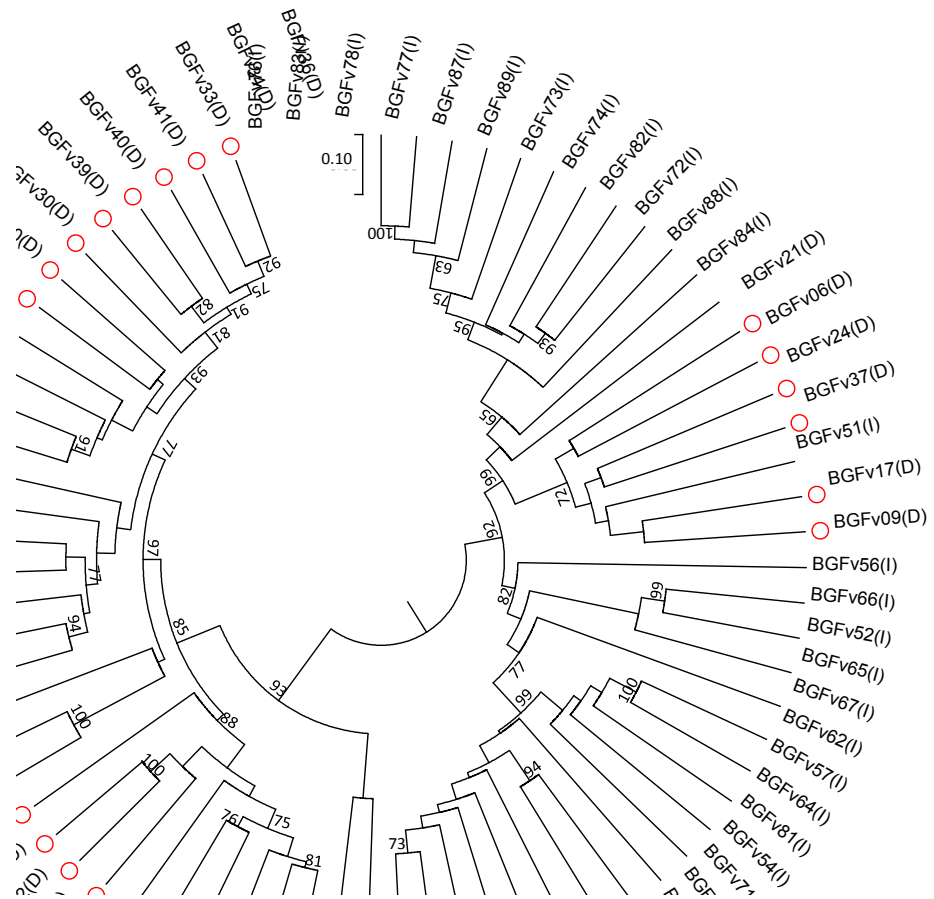


Figura 3.2. Dendrograma UPGMA das relações genéticas entre 72 acessos de feijão-de-vagem de hábitos de crescimento determinado e indeterminado baseado em marcadores AFLP. Os valores Bootstrap são correspondentes ao nó de cada cluster.

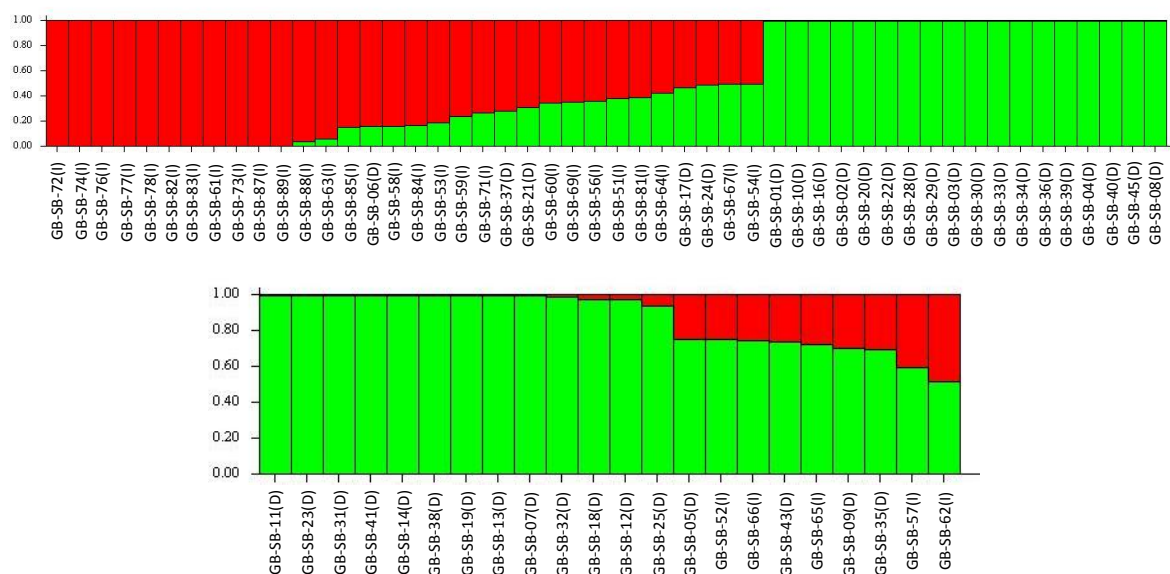


Figura 3.3. Bar plot baseado em três combinações AFLP de primer/enzima (E-AAG/M-CTC, E-ACT/M-CTT, e E-ACC/M-CTT) para os 72 acessos de feijão-de-vagem de hábitos de crescimento determinado e indeterminado, que mostra as distribuições de ambos os grupos.

A PCoA também mostrou a separação de ambos os grupos de feijão-de-vagem (Figura 3.4). O hábito de crescimento está relacionado com a domesticação, e aparece como um número de características, incluindo as ramificações reduzidas, entrenós mais curtos, menor número de nós e entrelaçamento reduzido.

Em alguns casos, a parte terminal da haste termina em uma inflorescência, de acordo com Smartt (1990). Todas as espécies selvagens de *Phaseolus* são indeterminadas, como alguns tipos domesticados, enquanto todos os acessos determinadas são domesticados. Kwak et al. (2012) observaram que *PvTFL1y* (um gene associado com a determinância) foi originado em ambos os *pools* gênicos, andino e mesoamericano, quando estudaram as múltiplas origens do hábito de crescimento determinado em plantas de feijão comum.

Da mesma forma que os outros tipos de feijão, acredita-se que o centro primário de diversidade do feijão-de-vagem seja nas Américas. No entanto, esta cultura teve uma ampla distribuição e diversificação em várias regiões do mundo, especialmente na Europa e na Ásia (MYERS; BAGGETT,

1999).

De acordo com Blair et al. (2010), há um equívoco entre vários autores que a totalidade ou a maioria dos genótipos de feijão-de-vagem foram derivadas do *pool* gênico Andino de feijão comum, dado que a análise inicial revelou que o feijão-de-vagem de crescimento determinado geralmente apresenta padrões de proteínas faseolina do tipo Andino (“T”, “C”, ou “H”; (BROWN et al., 1982; GEPTS et al., 1986). No entanto, Blair et al. (2010) utilizando marcadores AFLP e microssatélites para avaliar 120 acessos de feijão-de-vagem de crescimento indeterminado, observaram que os acessos pertenciam a ambos os grupos gênicos, com predomínio do *pool* gênico mesoamericano sobre o Andino.

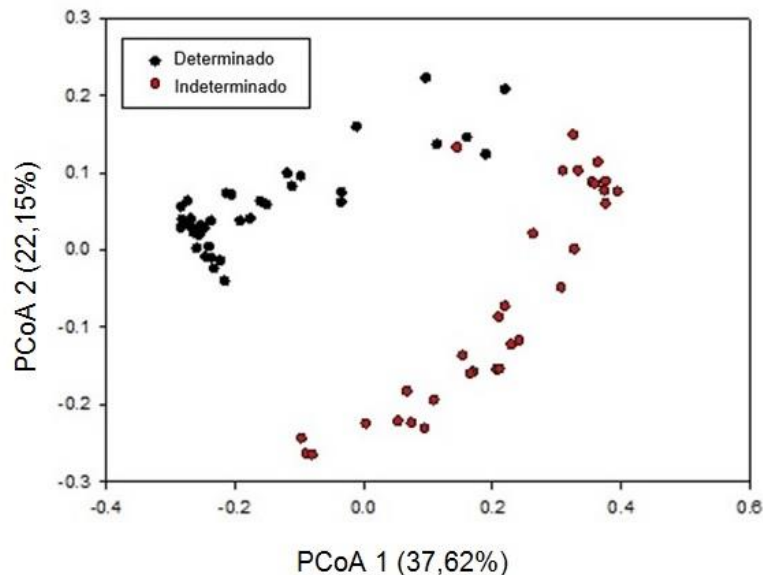


Figura 3.4. PCoA de 72 acessos de feijão-de-vagem de hábitos de crescimento determinado e indeterminado baseado em marcadores AFLP.

Assim, uma possível predominância do hábito de crescimento do feijoeiro em relação ao *pool* gênico é sugerida com base nos resultados do presente estudo, em que os de hábito de crescimento determinado podem estar mais intimamente associados com o *pool* gênico Andino, enquanto os indeterminados podem ser mais estreitamente associados com o *pool* gênico mesoamericano. Esse fato é corroborado porque alguns acessos de feijão-de-vagem de crescimento indeterminado utilizados no presente estudo são derivados das variedades Blue Lake (GB-SB-51, GB-SB-52, GB-SB-53, GB-

SB-54, GB-SB-60, GB-SB-73 e GB-SB-87), Osu 4852 (GB-SB-61 e GB-SB-63), Lago Azul (GB-SB-64), G15300-Zambia (GB-SB-69) e G15801-Zambia (GB-SB-77), consideradas como mesoamericanas por Blair et al. (2010).

No que diz respeito à diversidade dentro dos grupos dos acessos do feijão-de-vagem (hábitos de crescimento), as estatísticas Pseudo T^2 e CCC apresentaram a formação de seis subgrupos de acessos de hábito de crescimento indeterminado no agrupamento UPGMA, enquanto cinco subgrupos foram formados no agrupamento dos acessos de crescimento determinado. A análise de pseudo F avalia o número ótimo de grupos por meio do incremento do valor F no qual no maior número verifica-se a melhor partição do grupos. Nos acessos de crescimento indeterminado, o subgrupo I consistiu de 12 acessos, com todos os acessos agrupados com o mesmo padrão, tal como determinado pela análise Bayesiana e representada pelo gráfico de barras. Acessos individuais foram alocados nos subgrupos II, III e V (GB-SB51 (I), em GB-SB-56 (I) e CL-SB-67 (I), respectivamente), enquanto os subgrupos IV e VI foram formados por três e 14 acessos, respectivamente. Os acessos dos subgrupos II, III, IV, V e VI mostraram um padrão de duas cores (vermelho e verde) no gráfico de barras (Figura 3.3), indicando introgressão no *pool* gênico. A introgressão é mais evidente nos acessos GB-SB-52 (I), em GB-SB-66 (I), em GB-SB-SB65 (I), em GB-SB-57 (I) e GB-SB-62 (I), em que um padrão intermediário dos *pools* gênicos é anotado.

Nos acessos de hábito de crescimento determinado, os grupos I, II, III, IV e V consistiram de 6, 2, 10, 3 e 19 acessos, respectivamente. O subgrupo I (GB-SB-21(D), GB-SB-06(D), GB-SB-24(D), GB-SB-37(D), GB-SB-17(D) e GB-SB-09(D)) foi o que mais divergiu dos outros subgrupos, tendo os acessos mostrado amplo efeito do *pool* gênico, como mostrado no gráfico de barras. Os acessos GB-SB-43(D) e GB-SB-35D(D) provenientes do subgrupo II e o acesso GB-SB-05(D) oriundo do subgrupo III também mostraram o mesmo efeito. Os outros acessos mostraram um único padrão de cor no gráfico de barra. A introgressão dos *pools* gênicos andino e mesoamericano também foram demonstradas em outros estudos (MÉTAIS et al., 2002; CUNHA; HINTZ; GRIFFITHS, 2004; BLAIR et al., 2010). Segundo Blair et al. (2010), a

introgressão entre os *pools* gênicos em feijão-de-vagem pode ser mais provável do que em feijão comum, pois o tamanho das sementes e as restrições de cores são mais diferentes em feijão-de-vagem do que em feijão comum.

CONCLUSÃO

Há variabilidade entre os acessos de feijão-de-vagem, e o agrupamento UPGMA, PCoA e análise Bayesiana apresentam a formação de dois grandes grupos, indicando uma possível relação do hábito de crescimento do feijão-de-vagem com o *pool* gênico.

REFERÊNCIAS

ABU-REIDAH, I. M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Phytochemical characterization of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by using high-performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 24, p. 105-116, 2013.

BLAIR, M. W.; CHAVES, A.; TOFIÑO, A.; CLADERÓN, J. F.; PALACIO, J. D. Extensive diversity and inter-genepool introgression in a world-wide collection of indeterminate snap bean accessions. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 120, p. 1381-1391, 2010.

BROWN, J. W. S.; McFERSON, J. R.; BLISS, F. A.; HALL, T. C. Genetic divergence among commercial classes of *Phaseolus vulgaris* in relation to phaseolin pattern. **HortScience**, v. 17, p. 752-754, 1982.

CUNHA, C.; HINTZ, T.; GRIFFITHS, P. Genetic diversity of snap bean cultivars determined using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **HortScience**, v. 39, p. 481-484, 2004.

DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1987.

FAO-Food and Agriculture Organization. Statistical databases – Agriculture. Home: FAO. Disponível em: <<http://www.apps.fao.org>>. Acessado 20 junho. 2015.

FRANCELINO, F. M. A.; GRAVINA, G. A.; MANHÃES, C. M. C.; CARDOSO, P. M. R.; ARAÚJO, L. C. Avaliação de linhagens de feijão-de-vagem para as

regiões norte e noroeste fluminense. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 554-562, 2011.

GEPTS, P.; OSBORN, K.; RASHKA, K.; BLISS, F. Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): Evidence for multiple center of domestication. **Economic Botany**, v. 40, p. 451-468, 1986.

GONÇALVES, L. S. A.; RODRIGUES, R.; SUDRÉ, C. P.; BENTO, C. S.; MOULIN, M. M.; ARAUJO, M. L.; DAHER, R. F.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G. Divergência genética em tomate estimada por marcadores RAPD em comparação com descritores multicategóricos. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 364-370, 2008a.

GONÇALVES, L. S. A.; RODRIGUES, R.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; KARASAWA, M.; SUDRÉ, C. P. Comparison of multivariate statistical algorithms to cluster tomato heirloom accessions. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 1289-1297, 2008b.

GUPTA, P. K.; RUSTGI, S.; MIR, R. R. **Array-based high-throughput DNA markers and genotyping platforms for cereal genetics and genomics**. In: Cereal Genomics II (Eds. GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K.), pp. 11-55, 2013.

KELLY, J. D. Remaking bean plant architecture for efficient production. **Advances in Agronomy**, v. 71, p. 109-143, 2001.

KOINANGE, E. M. K.; SINGH, S. P.; GEPTS, P. Genetic control of the domestication syndrome in common-bean. **Crop Science**, v. 36, p. 1037-1045, 1996.

KOLKMAN, J. M.; KELLY, J. D. QTL conferring resistance and avoidance to white mold in common bean. **Crop Science**, v. 43, p. 539-548, 2003.

KWAK, M.; TORO, O.; DEBOUCK, D. G.; GEPTS, P. Multiple origins of the determinate growth habit in domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Annals of Botany**, v. 110, p. 1573-1580, 2012.

LEAL, A. A.; MANGOLIN, C. A.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; GONÇALVES, L. S. A.; SCAPIM, C. A.; MOTT, A. S.; ELOI, I. B. O.; CORDOVÉS, V.; SILVA, M. F. P. Efficiency of RAPD versus SSR markers for determining genetic diversity among popcorn lines. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 9-18, 2010.

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

MÉTAIS, I.; HAMON, B.; JALOUZOT, R.; PELTIER, D. Structure and level of

genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers from a genomic enriched library. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 1346-1352, 2002.

MEUDT, H. M.; CLARKE, A. C. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. **Trends in Plant Science**, v. 12, p. 106-117, 2007.

MOULIN, M. M.; RODRIGUES, R.; GONÇALVES, L. S. A.; SUDRÉ, C. P.; PEREIRA, M. G. A comparison of RAPD and ISSR markers reveals genetic diversity among sweet potato landraces (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 34, p. 139-147, 2012.

MYERS, J. R.; BAGGETT, J. R. **Improvement of snap beans**. In: Common bean improvement in the Twenty-first Century. (Ed. Singh S.) 1999.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R.; RODRIGUES, M. A.; RIBEIRO, H. L. C.; SILVA, G. O. Similaridade genética entre cultivares de cebola de diferentes tipos e origens, baseada em marcadores AFLP. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 32-37, 2011.

SANTOS, D.; HAESBAERT, F. M.; DAL`COL LÚCIO, A.; LOPES, S. J.; CARGNELUTTI FILHO, A.; BENZ, V. Aleatoriedade e variabilidade produtiva de feijão-de-vagem. **Ciência Rural**, v. 42, p. 1147-1154, 2012.

SMARTT, J. **Grain legumes: evolution and genetic resources**. Cambridge: Cambridge University Press. 1990.

SUDRÉ, C. P.; GONÇALVES, L. S. A.; RODRIGUES, R.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; RIVA-SOUZA, E. M.; BENTO, C. S. Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp. as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 283-294, 2010.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. V.; HORNES, M.; FRITERS, M.; POT, J.; PALEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

4 ARTIGO B - SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO-DE-VAGEM PARA CULTIVO ORGÂNICO E IDENTIFICAÇÃO DE FONTES DE RESISTÊNCIA AO CRESTAMENTO BACTERIANO

RESUMO: O feijão-de-vagem vem sendo amplamente cultivado por agricultores orgânicos por ser uma boa fonte de renda e uma alternativa para diversificar a produção, com uso crescente em rotação de culturas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar 25 acessos de feijão-de-vagem de hábito determinado para desenvolvimento de um programa de melhoramento para manejo orgânico, e verificar o nível de resistência desses acessos em relação ao crestamento bacteriano comum (CBC). Para avaliação do desempenho agrônômico foram conduzidos dois experimentos de campo, em blocos ao acaso, enquanto a avaliação de resistência ao CBC foi conduzida em casa de vegetação, sob delineamento inteiramente ao acaso, utilizando dois isolados bacterianos, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. Na avaliação agrônômica, os acessos UEL 402, UEL 405, UEL 407, UEL 408, UEL 412, UEL 417 e UEL 420 apresentaram elevada produtividade para ambas as épocas (10,31, 8,66, 9,46, 9,17, 8,95, 9,29 e 9,18 t ha⁻¹, respectivamente), sendo considerados promissores para indicação aos produtores orgânicos da região de Londrina e para programas de melhoramento visando à disponibilidade de novas cultivares adaptadas à região. Na avaliação do CBC, todos os acessos foram moderadamente suscetíveis, sendo os acessos UEL 407, UEL 409, UEL 411, UEL 412, UEL 424 e UEL 431 os que apresentaram os menores valores para área abaixo da curva do progresso do crestamento bacteriano para ambos os isolados.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L.. *Xanthomonas axonopodis*. *Xanthomonas fuscans*. Agricultura familiar. Agroecologia.

ABSTRACT: The snap bean has been widely cultivated for organic farmers and is considered a good source of income and an alternative to diversify production, with increasing use in crop rotation. The aim work to evaluate 25 snap bean accessions with determinate growth habits, to develop a breeding program for organic management, and check the level of resistance of the accessions in relation common bacterial blight (CBB). For agronomic evaluation two field experiments in randomized block were conducted, while the assessment of resistance to CBB was conducted in a greenhouse in a completely randomized design, using two bacterial isolates (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*). In agronomic evaluation, the UEL 407, UEL 409, UEL 411, UEL 412, UEL 424 and UEL 431 accessions showed high yield for both periods (10,31, 8,66, 9,46, 9,17, 8,95, 9,29 e 9,18 t ha⁻¹, respectively), were considered promising for indication to organic producers in the region and also be used in breeding programs for the availability of new cultivars. In assessing the CBB, all accessions were moderately susceptible. The UEL 407, UEL 409, UEL 411,

UEL 412, UEL 424 and UEL 431 accessions those who had the lowest values for area under the curve of the bacterial blight progress for both isolates.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L.. *Xanthomonas axonopodis*. *Xanthomonas fuscans*. Family farm. Agroecology.

4.1 INTRODUÇÃO

O feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) é considerado uma das principais olerícolas no mundo, sendo estimada uma produção de em torno de 20 milhões de toneladas (FAO, 2015). No Brasil, os dados de produção e a importância do mercado de feijão-de-vagem são escassos. No entanto, essa hortaliça vem sendo amplamente cultivada por pequenos produtores, sendo considerada uma boa fonte de renda e uma alternativa para diversificar a produção, com uso crescente em rotação de culturas ou no período de entressafra de outras olerícolas.

As cultivares de feijão-de-vagem podem ser classificadas quanto ao hábito de crescimento e o tipo e coloração das vagens. As cultivares de hábito indeterminado são as mais utilizadas pelos produtores no Brasil por atingirem maiores produções quando comparadas às de hábito determinado. Entretanto, possuem maior exigência de mão de obra já que necessita de tutoramento e, por terem ciclo maior, estão mais sujeitas à incidência de pragas e doenças (MOREIRA et al., 2009). Em relação ao tipo de vagem, podem ser classificadas como tipo manteiga e macarrão, enquanto no quesito cor de vagem, existem quatro tipos básicos de coloração (verde-escura, verde-clara, amarela e púrpura).

Apesar da importância econômica e social da cultura do feijão-de-vagem, programas de melhoramento para manejo orgânico são escassos. O manejo orgânico, considerado como uma alternativa ao desenvolvimento sustentável vem apresentando grande desenvolvimento nas últimas décadas em vários países do mundo (WILLER; KILCHER, 2012). No Brasil, segundo os dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em 2015, 10.505 produtores agrícolas trabalhavam segundo as diretrizes dos sistemas orgânicos de produção, representando um incremento de 56%

quando comparado aos dados de 2013, ano em que 6,7 mil produtores estavam credenciados (MAPA, 2015).

As cultivares para agricultura orgânica devem ser produzidas de acordo com os preceitos agroecológicos, utilizando germoplasma adaptado às condições locais. Muitas vezes em ensaios comparativos entre sistemas convencionais e orgânicos, as cultivares com melhor desempenho em sistemas convencionais nem sempre tem melhor desempenho em sistemas orgânicos (KIRK; FOX; ENTZ, 2012; LUBY; LYON; SHELTON, 2013).

Para o sistema de cultivo orgânico, a cultivar ideal deve apresentar rusticidade, resistência às pragas e doenças e produtividade satisfatória sem a utilização de fertilizantes solúveis (VIDAL et al., 2007). Dentre as principais doenças do feijão-de-vagem, o crestamento bacteriano comum (CBC), causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (SMITH, 1897) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995 (Xap) [= *X. campestris* pv. *phaseoli* (SMITH, 1897) Dye 1978b] e por *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* Schaad et al. 2007(Xff) (EFSA Panel on Plant Health, 2014) é considerada a principal bacteriose do feijoeiro no Brasil (TRINDADE et al., 2012; SILVA et al., 2013). Esse patógeno está presente em todos os ambientes no qual *P. vulgaris* é cultivado, proliferando principalmente em condições de alta temperatura e umidade (MIKLAS et al., 2003).

Os sintomas do CBC podem se manifestar na parte aérea da planta, sendo observados em folhas, caules, vagens e sementes (RAVA; SARTORATO, 1994). No início, as folhas apresentam manchas encharcadas que, mais tarde, evoluem para manchas necróticas podendo estar circundadas por um halo amarelo. As lesões adjacentes coalescem e, em infecções severas, o CBC pode causar a morte da folha e desfolha da planta. Nas vagens, as lesões inicialmente são circulares e encharcadas, tornando-se necróticas e avermelhadas. As sementes podem apresentar descoloração no hilo, manchas no tegumento e enrugamento, no entanto, em alguns casos, a infecção na semente é assintomática (BIANCHINI et al., 2005).

O controle do CBC deve ser realizado por meio de várias medidas de manejo simultaneamente, pois o controle químico com produtos

bactericidas não é eficiente. Dentre as medidas recomendadas destacam-se, o cultivo em áreas não infestadas com o patógeno, o uso de sementes sadias, a rotação de culturas, o uso adequado de irrigação e o emprego de cultivares resistentes ou tolerantes (TRINDADE et al., 2015). Entretanto, o desenvolvimento de cultivares de feijão-de-vagem resistentes ao CBC ainda é um desafio para os melhoristas. Isto demanda a identificação de fontes de resistência tanto em genótipos de feijão-de-vagem, quanto em feijoeiro comum, embora em *P. vulgaris* não se encontrem níveis elevados de resistência a *Xanthomonas* sp.

O presente trabalho teve como objetivo selecionar acessos de feijão-de-vagem de hábito determinado do banco de germoplasma da Universidade Estadual de Londrina (UEL) para desenvolvimento de um programa de melhoramento para manejo orgânico, e verificar o nível de resistência desses acessos em relação ao cretamento bacteriano comum.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Vinte e cinco acessos de feijão-de-vagem do banco de germoplasma da Universidade Estadual de Londrina (UEL) foram avaliados quanto a aspectos agrônômicos e de resistência ao cretamento bacteriano. Para avaliação agrônômica, foram conduzidos dois experimentos na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina (UEL) (23°20'23"S, 51°12'32"O, 535 m de altitude) em uma área sob manejo orgânico há cinco anos. O experimento I foi realizado entre os meses de setembro a dezembro de 2013, e o experimento II nos meses de abril a junho de 2014.

O solo da região é classificado como Latossolo Vermelho e o clima subtropical úmido mesotérmico Cfb, com verões quentes, invernos com ocorrência de geadas severas e frequentes, não apresentando estação seca (classificação de Köppen). A temperatura média anual é 20°C. A análise química do solo (AQS) apresentou os seguintes valores $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}=5,5$; $\text{P}=3,41 \text{ cmolc.dm}^{-3}$; $\text{K}^+=0,74 \text{ cmolc.dm}^{-3}$; $\text{Ca}^{+2}=6,8 \text{ cmolc.dm}^{-3}$; $\text{Mg}^{+2}=1,2 \text{ cmolc.dm}^{-3}$;

$Al^{+3}=0,05$; $H + Al=4,28 \text{ cmolc.dm}^{-3}$; $CTC = 13,02 \text{ cmolc.dm}^{-3}$; $V=67,13\%$ e $MO=1,87\%$.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com três repetições e 20 plantas por parcela. O espaçamento adotado foi $0,2 \times 0,45$ m entre plantas e entre linhas, respectivamente. O preparo do solo na área, para ambos os experimentos, foi realizado com composto orgânico, utilizando-se 10 t ha^{-1} com a seguinte análise química: $pH_{H_2O}=7,2$; $P=359,30 \text{ mg.dm}^{-3}$; $K^+=5,78 \text{ cmolc.dm}^{-3}$; $Ca^{+2}=9,5 \text{ cmolc.dm}^{-3}$; $Mg^{+2}=6,9 \text{ cmolc.dm}^{-3}$; $Al^{+3}=0,0$; $H + Al=2,19 \text{ cmolc.dm}^{-3}$; $CTC = 24,37 \text{ cmolc.dm}^{-3}$; $V=91,01\%$ e $MO= 5,5\%$. O sistema de irrigação implantado nos dois experimentos foi o de aspersão. Para inibir o aparecimento de plantas daninhas foi colocado palhada nas linhas e entrelinhas. Calda bordalesa (0,5%) foi aplicada antes do florescimento para controle de doenças.

As características agrônômicas avaliadas foram número de vagens comerciais por planta (NVcP); número de vagens não comerciais por planta (NVncP); massa de vagens comerciais (MVc), em gramas, e; produção comercial (PROD), em t ha^{-1} . As vagens consideradas comerciais foram aquelas com mais de 10 cm de comprimento e sem danos, nem doenças.

Para avaliação de resistência ao crestamento bacteriano comum (CBC), o experimento foi conduzido em casa de vegetação no departamento de Agronomia da UEL entre dezembro de 2013 a fevereiro de 2014. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 10 repetições. Os acessos foram cultivados em vasos com capacidade de 5 litros, com substrato composto por 50% de solo, 30% de esterco e 20% de areia. Foram utilizadas quatro sementes por vaso, realizando um desbaste após a emergência das plântulas para obtenção de duas plantas por vaso.

Foram utilizados dois isolados bacterianos (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* – Xap e *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* - Xff), cedidos pelo Instituto Biológico de São Paulo e Instituto Agrônomo do Paraná, respectivamente.

A inoculação foi realizada 35 dias após a semeadura. Para tanto, cada isolado foi riscado com alça de platina em placa de Petri contendo

meio DYGS (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA; VICTOR, 1986). Após 36 horas, as colônias bacterianas foram suspensas em água destilada e a concentração de células ajustada para 10^7 UFC.mL⁻¹, em espectrofotômetro a 640 nm de absorvância. Para a inoculação, selecionou-se um trifólio por planta e, neste trifólio, selecionavam-se dois folíolos, sendo que cada folíolo recebia a inoculação com um dos isolados bacterianos por meio de dois cortes de 2 cm com tesoura previamente imersa na suspensão bacteriana.

A severidade do crestamento bacteriano foi avaliada diariamente durante 30 dias utilizando a escala diagramática de Pastor-Corrales et al. (1981), onde: 1 = sem sintomas; 2 = 1 a 5% de necrose; 3 = 6 a 25% de necrose; 4 = 26 a 50% de necrose; 5 = > 50% de necrose. Os dados das avaliações diárias foram usados para o cálculo da Área Abaixo da Curva de Progresso do Crestamento Bacteriano Comum (AACPCBC).

Os dados dos experimentos de campo e casa-de-vegetação foram submetidos à análise de variância individual e, posteriormente, detectando homogeneidade das variâncias residuais, os experimentos de campo foram submetidos à análise de variância conjunta. Havendo significância estatística ($P \geq 0,05$), as médias foram agrupadas usando o teste de agrupamento Scott-Knott (1974) a 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa R (<http://www.r-project.org>) utilizando os pacotes agricolae e ScottKnott.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise de variância individual dos dados agronômicos, houve diferenças significativas para fonte de variação genótipos para todos os caracteres, denotando ampla variação entre os acessos avaliados. As estimativas de acurácia foram de moderada ($\geq 50 < 70$), alta ($\geq 70 < 90$) ou muito alta (≥ 90) magnitude em todos os casos, o que indica boa precisão experimental de acordo com Cargnelutti Filho, Storck e Ribeiro (2009). A utilização da acurácia como medida de precisão experimental tem como vantagem ser independente da média do ensaio, o que lhe confere

adequabilidade como medida da precisão experimental (RESENDE; DUARTE, 2007). Segundo Cargnelutti Filho, Storck e Ribeiro (2009), a estatística de acurácia seletiva é considerada mais adequada do que o coeficiente de variação e a diferença mínima significativa pelo teste de Tukey, em percentagem da média, para avaliação da precisão experimental em ensaios com a cultura do feijão.

Na análise da variância conjunta, observaram-se diferenças significativas pelo teste F para todos os caracteres, considerando as fontes de variação genótipo e ambiente, o que denota a existência de variabilidade entre os genótipos e entre os ambientes testados. O efeito da interação genótipo x ambiente (GA) foi também significativo para todos os caracteres, evidenciando resposta diferenciada dos genótipos diante da variação ambiental.

Os resultados observados para o experimento conduzido entre Abril/Junho - 2014 (Época II) (número de vagens comerciais por planta - NVcP: 9,15; massa de vagem - MV: 9,26 g e produtividade - PROD: 9,25 t ha⁻¹) foram superiores aos obtidos entre Setembro/Dezembro - 2013 (Época I) (NVcP: 7,71; MV: 8,84 g e PROD: 7,46 t ha⁻¹) para os caracteres relacionados à produtividade (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Médias aritméticas de 25 acessos de feijão-de-vagem de hábito determinado para quatro caracteres agronômicos.

Genótipos	Variáveis Agronômicas ^{1/}							
	NVcP		NVncP		MVc		PROD	
	EXP 1	EXP 2	EXP 1	EXP 2	EXP 1	EXP 2	EXP 1	EXP 2
UEL 402	9.72Aa	10.62Aa	52.33Aa	35.00Aa	8.99 Aa	9.25 Ab	9.72 Aa	10.90 Aa
UEL 403	5.80Bb	9.05Aa	34.67Ab	24.67Aa	10.34 Aa	10.49 Aa	6.69 Bb	10.56 Aa
UEL 404	6.35Bb	9.60Aa	29.33Ab	34.00Aa	8.86 Aa	9.88 Aa	6.23 Bb	10.54 Aa
UEL 405	7.30Bb	9.63Aa	39.33Ab	37.00Aa	9.85 Aa	9.11 Ab	7.99 Aa	9.74 Aa
UEL 407	9.57Aa	9.56Aa	41.00Ab	30.33Aa	8.85 Aa	8.93 Ab	9.44 Aa	9.49 Aa
UEL 408	9.02Aa	10.39Aa	35.00Ab	35.00Aa	9.05 Aa	8.50 Ab	9.04 Aa	9.30 Aa
UEL 409	8.00Ba	10.53Aa	34.33Ab	34.00Aa	8.51 Aa	8.18 Ab	7.58 Ab	9.34 Aa
UEL 411	12.02Aa	8.30Ba	35.33Ab	32.00Aa	7.24 Aa	8.33 Ab	9.50 Aa	7.02 Bb
UEL 412	8.50Aa	8.96Aa	38.67Ab	32.00Aa	8.37 Aa	10.17 Aa	7.84 Ba	10.06 Aa
UEL 415	7.10Bb	10.13Aa	32.00Ab	31.33Aa	9.38 Aa	9.80 Aa	7.44 Bb	11.03 Aa
UEL 416	6.08Ab	7.39Aa	54.00Aa	57.33Aa	8.71 Ba	11.02 Aa	5.88 Bb	8.91 Aa
UEL 417	7.90Aa	8.43Aa	43.67Ab	29.00Aa	9.78 Aa	10.99 Aa	8.58 Aa	10.00 Aa
UEL 420	9.55Aa	8.18Aa	34.33Ab	34.33Aa	8.68 Aa	10.12 Aa	9.17 Aa	9.19 Aa
UEL 424	5.61Bb	8.70Aa	39.67Ab	20.33Aa	8.12 Ba	10.98 Aa	5.14 Bb	10.60 Aa
UEL 427	5.11Bb	8.14Aa	37.00Ab	28.67Aa	9.35 Aa	9.96 Aa	5.16 Bb	9.01 Ab
UEL 429	9.92Aa	7.77Aa	19.33Bb	39.67Aa	7.48 Ba	9.86 Aa	8.26 Aa	8.51 Ab
UEL 431	8.27Aa	9.85Aa	62.67Aa	37.33Ba	7.21 Aa	8.78 Ab	6.62 Bb	9.57 Aa
UEL 436	6.20Bb	10.83Aa	65.67Aa	40.00Ba	10.04 Aa	9.21 Ab	7.02 Bb	11.07 Aa
UEL 441	5.00Bb	8.76Aa	41.67Ab	48.67Aa	9.41 Aa	7.83 Ab	5.24 Bb	7.55 Ab
UEL 445	6.98Bb	10.25Aa	44.00Ab	30.00Aa	8.91 Aa	7.47 Ab	6.93 Ab	8.37 Ab
UEL 446	6.44Ab	7.08Aa	41.33Ab	32.67Aa	9.76 Aa	11.15 Aa	6.95 Ab	8.66 Ab
UEL 447	7.23Ab	9.18Aa	67.33Aa	25.00Ba	9.22 Aa	6.31 Bb	7.37 Ab	6.48 Ab
UEL 1	7.88Aa	8.81Aa	60.00Aa	36.33Ba	9.84 Aa	7.77 Bb	8.52 Aa	7.58 Ab
UEL 2	8.23Aa	9.60Aa	57.00Aa	43.67Aa	7.78 Aa	8.29 Ab	6.93 Ab	8.67 Ab
ALESSA	9.10Aa	9.15Aa	52.00Aa	58.33Aa	7.26 Aa	9.03 Ab	7.36 Ab	9.13 Aa

^{1/} NVcP: número de vagens comerciais por planta, NVncP: Número de vagens não comerciais por planta, MVc: massa de vagem (g), e PROD: produtividade (t ha⁻¹). ^{2/} Letras iguais maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste de agrupamento Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Dentre os possíveis fatores relacionados para essa diferenciação dos ambientes, a maior incidência de pragas e doenças no experimento I pode ser considerada como o mais importante.

Para NVcP, verificou-se uma variação de 5,00 a 12,02 para a época I, enquanto para a época II essa variação foi 7,08 a 10,83. Na época II não foram detectadas diferenças entre os acessos. Os melhores acessos para a época I foram UEL 402, UEL 407, UEL 408, UEL 409, UEL 411, UEL 412, UEL 417, UEL 420, UEL 429, UEL 431, UEL 1, UEL 2 e a cultivar Alessa. Moreira et al. (2009) avaliando 14 genótipos de feijão-de-vagem determinado sob manejo convencional verificaram valores entre 2,2 a 7,1, sendo os genótipos HAB 415, HAB 441, HAB 448 e UEL 2 os que obtiveram os maiores valores. Dentre esses genótipos HAB 415, HAB 441 e UEL 2 foram avaliados no presente trabalho, sendo que os acessos HAB 415 e HAB 441 tiveram baixo desempenho para variável NVcP.

Em ensaios comparativos entre sistemas convencionais e orgânicos, as cultivares com bom desempenho em sistemas convencionais nem sempre apresentam bom desempenho em sistemas orgânicos (KIRK et al., 2012; LUBY et al., 2013). Segundo Mason e Spaner (2006) o aumento do estresse das plantas em sistemas de manejo orgânico pode afetar o desempenho das cultivares o suficiente para justificar o melhoramento específico para este ambiente.

Para o número de vagens não comerciais (NVncP), também não foram detectadas diferenças significativas entre os acessos para a época II. Em relação à época I, os acessos com os maiores valores foram UEL 402, UEL 416, UEL 431, UEL 436, UEL 447, UEL 1, UEL 2 e 'Alessa' com 52,33, 54,00, 62,67, 65,67, 67,33, 60,00, 57,00 e 52,00, respectivamente. Essas diferenças encontradas entre os acessos podem estar relacionadas com uma maior incidência de antracnose, principalmente na época I.

Em relação ao MVc, os valores variaram de 7,21 a 10,34 g para a época I e de 6,31 a 11,15 g para a época II, não sendo encontradas diferenças significativas entre os acessos. No experimento II, os maiores valores foram encontrados nos acessos UEL 403, UEL 404, UEL 412, UEL 415, UEL 416, UEL 417, UEL 420, UEL 424, UEL 427, UEL 429 e UEL 446.

Para Prod, os valores variaram de 5,14 a 9,72 t ha⁻¹ para a época I, enquanto na época II a variação foi de 7,02 a 11,07 t ha⁻¹. No grupo de maior produtividade, dez e 15 genótipos foram agrupados nas épocas I e II,

respectivamente, sendo os acessos UEL 402, UEL 405, UEL 407, UEL 408, UEL 412, UEL 417 e UEL 420 aqueles que obtiveram os maiores valores em ambas as épocas. Os valores encontrados, no presente trabalho, foram superiores aos encontrados por Moreira et al. (2009). Pinto et al. (2001) avaliando a melhor idade de colheita do feijão-de-vagem cv. Novirex sob manejo convencional, obtiveram os maiores rendimentos de vagens comerciais entre 8,6 a 10,1 t.ha⁻¹.

Programas de melhoramento de feijão-de-vagem determinado direcionados para agricultura orgânica são inexistentes e, nesse contexto, os genótipos UEL 402, UEL 405, UEL 407, UEL 408, UEL 412, UEL 417 e UEL 420 podem ser considerados promissores para indicação aos produtores orgânicos da região para uso direto como cultivares e, também, serem utilizados em programas de melhoramento como germoplasma melhorado.

Na análise de variância da área abaixo da curva de progresso do crestamento bacteriano comum (AACPCBC), verificou-se efeito significativo para fonte de variação genótipos quando inoculados com os dois isolados de *Xanthomonas*, indicando a existência de uma ampla variabilidade entre os genótipos (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Área abaixo da curva do progresso do crestamento bacteriano (AACPCBC) em 25 acessos de feijão-de-vagem inoculados com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) e *X. fuscans* subsp. *fuscans* (Xff).

Acessos	AACPCBC	
	Xap	Xff
UEL 402	98,50 A	101,83 A
UEL 403	86,25 A	104,67 A
UEL 404	74,07 B	100,29 A
UEL 405	93,19 A	100,81 A
UEL 407	64,79 B	87,29 B
UEL 408	75,50 B	100,63 A
UEL 409	68,00 B	90,50 B
UEL 411	74,83 B	97,00 B
UEL 412	70,31 B	95,83 B
UEL 415	99,00 A	85,17 B
UEL 416	89,79 A	103,93 A
UEL 417	79,83 B	104,67 A
UEL 420	81,55 A	102,11 A
UEL 424	79,55 B	94,20 B
UEL 427	87,94 A	103,78 A
UEL 429	88,56 A	106,89 A
UEL 431	74,19 B	96,75 B
UEL 436	99,35 A	112,05 A
UEL 441	90,86 A	105,14 A
UEL 445	83,00 A	105,70 A
UEL 446	84,50 A	102,25 A
UEL 447	73,67 B	103,33 A
UEL 1	84,00 A	98,67 B
UEL 2	74,20 B	117,20 A
ALESSA	104,25 A	114,67 A

^{1/}Letras iguais na vertical não diferem entre si pelo teste de agrupamento Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Os valores médios de AACPCBC foram de 82,09 e 101,17 para *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) e *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* (Xff), respectivamente, indicando uma maior patogenicidade de Xff. Esses resultados são condizentes aos observados por Mutlu et al. (2008), que verificaram maior virulência da Xff em comparação com Xap na cultura do feijoeiro.

Após 30 dias de avaliação, todos os acessos foram moderadamente suscetíveis aos dois isolados. Entretanto, os acessos UEL 404, UEL 407, UEL 408,

UEL 409, UEL 411, UEL 412, UEL 417, UEL 424, UEL 431, UEL 437 e UEL 2 obtiveram os menores valores de AACPCBC para Xap, enquanto para Xff, os acessos moderadamente suscetíveis foram UEL 407, UEL 409, UEL 411, UEL 412, UEL 415, UEL 424, UEL 431 e UEL 1.

A resistência ao crestamento bacteriano em *P. vulgaris* L. constitui um caráter de herança oligo ou poligênica, de natureza complexa e sob forte efeito ambiental (FERREIRA et al., 2003). São conhecidos mais de 20 QTLs relacionados à resistência ao crestamento bacteriano, com efeitos genéticos variáveis e distribuídos por todos os 11 cromossomos do feijoeiro (KELLY et al., 2003; SANTOS et al., 2003). Trindade et al. (2012) avaliando 14 acessos de feijão-de-vagem quanto à resistência a dois isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* verificaram que apenas o acesso UENF 1482 apresentou bom desempenho, uma vez que não diferiu significativamente das cultivares de feijão resistentes PI 207262 e BAC 6. Os genes de resistência presentes em genótipos de feijão comum tornam-se uma fonte importante para estratégias de melhoramento para resistência do feijão-de-vagem ao CBC através de cruzamentos com parentais selecionados. Entre os acessos que apresentaram os menores valores de AACPCBC, apenas UEL 407 e UEL 412 apresentaram valores elevados de produtividade. Contudo, há necessidade de introgressão de genes de fontes de resistência ao crestamento, como por exemplo, PI 207262 e BAC 6.

REFERÊNCIAS

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. P. G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (eds). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Editora Ceres. p. 333-349, 2005.

CARGNELUTTI FILHO, A.; STORCK, L.; RIBEIRO, N. D. Medidas da precisão experimental em ensaios com genótipos de feijão e de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1225-1231, 2009.

EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health). Scientific opinion on the pest categorisation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. **EFSA Journal**, v. 12, p. 3856, 2014.

FAO - Food and Agriculture Organization. Statistical databases – Agriculture. Home: FAO. Available from: <<http://apps.fao.org>>. Acessado 20 junho. 2015.

FERREIRA, C. F.; PEREIRA, M. G.; SANTOS, A. S.; RODRIGUES, R.; BRESSAN-SMITH, R. E.; VIANA, A. P.; DAHER, R. F. Resistance to common bacterial blight in *Phaseolus vulgaris* L. recombinant inbred lines under natural infection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Euphytica**, v. 134, p. 43-46, 2003.

KELLY, J. D.; GEPTS, P.; MIKLAS, P. N.; COYNE, D. P. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. **Field Crops Research**, v. 82, p. 135-154, 2003.

KIRK, A. P.; FOX, S. L.; ENTZ, M. H. Comparison of organic and conventional selection environments for spring wheat. **Plant Breeding**, v. 131, p. 687-694, 2012.

LUBY, C. H.; LYON, A. H.; SHELTON, A. C. A new generation of plant breeders discovers fertile ground in organic agriculture. **Sustainability**, v. 5, p. 2722-2726, 2013.

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2015. Cadastro nacional de produtores orgânicos. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/desenvolvimentosustentavel/organicos/cadastro-nacional/> Acessado em 09 de maio de 2015.

MASON, H. E.; SPANER, D. Competitive ability of wheat in conventional and organic management systems: a review of the literature. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, p. 333-343, 2006.

MIKLAS, P. N.; COYNE, D. P.; GRAFTON, K. F.; MUTLU, N.; REISER, J.; LINDGREN, D. T.; SINGH, S. P. A Major QTL for common bacterial blight resistance derives from the common bean great northern landrace cultivar Montana nº 5. **Euphytica**, v. 131, p. 137-146, 2003.

MOREIRA, R. M. P.; FERREIRA, J. M.; TAKAHASHI, L. A.; VASCONCELOS, M. E. C.; GEUS, L. C.; BOTTI, L. Potencial agrônômico e divergência genética entre genótipos de feijão-vagem de crescimento determinado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, p. 1051-1060, 2009.

MUTLU, N.; VIDAVER, A. K.; COYNE, D. P.; STEADMAN, J. R. Differential pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. fuscans* subsp. *fuscans* strains on bean genotypes with common blight resistance. **Plant Disease**, v. 92, p. 546-554, 2008.

PASTOR-CORRALES, M. A.; BEEBE, S. E.; CORREA, F. J. Comparing two inoculation techniques for evaluating resistance in beans to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* In: **International Conference on Plant Pathogenic Bacteria**. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, p. 493-503, 1981.

PINTO, C. M. F.; VIEIRA, R. F.; VIEIRA, C.; CALDAS, M. T. Insumos e cultivares em teste: idade de colheita do feijão-de-vagem anão cultivar novirex. **Horticultura Brasileira**, v. 19, p. 163-167, 2001.

RAVA, C. A.; SARTORATO, A. Crestamento bacteriano comum. In: SARTORATO A; RAVA CA (eds.) **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA-SPI, p. 217-242, 1994.

RESENDE, M. D. V.; DUARTE, J. B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, p. 182-194, 2007.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA, J. R.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**, v. 12, p. 16, 1986.

SANTOS, A. S. S.; BRESSAN-SMITH, R. E.; PEREIRA, M. G.; RODRIGUES, R.; FERREIRA, C. F. Genetic linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. and identification of QTLs responsible for resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 5-10, 2003.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, p. 507-512, 1974.

SILVA, F. C.; SOUZA, R. M.; ZACARONI, A. B.; LELIS, F. M. V.; FIGUEIRA, A. R. Otimização da técnica de PCR para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão. **Summa Phytopathologica**, v. 39, p. 45-50, 2013.

TRINDADE, R. S.; RODRIGUES, R.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; GONÇALVES, L. S. A.; DAHER, R. F.; SUDRÉ, C. P. Critical disease components of common bacterial blight to effectively evaluate resistant genotypes of snap bean. **Journal of General Plant Pathology**, v. 78, p. 201-206, 2012.

TRINDADE, R. S.; RODRIGUES, R.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; GONÇALVES, L. S. A.; VIANA, J. M. S.; SUDRÉ, C. P. Combining ability for common bacterial blight resistance in snap and dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 37, p. 37-43, 2015.

VIDAL, V. L.; JUNQUEIRA, A. M. R.; PEIXOTO, N.; MORAES, E. A. Desempenho de feijão-vagem arbustivo, sob cultivo orgânico em duas épocas. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 10-14, 2007.

WILLER, H.; KILCHER, L. **The world of organic agriculture: statistics and emerging trends 2012**. FiBL, IFOAM, 2012.

5 ARTIGO C - AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DE BIOATIVOS FENÓLICOS EM FEIJÃO-DE-VAGEM PARA A GESTÃO DA *DIABETES MELLITUS* TIPO 2 EM FASE INICIAL

RESUMO: O feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) contém compostos fenólicos que agem como antioxidantes no organismo humano. Os antioxidantes contribuem para uma vida mais saudável, reduzindo o risco de doenças crônicas como o *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM tipo 2). Desse modo, o objetivo desta pesquisa foi determinar por meio de ensaios “*in vitro*” os compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos aquosos de diferentes genótipos de feijão-de-vagem e estudar o papel dos bioativos destes extratos no metabolismo da glicose ligada ao DM tipo 2. Foram analisados os compostos fenólicos totais; atividade antioxidante, pelo método ABTS⁺; e as atividades inibidoras, *in vitro*, das enzimas alfa-amilase e alfa-glicosidase. O extrato aquoso do genótipo Tendergreen obteve o maior teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante. Em relação a percentagem de inibição da enzima alfa-amilase o extrato aquoso do genótipo OR 5630 foi o melhor inibidor. Com base na percentagem de inibição da enzima alfa-glicosidase os extratos aquosos dos genótipos Eagle e Ebro apresentaram as maiores porcentagens de inibição na dose de 50 µL. Na dose de 25 µL ‘Eagle’ foi o melhor inibidor. Sendo assim, por meio de nossos resultados concluímos que o consumo de feijão-de-vagem pode contribuir para uma dieta saudável, favorecendo na gestão do DM tipo 2.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L.. Compostos fenólicos. Atividade antioxidante. Alfa-amilase. Alfa-glicosidase.

ABSTRACT: Green bean (*Phaseolus vulgaris* L.) contains phenolic compounds which act as antioxidants in the human body. Antioxidants contribute to a healthier life, reducing the risk of chronic diseases such as type 2 *Diabetes mellitus* (type 2 DM). Thus, the purpose of this work was to determine by tests “*in vitro*” the total phenolic compounds and antioxidant activity of aqueous extracts of different genotypes of green bean and study the role of bioactive these extracts in the metabolism of linked glucose to type 2 DM. Total phenolics compounds were analyzed; antioxidant activity (ABTS⁺); and inhibitory activities *in vitro* alpha-amylase and alpha-glucosidase. The aqueous extract of Tendergreen genotype had higher level of total phenolic compounds and antioxidant capacity. Regarding the percentage of inhibition of the enzyme alpha-amylase aqueous extract of genotype OR 5630 was the best inhibitor. Based on the percentage of inhibition of alpha-glucosidase enzyme the aqueous extracts of genotypes Eagle and Ebro had the highest percentages of inhibition at dose of 50 uL. At dose of 25 µL ‘Eagle’ was the best inhibitor. Thus, the results showed that the consumption of green bean can contribute to a healthy diet, favoring the control of type 2 DM.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L.. Phenolic compounds. Antioxidant activity. Alpha-amylase. Alpha-glucosidase.

5.1 INTRODUÇÃO

Em 2014, 9% dos adultos com 18 anos de idade ou mais apresentaram diabetes, sendo que esta doença foi responsável pela morte de 1.5 milhões de pessoas, em 2012, e 80% dos casos ocorreram em países em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2015). A falta de insulina e/ou sua incapacidade de exercer seus efeitos de forma adequada favorece o desenvolvimento do *Diabetes Mellitus*, que se caracteriza por hiperglicemia crônica com distúrbios do metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION - ADA, 2012). No DM tipo 2 a auto-oxidação da glicose favorece a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROS) por meio da hiperglicemia aguda e crônica. As EROS são geradas pelos danos oxidativos em biomoléculas e processo antiinflamatório (ZIMMERMANN; KIRSTEN, 2008).

As complicações do diabetes podem ser favorecidas pelo estresse oxidativo que, além de induzir a inflamação sistêmica, afeta a secreção de insulina pelas células betas, e exerce influência direta sobre a captação de glicose em tecidos periféricos, no entanto, a diabetes tipo 2 contribui para um desequilíbrio no sistema de defesa antioxidante (ZATALIA; SANUSI, 2013; GARCIA-BAILO et al., 2011).

Os antioxidantes são compostos que inativam os radicais livres e suas ações (DEVASAGAYAM et al., 2004), contribuindo contra os danos provocados pelo estresse oxidativo. Estão presentes em legumes, frutas, vegetais, e podem contribuir para prevenção de doenças crônicas, como o DM tipo 2 (CARTER et al., 2010).

O feijão-de-vagem apresenta teores significativos de vitaminas, sais minerais, carotenóides, flavonóides e compostos fenólicos, o que favorece a atividade antioxidante (VAN DUYN et al., 2000; BLAIR et al., 2010; ABU-REIDAH et al., 2013). Além disso, alimentos com baixo índice glicêmico e que retardam a absorção de carboidratos por meio da inibição de sua digestão, como as enzimas alfa-amilase e alfa glucosidade, ambas presentes no feijão-de-vagem, podem ajudar no controle dos níveis de açúcar no sangue. As vagens deste alimento são colhidas no estágio verde maduro para consumo *in natura* e/ou processado em formas de conservas (PROHENS; NUEZ, 2008).

Desse modo, o objetivo deste trabalho foi determinar por meio de

ensaios *in vitro* os compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos aquosos de diferentes genótipos de feijão-de-vagem e estudar o papel dos bioativos destes extratos no metabolismo da glicose ligada ao DM tipo 2.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Materiais

As vagens imaturas de cinco diferentes genótipos feijão-de-vagem (Bogota, Eagle, Ebro, OR 5630 e Tendergreen) foram utilizadas. Esses genótipos foram fornecidos pela Univerisidade de Oregon - EUA, em 2014. Todas as vagens foram lavadas com água destilada e, em seguida, selecionadas aleatoriamente para a extração. Utilizou-se enzima alfa-amilase, enzima alfa-glicosidase e ABTS⁺, todos adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO).

Extração das amostras

As vagens foram cortadas e pesadas. Cada genótipo foi extraído separadamente usando água destilada na proporção de 20 g da amostra (vagem) por 50 mL de água destilada. Todas as amostras foram homogeneizadas, utilizando liquidificador, durante 10 min. Em seguida, foram centrifugadas em 15.000 RPM por dois períodos de 20 min cada. O sobrenadante foi coletado e armazenado a 20 °C durante o período do estudo.

Fenólicos Totais

Os fenólicos totais foram determinados de acordo com Shetty et al. (1995), com algumas modificações. Desse modo, 0,5 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio e misturado com 0,5 mL de água destilada, 1 mL de etanol a 95% e 5 mL de água destilada. Para cada amostra 0,5 mL de 50% (v / v) de reagente Folin-Ciocalteu foi adicionado e misturado. Após 5 min, 1 mL de 5% de Na₂CO₃ foi adicionado à mistura da reação, deixando a solução em repouso, no escuro, durante 60 min. A absorvância foi lida a 725 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em compostos fenólicos totais e foram expressos em

microgramas por grama de peso fresco (PF). Para a quantificação foi construída uma curva padrão, que foi estabelecida utilizando várias concentrações de ácido gálico em água.

Atividade antioxidante pelo método ABTS⁺ [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)]

A atividade antioxidante total das vagens dos genótipos estudados foi medida pelo método ABTS⁺ (PELLEGRINI et al., 1999). ABTS (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) foi dissolvido em água para uma concentração de 7 mM. Em seguida, ABTS⁺ foi preparado utilizando 5 mL de 7 mM da solução estoque de ABTS com 88 µL de 140 mM de persulfato de potássio. A mistura foi deixada em repouso no escuro à temperatura ambiente por 12-16 h antes de ser utilizada. Antes do início do ensaio a solução foi diluída com etanol (95%) na proporção 1:88 para se obter uma absorvância a 734 nm de $0,70 \pm 0,02$, e foi equilibrada a 30 °C. Um mililitro da solução ABTS foi adicionado a tubos de ensaio de vidro contendo 50 µL de cada extrato de tecido das vagens, e misturados por vortex durante 30 s. Após 2,5 minutos de incubação, as misturas foram lidas a 734 nm. As leituras foram comparadas com os controles, os quais continham 50 mL de etanol a 95% em vez do extrato aquoso das vagens. O padrão de referência Trolox para as atividades antioxidantes foi preparado com 5 mM de solução de estoque de Trolox em etanol para introdução no sistema de ensaio em concentrações dentro do intervalo do ensaio (concentração final de 0-20 µM) para o preparo de uma curva padrão em que todos os dados foram referenciados. A percentagem de inibição foi calculada por:

$$\% \text{ inibição} = \left(\left[\frac{A_{734}^{\text{Controle}} - A_{734}^{\text{Extrato}}}{A_{734}^{\text{Controle}}} \right] \right) \times 100$$

Inibição Alfa-Amilase

A enzima alfa-amilase foi adquirida da Sigma Chemical Co. O volume de 500 µL de sobrenadante e 500 µL de tampão de fosfato de sódio 0,02 M (pH 6,9 com cloreto de sódio 0,006 M) contendo solução de alfa-amilase (0,5 mg / mL) foram incubados a 25°C durante 10 min. Após a pré-incubação, 500 µL de uma solução de amido a 1% em tampão de fosfato de sódio 0,02 M (pH 6,9 com cloreto

de sódio 0,006 M) foi adicionado a cada tubo a intervalos cronometrados. As misturas das reações foram incubadas a 25°C durante 10 min. A reação foi interrompida com 1,0 mL de 3,5 ácido dinitro-salicílico. Em seguida, os tubos de ensaio foram incubados em banho com água em ebulição durante 10 min e arrefecidos até à temperatura ambiente. A mistura de reação foi então diluída após a adição de 10 mL de água destilada e a absorvância foi medida a 540 nm.

$$\% \text{ inibição} = \left(\left[\frac{A_{540}^{\text{Controle}} - A_{540}^{\text{Extrato}}}{[A_{540}^{\text{Controle}}]} \right] \right) \times 100$$

Inibição Alfa-Glicosidase

O ensaio de Alfa-glicosidase foi realizado usando 50 µL do sobrenadante e 100 µL de tampão de fosfato 0,1 M (pH 6,9) contendo solução de alfa-glicosidase (1,0 U / mL) e incubadas em placas de 96 poços a 25 ° C durante 10 min. Após a pré-incubação, 50 µl de solução de p-nitrofenil-α-D-glucopiranosídeo 5 mM em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,9) foi adicionada a cada poço a intervalos de tempo. As misturas das reações foram incubadas a 25 ° C durante 5 min. Antes e após a incubação, as leituras de absorvância foram registados a 405 nm pelo leitor de micro-placa, (Thermomax, Molecular device Co., Virginia, USA) e comparadas com um controle, que tinha 50 µL de solução tampão ao invés do extrato aquoso das vagens. A atividade inibidora de alfa-glicosidase foi expressa como % de inibição e calculada como se segue:

$$\% \text{ inibição} = \left(\left[\frac{\Delta A_{405}^{\text{Controle}} - \Delta A_{405}^{\text{Extrato}}}{[\Delta A_{405}^{\text{Controle}}]} \right] \right) \times 100$$

Análise Estatística

Os experimentos foram repetidos quatro vezes. As análises de cada experimento foram conduzidas em triplicata. As médias e desvio padrão foram calculados a partir das replicatas dos experimentos e as análises foram realizadas utilizando Microsoft Excel XP. Os dados foram submetidos à análise de variância e detectando diferenças significativas entre os tratamentos, os mesmos foram

analisados pelo teste de média Tukey ($P < 0.05$). Os dados foram analisados pelo programa R (www.r-project.org).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fenólicos Totais e Atividade Antioxidante

Pela análise de variância houve diferenças para fonte de variação genótipos para as variáveis compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, denotando variação entre os genótipos estudados.

Os compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos aquosos variaram de 197,96 a 330,49 ($\mu\text{g}/\text{GAE} \cdot \text{g}^{-1}$ peso fresco (PF)) (Figura 5.1), e 32,62 a 79,31% de inibição ABTS^+ (Figura 5.2), respectivamente. O genótipo Tendergreen obteve os maiores resultados para essas duas variáveis.

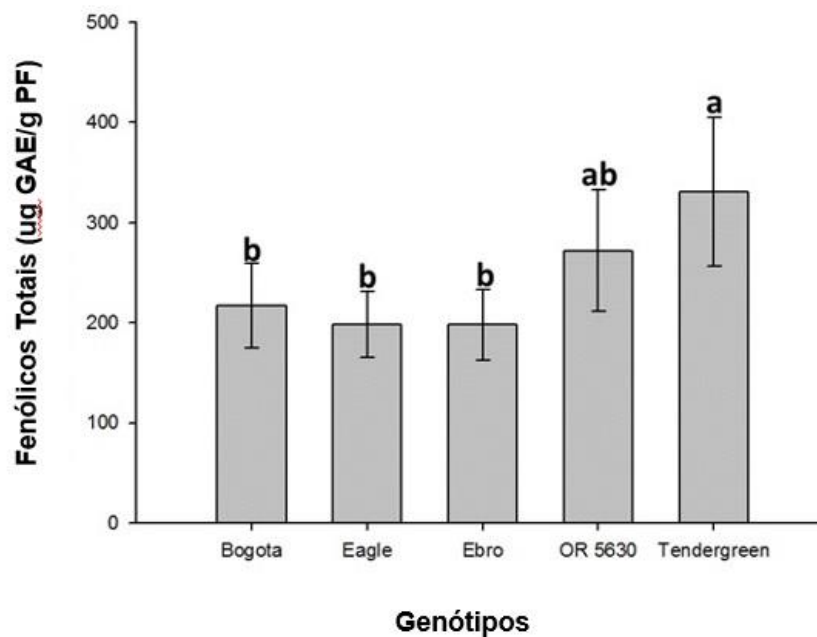


Figura 5.1. Fenólicos totais (μg ácido gálico equivalente (GAE) / g peso fresco (FW)) dos extratos aquosos dos diferentes genótipos de feijão-de-vagem.

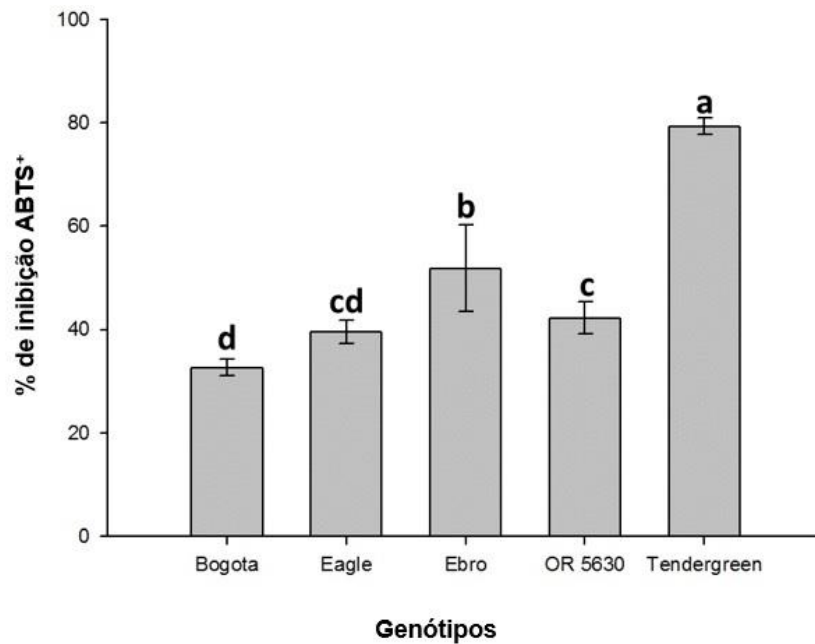


Figura 5.2. Percentagem (%) da atividade antioxidante, pelo método ABTS⁺, dos extratos aquosos dos diferentes genótipos de feijão-de-vagem.

De acordo com Kim, Jeong e Lee (2003), o teor dos compostos fenólicos pode variar de acordo com a maturação da espécie, genética, manejo cultural, local de cultivo e armazenamento. Marinova, Ribarova e Atanassova (2005) e Baardseth et al. (2010) obtiveram, em feijão-de-vagem, teores de compostos fenólicos totais de 35,5 mg ácido gálico equivalente (GAE).100 g⁻¹ PF e 221 mg GAE. kg⁻¹ PF, respectivamente.

Silva et al. (2009) trabalhando com grãos cru e cozidos de diferentes cultivares de feijão verificaram diferenças estatísticas nos teores de compostos fenólicos, sendo que estes valores variaram de 0,01 a 4,51mg de catequina/g de amostra. Mesquita et al. (2007) obtiveram valores para compostos fenólicos em feijão comum que variaram de 0,28 a 1,08 g de ácido tânico/100 g MS (matéria seca). No entanto, é importante ressaltar que nos experimentos realizados pelos autores citados anteriormente foram utilizados como padrão a catequina e o ácido tânico, diferentemente do padrão utilizado nesta pesquisa, que foi o ácido gálico.

Alimentos com altos teores de compostos fenólicos podem contribuir para o gerenciamento do DM tipo 2, uma vez que estes alimentos podem reduzir significativamente os níveis de glicose, triglicerídeos, LDL-C, além de aumentar a sensibilidade da insulina em pacientes portadores da doença (AL-AMIN et al., 2006; MAHLUJI et al., 2013). Venkateswaran, Pari e Saravanan (2002) administrando extrato aquoso de vagens secas (200 mg / kg de peso corporal) de *P. vulgaris* L., via

oral, durante 45 dias em ratos diabéticos observaram ação antioxidante e antihiperlipidêmica do extrato, sendo que tal substância reduziu significativamente o aumento da glicemia, triglicerídeos, ácidos graxos livres, fosfolípidios e colesterol total.

Em relação à atividade antioxidante, os resultados dos extratos aquosos obtidos neste trabalho foram superiores aos de Silva et al. (2009) que ao avaliarem a atividade antioxidante de três cultivares de feijão obtiveram resultados que variaram de $1,13 \pm 0,93$ a $7,02 \pm 0,78$ % de inibição ABTS⁺. De acordo com esses mesmos autores os maiores teores de compostos fenólicos em *Phaseolus vulgaris* L. proporcionaram maiores capacidades antioxidantes, corroborando com os resultados obtidos nesta pesquisa em que o genótipo Tendergreen apresentou maiores teores de compostos fenólicos e percentagem de inibição ABTS⁺.

Yao et al. (2013) avaliando atividade antioxidante, pelo método ABTS⁺, de seis diferentes genótipos de feijão mungo (*Vigna radiata* L.) obtiveram valores que variaram de 8,76 µM TE (Trolox equivalente) /g a 21,19 µM TE/g. Khan et al. (2012) também utilizando o método ABTS⁺ para avaliação antioxidante, em plantas de *Sonchus asper* L., apresentaram resultados que variaram de $53,4 \pm 4,21$ µg/ml a $90,21 \pm 2,8$ µg/ml.

O aumento de radicais livres em nosso organismo, deficiência da proteção antioxidante e estresse oxidativo contribuem significativamente no desenvolvimento e progressão do DM tipo 2, uma vez que tais radicais são formados de forma desproporcional através da oxidação da glicose, glicação de proteínas não enzimáticas e subsequente degradação oxidativa de proteínas glicosiladas (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1990; BAYNES, 1991; MCLENNAN et al., 1991; YOUNG et al., 1995; BAYNES; THORPE, 1999; CERIELLO, 2000; MARITIM; SANDERS; WATKINS, 2003). No entanto, plantas que apresentam atividade antioxidante, como o *Phaseolus vulgaris* L., por exemplo, podem ser utilizadas no tratamento do DM tipo 2 (DALLAQUA; DAMASCENO, 2011).

Inibição de Alfa-Amilase e Alfa-Glicosidase

A percentagem de inibição da enzima alfa-amilase dos extratos aquosos dos genótipos de feijão-de-vagem estudados foi mensurada sem diluição.

Pela análise de variância houve diferenças para fonte de variação genótipos para as variáveis % de inibição das enzimas alfa-amilase e alfa-glicosidase, denotando variação entre os genótipos estudados. Os resultados referentes a percentagem de inibição da enzima alfa-amilase dos extratos aquosos variaram de 43.92 a 83.57, sendo o genótipo OR 5630 o melhor inibidor (Figura 5.3).

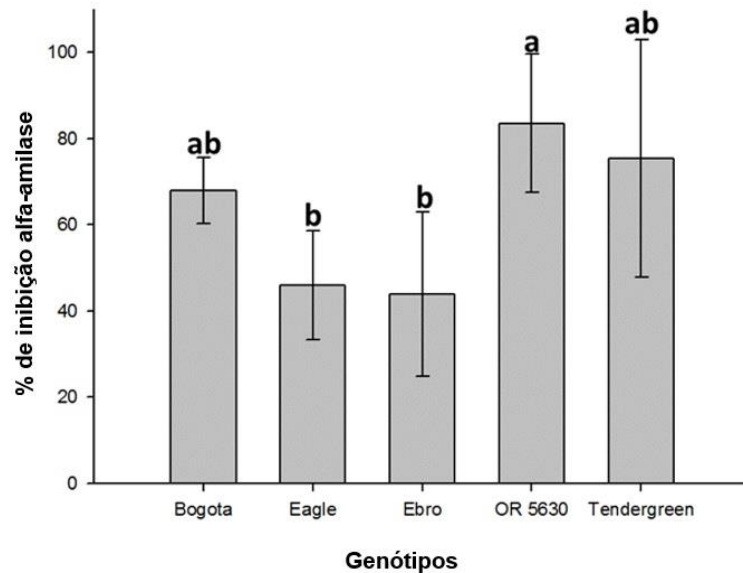


Figura 5.3. Percentagem (%) de inibição da enzima alfa-amilase dos extratos aquosos dos genótipos de feijão-de-vagem.

A percentagem de inibição da enzima alfa-glicosidase foi mensurada com doses dependentes. Os resultados variaram de 24,87 a 50,52; 14,11 a 33,51; 8,33 a 21,57 nas doses de 50 μ L; 25 μ L; 10 μ L, respectivamente. Os extratos aquosos dos genótipos Eagle e Ebro apresentaram as maiores % de inibição na dose de 50 μ L. Na dose de 25 μ L 'Eagle' apresentou maior % de inibição. Os resultados não diferiram estatisticamente entre si na dose de 10 μ L (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Atividade de inibição da enzima (%) Alfa-glicosidase, com dose-dependente (10, 25 e 50 µL de extrato aquoso) dos diferentes extratos aquosos dos genótipos de feijão-de-vagem.

Porcentagem de inibição da enzima Alfa-glicosidase			
Genótipos	Porcentagem de inibição da enzima Alfa-glicosidase		
	50 µL	25 µL	10 µL
Bogota	24.87Ab	14.11ABb	8.33Ba
Eagle	47.92Aa	33.51Ba	21.57Ba
Ebro	50.52Aa	27.88Bab	21.52Ba
OR 5630	38.49Aab	27.48ABab	14.56Ba
Tendergreen	34.47Aab	20.44ABab	13.51Ba

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na HORIZONTAL não diferem estatisticamente entre si. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem estatisticamente entre si.

As enzimas alfa-amilase e alfa-glicosidase foram mensuradas a fim de observar a influência dos genótipos estudados no metabolismo da glicose. Estas enzimas são as mais importantes no processo de digestão dos carboidratos, onde a alfa-amilase apresenta fundamental importância em catalisar a hidrólise da ligação glicosídica α -1,4 do amido, glicogênio e vários oligossacarídeos para posteriormente sofrerem a ação das glicosidases, o que resultará na liberação de açúcares simples que serão absorvidos nas membranas dos enterócitos (ALI; HOUGHTON; SOUMYANATH, 2006; PEREIRA et al., 2010). No entanto, a inibição destas enzimas no trato digestivo humano pode contribuir para o controle do diabetes, pois diminui a absorção de glicose (NEGRI, 2005).

Funke e Melzig (2006) trabalhando com diferentes espécies de plantas obtiveram valores entre 45-75 % de inibição da enzima alfa-amilase para o *Phaseolus vulgaris* L. Oliveira e Pereira (2015) estudando a inibição da enzima alfa-amilase, sob diferentes extrações, em extratos aquosos de *Myrcia sphaerocarpa* DC, planta conhecida como a insulina vegetal e recomendada para o tratamento do diabetes (ROSA; BARCELOS; BAMPI, 2012), observaram valores que variaram de 0 a $93,07 \pm 3,47$ % de inibição. De acordo com Souza (2011) uma inibição da enzima alfa-amilase maior do que 50% e 80% pode ser considerada boa e alta, respectivamente. Sendo assim, o genótipo OR 5630, estudado nesta pesquisa, apresentou alta porcentagem de inibição desta enzima.

Pereira et al. (2010) avaliaram o potencial de inibição do chá verde e

chá preto obtiveram valores de % de inibição de 42,19; 37,00; 17,00 para as enzimas alfa-amilase, alfa glicosidase e beta-glicosidase, respectivamente, quando trabalharam com chá verde e não simularam digestão. Porém, quando a digestão foi simulada não houve inibição das enzimas. Em relação ao chá preto os valores de % de inibição sem a simulação de digestão foram de 73,44; 48,00; 37,00 para as enzimas alfa-amilase, alfa glicosidase e beta glicosidase, respectivamente. Por outro lado, com a simulação da digestão os resultados de % de inibição foram de 0; 48,00; 37,00 para as enzimas alfa-amilase, alfa-glicosidase e beta-glicosidase, respectivamente.

A hiperglicemia pós-prandial exerce importância fundamental no desenvolvimento do DM tipo 2 (BARON, 1998). Portanto, o seu controle é de extrema importância no tratamento desta enfermidade, além de reduzir complicações crônicas relacionadas a essa doença (ALI; HOUGHTON; SOUMYANATH, 2006; SUBRAMANIAN; ASMAWI; SADIKUN, 2008). A inibição da absorção da glicose no intestino de pacientes diabéticos pode controlar o nível de glicose no sangue no estado pós-prandial. Sendo assim, substâncias que inibem a amilase e glicosidase têm sido estudadas, e algumas destas têm sido desenvolvidas como fármacos para o tratamento do DM (KOBAYASHI et al., 2000).

Os pacientes com DM podem ser beneficiados com os inibidores de alfa-glicosidase, pois estes podem reduzir os níveis glicêmicos e de glicose pós-prandial (HAROLD; LEBOVITZ, 1997). Porém, tais inibidores podem provocar efeitos colaterais, sendo que alguns deles podem aumentar a incidência de tumores renais, provocar lesões hepáticas e hepatite aguda (CARRASCOSA; PASCUAL; AREST, 1997; DIAZ-GUTIERREZ; LADERO; DIAZ-RUBIO, 1998; CHAPENTIER; RIVELINE; VARROUD-VIAL, 2000). Sendo assim, há uma grande necessidade de inibidores da enzima alfa-glicosidase que sejam oriundos de fontes naturais.

REFERÊNCIAS

ABU-REIDAH, I. M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Phytochemical characterization of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by using high-performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 24, p. 105-116, 2013.

ALI, H.; HOUGHTON, P. J.; SOUMYANATH, A. Alpha-amylase inhibitory activity of

some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 449-455, 2006.

AL-AMIN, Z. M.; THOMSON, M.; AL-QATTAN, K. K.; PELTONEN-SHALABY, R.; ALI, M. Anti-diabetic and hypolipidaemic properties of ginger (*Zingiber officinale*) in streptozotocin-induced diabetic rats. **British Journal of Nutrition**, v. 96, p. 660-666, 2006.

American Diabetes Association - ADA. Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, v. 35, p. 11-61, 2012.

BAARDSETH, P.; BJERKE, F.; MARTISEN, B. K.; SKREDE, G. Vitamin C, total phenolic compounds and antioxidative activity in tip-cut green beans (*Phaseolus vulgaris*) and sweede rods (*Brassica napus* var. *napobrassica*) processed by methods used in catering. **Journal of the Science and Food Agricultural**, v.90, p.1245-1255, 2010.

BARON, A. D., 1998. Postprandial hyperglycaemia and a-glucosidase inhibitors. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 40, p. 551–555, 1998.

BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v. 40, p. 405-412, 1991.

BAYNES, J. W.; THORPE, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm. **Diabetes**, v. 48, p. 1–9, 1999.

BLAIR, M. W.; CHAVES, A.; TOFIÑO, A.; CLADERÓN, J. F.; PALACIO, J. D. Extensive diversity and inter-genepool introgression in a world-wide collection of indeterminate snap bean accessions. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 120, p. 1381-1391, 2010.

CARRASCOSA, M., PASCUAL, F., ARESTI, S. Acarbose—induced acute severe hepatotoxicity. **The Lancet** 349, p. 698–699, 1997.

CARTER, P.; GRAY, L. J.; TROUGHTON, J.; KHUNTI, K.; DAVIES, M. J. (2010). Fruit and vegetable intake and incidence of type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. **British Medical Journal**, v. 341, p. 1-8, 2010.

CERIELLO, A. Oxidative stress and glycemic regulation. **Metabolism**, v. 49, p. 27–29, 2000.

CHAPENTIER, G.; RIVELINE, J. P.; VARROUD-VIAL, M. Management of drugs affecting blood glucose in diabetic patients with renal failure. **Diabetes and Metabolism**, v. 26, p. 73–85, 2000.

DALLAQUA, B.; DAMASCENO, D. C. Comprovação do efeito antioxidante de plantas medicinais utilizadas no tratamento do *Diabetes mellitus* em animais: artigo de atualização. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 367-373, 2011.

DEVASAGAYAM, T. P.; TILAK, J. C.; BOLOOR, K. K.; SANE, K. S.; GHASKADBI, S. S.; LELE, R. D. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 52, p. 794–804, 2004.

DIAZ-GUTIERREZ, F. C.; LADERO, J. M.; DIAZ-RUBIO, M. Acarbose induced acute hepatitis. **American Journal of Gastroenterology**, v. 93, p. 481, 1998.

FUNKE, I.; MELZIG, M. F. Traditionally used plants in diabetes therapy – phytotherapeutics as inhibitors of α -amylase activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 1-5, 2006.

GARCIA-BAILO, B.; EL-SOHEMY, A.; HADDAD, P. S.; ARORA, P.; BENZAIED, F.; KARMALI, M.; BADAWI, A. Vitamins D, C, and E in the prevention of type 2 diabetes mellitus: modulation of inflammation and oxidative stress. **Bilogics**, v. 5, p. 7-19, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 1–85, 1990.

HAROLD, E.; LEOVITZ, M. D. Alpha-glucosidase inhibitors. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 26, p. 539–551, 1997.

KHAN, R. A.; KHAN, M. R.; SAHREEN, S.; AHMED, M. Evaluation of phenolic contents and antioxidant activity of various solvent extracts of *Sonchus asper* (L.) Hill. **Chemistry Central Journal**, v. 6, p. 2-7, 2012.

KIM, D.; JEONG, S. W.; LEE, C. Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, v. 81, p. 231-326, 2003.

KOBAYASHI, Y.; SUZUKI, M.; SATSUI, H.; ARAI, S.; HARA, Y.; SUZUKI, K.; MIYAMOTO, Y.; SHIMIZU, M. Green tea polyphenols inhibit the sodium dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. **Journal of Agriculture and Food chemistry**, v. 48, p. 5618–5628, 2000.

MAHLUJI, S.; ATTARI, V. E.; MOBASSERI, M.; PAYAHOO, L.; OSTADRAHIMI, A.; GOLZARI, S. E. J. Effects of ginger (*Zingiber officinale*) on plasma glucose level, HbA1c and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 64, p. 682-686, 2013.

MARINOVA, D.; RIBAROVA, F.; ATANASSOVA, M. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. **Journal University Chemical Technological Metallurgy**, v.40, p. 255-260, 2005.

MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A.; WATKINS III, J. B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 17, p. 24-38, 2003.

MCLENNAN, S. V.; HEFFERNAN, S.; WRIGHT, L.; RAE, C.; FISHER, E.; YUE, D. K.; TURTLE, J. R. Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. **Diabetes**,

v. 40, p. 344–348, 1991.

MESQUITA, F. R.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P.; LIMA, R. A. Z.; ABREU, A. F. B. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 1114-1121, 2007.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, p.121-42, 2005.

OLIVEIRA, A. R.; PEREIRA, C. A. Inhibition of alpha-amylase by “insulin plant” (*Myrcia sphaerocarpa* DC) extracts: an alternative for the treatment of diabetes mellitus?. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, p. 89-93, 2015.

PELLEGRINI, N.; RE, R.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis (3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 379-389, 1999.

PEREIRA, L. L. S.; SOUZA, S. P.; SILVA, M. C.; CARVALHO, G. A.; SANTOS, C. D.; CORRÊA, A. D. ABREU, C. M. P. Atividade das glicosidases na presença de chá verde e de chá preto. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, p. 516-518, 2010.

PROHENS, J.; NUEZ, F. 2008. Handbook of Plant Breeding. **Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae and Umbelliferae**, Vol. 2. Springer Science; New York; 30–40.

ROSA, R. L.; BARCELOS, A. L. V.; BAMPI, G. Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes melito na cidade de Herval D' Oeste – SC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 306-310, 2012.

SUBRAMANIAN, R.; ASMAWI, M. Z.; SADIKUN, A. In vitro alpha-glucosidase and alpha-amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. **Acta Biochimica Polonica**, v. 55, p. 391–398, 2008.

SHETTY, K.; CURTIS, O.; LEVIN, R.; WITKOWSKY, R.; ANG, W. Prevention of Vitrification Associated with in vitro Shoot Culture of Oregano (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* spp. **Journal of Plant Physiology**, v. 147, p. 447-451, 1995.

SILVA, A. G.; ROCHA, L. C.; CANNIATTI BRAZACA, S. G. Caracterização físico-química, digestibilidade protéica e atividade antioxidante de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Alimentos e Nutrição**, v. 20, p. 591-598, 2009.

SOUZA, P. M. **Atividade de inibição enzimática por espécies vegetais do bioma cerrado**. 2011. 90 fls. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

VAN DUYN, M. A.; PIVONKA, E. Overview of the health benefits of fruit and vegetable consumption for the dietetics professional: selected literature. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 100, p. 1511–1521, 2000.

VENKATESWARAN, S.; PARI, L.; SARAVANAN, G. Effect of *Phaseolus vulgaris* on circulatory antioxidants and lipids in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Journal of Medical Food**, v. 5, p. 97-103, 2002.

World Health Organization Fact Sheet - WHO. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/, (Acesso em Setembro, 2015).

YAO, Y.; YANG, X.; TIAN, J.; LIU, C.; CHENG, X.; REN, G. Antioxidant and antidiabetic activities of black mung bean (*Vigna radiata* L.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 61, p. 8104-8109, 2013.

YOUNG, I. S.; TATE, S.; LIGHTBODY, J. H.; MCMASTER, D.; TRIMBLE, E. R. The effects of desferrioxamine and ascorbate on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, p. 833–840, 1995.

ZATALIA, S. R.; SANUSI, H. The role of antioxidants in the pathophysiology, complications, and management of diabetes mellitus. **Acta Medica Indonesiana**, v. 45, p. 141-147, 2013.

ZIMMERMANN, A. M.; KIRSTEN, V. R. Alimentos com função antioxidante em doenças crônicas: uma abordagem clínica. **Discipline Science**, v. 9, p. 51-68, 2008.

6 ARTIGO D - ANÁLISE DE ANTIOXIDANTE E ALFA-AMILASE EM GENÓTIPOS DE FEIJÃO-DE-VAGEM VIA REML/BLUP

RESUMO: O desenvolvimento de genótipos de feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) com maiores capacidade antioxidante e percentagem de inibição da enzima alfa-amilase faz-se necessário, pois essas características contribuem para uma dieta alimentar mais saudável. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar genótipos de feijão-de-vagem quanto à variabilidade genética para caracteres relacionados aos compostos fenólicos totais (CFT), atividade antioxidante (AA) e percentagem de inibição da enzima alfa-amilase (%IAA), via REML/BLUP, visando programas de melhoramento genético. Foram utilizadas vagens de 28 diferentes genótipos de feijão-de-vagem. Foi realizada a seleção dos genótipos via BLUP, de acordo com o programa Selegen-REML/BLUP. Os valores de deviances foram de 1067,61; 980,10 e 728,39 para as variáveis CFT; %IAA e AA, respectivamente. Em relação aos parâmetros genéticos verificou-se alta herdabilidade entre as variáveis estudadas. As percentagens dos coeficientes de variação experimental foram baixas para as três características avaliadas. As médias gerais para CFT, % IAA e AA foram de 187,24; 51,09 e 60,63, respectivamente. Pela análise de Pearson verificou-se efeito significativo entre o conteúdo dos CFT e a AA. Em relação à correlação entre %IAA com CFT e AA, verificou-se efeito não significativo para os dados preditos e reais apenas para %IAA x CFT. De acordo com os resultados obtidos neste estudo os genótipos avaliados podem contribuir geneticamente no desenvolvimento de novas variedades de feijão-de-vagem com maiores teores de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e percentagem de inibição da enzima alfa-amilase.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L.. Compostos fenólicos. Enzima digestiva.

ABSTRACT: The development of green bean genotypes (*Phaseolus vulgaris* L.) with higher antioxidant capacity and percentage of inhibition of the alpha-amylase enzyme is necessary because these features contribute to a healthier diet. Thus, this study aimed to evaluate green bean genotypes for genetic variability for traits related to total phenolic compounds (TPC), antioxidant activity (AA) and percentage inhibition of the enzyme alpha-amylase (% IAA) by REML / BLUP, aiming breeding programs. Pods were used in 28 different genotypes of green bean. The selection of genotypes by BLUP, according to Selegen - REML / BLUP program was performed. The deviances values were 1067,61; 980,10 and 728,39 for variables TPC; % IAA and AA, respectively. Regarding the genetic parameters there was high heritability between variables. The percentages of experimental coefficients of variation were lower for the three evaluated characteristics. The overall averages for TPC, % IAA and AA were 187,24; 51,09 and 60,63, respectively. By Pearson analysis showed significant effect of the TPC and AA. Regarding the relationship between % IAA, TPC and AA, there was no significant effect on the predicted and real datas for just % IAA and TPC. According to the results obtained in this study the genotypes can contribute genetically to develop new varieties of green bean with higher levels of phenolic compounds, antioxidant activity and percentage of inhibition of the enzyme alpha-amylase.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L.. Phenolic compounds. Digestive enzyme.

6.1 INTRODUÇÃO

O feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) é amplamente consumido e cultivado em diversos países. Sua produção mundial, no ano de 2013, foi em torno de 20 milhões de toneladas, sendo os principais produtores China, Indonésia, Turquia, Índia e Tailândia (FAO, 2016). Ao contrário do feijão comum, que fornece grãos secos para a alimentação humana, o feijão-de-vagem apresenta vagens imaturas e com menor teor de fibras (BLAIR et al., 2010).

O consumo das vagens fornece cálcio, que é prontamente absorvido, fibras dietéticas e vitaminas essenciais (A, B₁₂ e C) ao nosso organismo, além de apresentar baixo teor calórico, o que as torna um alimento saudável (GRUSAK et al., 1996; BLAIR et al., 2010). Além disso, esse alimento contribui na obtenção de compostos fenólicos e favorece a atividade antioxidante (MARINOVA; RIBAROVA; ATANASSOVA, 2005; BAARDSETH et al., 2010; DALLAQUA, DAMASCENO, 2011). Sendo assim, sua ingestão pode auxiliar na redução de diversas doenças, como o *diabetes mellitus* tipo 2 (DM 2) (CARTER et al., 2010).

Desse modo, os programas de melhoramento têm focado na obtenção de genótipos de *Phaseolus vulgaris* L. com melhores características nutricionais, a fim de que possam contribuir com a redução de determinadas doenças (RIBEIRO, 2010). Além do interesse no aspecto produtivo das culturas, melhoristas tem objetivado o incremento nas qualidades nutricionais (MOOSE, MUMM, 2008). Ribeiro et al. (2005) estudaram a variabilidade genética para o teor de proteína e de fibra em grãos de *Phaseolus vulgaris* L. a fim de identificar quais combinações híbridas deveriam ser utilizadas para desenvolver genótipos com melhores qualidades nutricionais. Mesquita et al. (2007) objetivaram determinar a composição química e a digestibilidade da proteína de 21 linhagens de *Phaseolus vulgaris* L. com o intuito de oferecerem novas informações aos melhoristas. Tulipani et al. (2008), com o objetivo de avaliar os compostos fitoquímicos e antioxidantes em nove diferentes genótipos de *Fragaria* × *ananassa* Duch., observaram diferenças significativas entre os genótipos estudados, concluindo que há diferenças, entre os materiais avaliados, que podem ser aplicadas em estudos relacionados à dieta humana.

A seleção de genótipos superiores deve ser baseada principalmente nos componentes genéticos, o que auxilia, tanto no conhecimento dos genes envolvidos nos caracteres que se deseja melhorar, como no planejamento de estratégias de melhoramento (SOUSA, 2015). De acordo com Resende et al. (2001) há a possibilidade de predição de valores genotípicos dos candidatos à seleção quando os componentes genéticos são bem estimados. A estimativa dos componentes da variância é feita pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML) e a predição dos valores genotípicos é realizada por meio da melhor predição linear não-viesada (BLUP) (RESENDE, 2007).

Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar genótipos de feijão-de-vagem quanto à variabilidade genética para caracteres relacionados aos compostos fenólicos totais (CFT), atividade antioxidante (AA) e percentagem de inibição da enzima alfa-amilase (%IAA), via REML/BLUP, visando programas de melhoramento genético.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Materiais

Foram utilizadas vagens imaturas de 28 diferentes genótipos de feijão-de-vagem (Celtic, Contender, Flo, Fury, Galveston, Gina, Provider, Royal Burgundy, Seabiscuit, Serengeti, Seville, Slenderella, Spartacus, Speedy, Stayton, Storm, Strike, Stringless French Fillet, Tapia, Titan, Top Crop, Ulysses, Unidor, Venture, Widusa, Zodiac, Oregon Giant Pole, Trail of Tears). Esses genótipos foram obtidos da Universidade de Oregon-EUA, em 2014. Foram semeados e colhidos, em 2015, na Universidade da Dakota do Norte-EUA. Depois de colhidas, todas as vagens foram lavadas com água destilada e, em seguida, selecionadas aleatoriamente para às análises. Enzima alfa-amilase e ABTS⁺, adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO), foram utilizados no presente estudo.

Extração das amostras

As amostras das vagens foram cortadas e pesadas. Cada genótipo foi extraído separadamente usando água destilada na proporção de 20 g da amostra

(vagem) por 50 mL de água destilada. Todas as amostras foram homogeneizadas, utilizando liquidificador, durante 10 minutos. Em seguida, foram centrifugadas em 15.000 RPM por dois períodos de 20 minutos cada. O sobrenadante foi coletado e armazenado a 20 °C durante o período do estudo.

Compostos Fenólicos Totais

Os fenólicos totais foram determinados, de acordo com Shetty et al. (1995), com algumas modificações. Desse modo, 0,5 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio e misturado com 0,5 mL de água destilada, 1 mL de etanol a 95% e 5 mL de água destilada. Para cada amostra 0,5 mL de 50% (v / v) de reagente Folin-Ciocalteu foi adicionado e misturado. Após 5 min, 1 mL de Na₂CO₃ (5%) foi adicionado à mistura da reação, deixando a solução em repouso, no escuro, durante 60 min. A absorvância foi lida a 725 nm. Os valores de absorvância foram convertidos em compostos fenólicos totais e foram expressos em microgramas por grama de peso fresco (PF). As curvas padrão foram estabelecidas utilizando várias concentrações de ácido gálico em água.

Atividade antioxidante pelo método ABTS⁺ [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)]

A atividade antioxidante total das vagens dos genótipos estudados foi medida pelo método ABTS⁺ (PELLEGRINI et al., 1999). ABTS⁺ (Sigma Chemical Co.St. Louis, MO) foi dissolvido em água para uma concentração de 7 mM. Em seguida, ABTS⁺ foi preparado utilizando 5 mL de 7 mM da solução estoque de ABTS⁺ com 88 µL de 140 mM de persulfato de potássio. A mistura foi deixada em repouso no escuro à temperatura ambiente por 12-16 h antes de ser utilizada. Antes do início do ensaio a solução foi diluída com etanol (95%) na proporção 1:88 para se obter uma absorvância a 734 nm de 0,70 ± 0.02, e foi equilibrada a 30°C. Um mililitro da solução ABTS⁺ foi adicionado a tubos de ensaio de vidro contendo 50 µl de cada extrato de tecido das vagens, e misturados em vortex durante 30 s. Após 2,5 minutos de incubação, as misturas foram lidas a 734 nm. As leituras foram comparadas com os controles, os quais continham 50 mL de etanol a 95% em vez do extrato aquoso das vagens. O padrão de referência Trolox para as atividades

antioxidantes foi preparado com 5 mM de solução de estoque de Trolox em etanol para introdução no sistema de ensaio em concentrações dentro do intervalo do ensaio (concentração final de 0-20 μ M), para o preparo de uma curva padrão em que todos os dados foram. A percentagem de inibição foi calculada por:

$$\% \text{ inibição} = \left(\left[\frac{A_{734}^{Control} - A_{734}^{Extract}}{A_{734}^{Control}} \right] \right) \times 100$$

Inibição Alfa-Amilase

A enzima alfa-amilase foi adquirida da Sigma Chemical Co. O volume de 250 μ L de sobrenadante e 500 μ L de tampão de fosfato de sódio 0,02 M (pH 6,9 com cloreto de sódio 0,006 M) contendo solução de alfa-amilase (0,5 mg / mL) foram incubados a 25°C durante 10 min. Após a pré-incubação, 500 μ L de uma solução de amido a 1% em tampão de fosfato de sódio 0,02 M (pH 6,9 com cloreto de sódio 0,006 M) foi adicionado a cada tubo a intervalos cronometrados. As misturas das reações foram incubadas a 25°C durante 10 min. A reação foi interrompida com 1,0 mL de 3,5 ácido dinitro-salicílico. Em seguida, os tubos de ensaio foram incubados em banho com água em ebulição durante 10 min e arrefecidos até à temperatura ambiente. A mistura de reação foi então diluída após a adição de 10 mL de água destilada e a absorvância foi medida a 540 nm.

$$\% \text{ inibição} = \left(\left[\frac{A_{540}^{Control} - A_{540}^{Extract}}{A_{540}^{Control}} \right] \right) \times 100$$

Análise Estatística

Foram realizadas análises individuais referentes aos valores por genótipos das características usadas para a seleção. Utilizou-se o programa SELEGEN – REML/BLUP (*Restricted Maximum Likelihood – Best Linear Unbiased Prediction*) para estimar e predizer os valores genéticos. O BLUP (melhor predição linear não viciada) foi utilizado para predizer os valores genéticos, utilizando-se de estimativas de variância obtidas por meio do método REML (máxima verossimilhança restrita) (RESENDE, 2007).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de deviances foram de 1067,61, 980,10 e 728,39 para as variáveis CFT; %IAA e AA, respectivamente, sendo todos significativos pelo teste de Qui-quadrado ($P < 0.05$). Esses resultados demonstraram haver uma ampla variabilidade genética entre os genótipos estudados.

Em relação aos parâmetros genéticos verificou-se alta herdabilidade entre as variáveis estudadas (CFT, %IAA e AA com 0,96; 0,90 e 0,92, respectivamente). As percentagens dos coeficientes de variação experimental foram baixas para as três características estudadas (5,20; 16,20 e 9,07 para CFT, %IAA e AA, respectivamente). As médias gerais para CFT, %IAA e AA foram de 187,24; 51,09 e 60,63, respectivamente (Tabela 6.1).

Tabela 6.1. Parâmetros genéticos estimados para compostos fenólicos totais (CFT), percentagem de inibição da enzima alfa-amilase (%IAA) e atividade antioxidante (AA) e a média geral dos genótipos.

Estimativas	Variáveis ^{1/}		
	CFT	%IAA	AA
Vg	2387,59	600,27	357,83
Ve	94,58	68,50	30,22
Vf	2482,16	668,78	388,06
h ² g	0,96 ± 0,21	0,90 ± 0,20	0,92 ± 0,23
Cvgi%	26,10	47,96	31,20
Cve%	5,20	16,20	9,07
Média geral	187,24	51,09	60,63

^{1/}CFT= compostos fenólicos totais; %IAA= percentagem de inibição da enzima alfa-amilase; AA= atividade antioxidante; Vg= variância genotípica; Ve= variância ambiental; Vf= variância fenotípica; h²g= herdabilidade genética; Cvgi%= coeficiente de variação genética; Cve%= coeficiente de variação ambiental.

O valor genético predito, ganho genético e nova média predita dos genótipos avaliados estão dispostos na tabela 6.2.

Tabela 6.2. Ganho genético (g), valor genético predito ($\mu+g$) e nova média predita (NM) estimados para os genótipos selecionados para as características compostos fenólicos totais (CFT), percentagem de inibição da enzima alfa-amilase (%IAA) e atividade antioxidante (AA).

Genótipos	Variáveis ^{1/}								
	CFT			%IAA			AA		
	g	u+g	NM	g	u+g	NM	g	u+g	NM
Celtic	-17,49	169,74	210,06	29,29	80,38	83,94	10,55	71,18	82,00
Contender	4,34	191,58	236,50	-24,25	26,83	58,58	6,95	67,58	78,58
Flo	43,34	230,58	273,99	31,29	82,38	85,13	25,13	85,76	87,13
Fury	-3,63	183,60	227,82	24,48	75,57	81,64	-13,07	47,55	70,50
Galveston	-39,93	147,30	195,89	21,64	72,73	79,53	-14,77	45,86	68,16
Gina	57,57	244,81	284,85	17,83	68,91	77,56	26,12	86,75	87,59
Provider	6,30	193,54	241,49	7,34	58,42	73,47	19,99	80,62	84,97
Royal Burgundy	120,73	307,97	314,90	-35,70	15,38	53,99	28,13	88,76	88,76
Seabiscuit	-66,30	120,93	187,23	3,14	54,23	72,10	-35,82	24,80	60,63
Serengeti	-32,57	154,66	202,55	19,34	70,43	78,52	-4,96	55,66	74,55
Seville	-46,07	141,17	191,68	-12,61	38,48	64,66	-12,33	48,30	71,78
Slenderella	-32,33	154,91	204,94	-9,51	41,58	67,73	-28,72	31,90	61,95
Spartacus	-11,24	176,00	220,69	27,42	78,51	82,85	7,29	67,91	79,58
Speedy	-45,94	141,29	193,70	-28,67	22,42	57,07	-15,61	45,01	66,17
Stayton	-39,93	147,30	198,00	11,42	62,51	76,19	8,89	69,51	80,75
Storm	-34,05	153,19	200,31	-32,47	18,62	55,54	-18,97	41,65	65,15
Strike	-49,38	137,86	189,70	-38,84	12,25	51,09	-24,99	35,63	63,11
Stringless F. Fillet	6,55	193,78	247,49	-36,64	14,45	52,53	11,37	72,00	83,35
Tapia	-2,04	185,20	231,84	7,53	58,61	74,72	0,72	61,34	75,81
Titan	-7,43	179,80	224,12	-3,04	48,05	69,36	5,85	66,48	77,65
Top Crop	22,86	210,10	263,34	1,36	52,45	70,79	20,04	80,67	85,69
Ulysses	-24,36	162,88	207,58	-21,70	29,39	60,02	-15,03	45,60	67,13
Unidor	-11,97	175,26	215,02	-12,36	38,73	66,12	-18,99	41,63	64,21
Venture	18,81	206,05	255,16	38,49	89,58	89,58	5,78	66,41	76,85
Widusa	-11,85	175,39	217,67	-18,19	32,89	63,08	-9,81	50,81	73,16
Zodiac	-16,14	171,09	212,43	-21,48	29,61	61,48	-14,74	45,89	69,27
Oregon Giant Pole	134,59	321,83	231,83	22,56	73,65	80,50	24,35	84,98	86,70
Trail of Tears	77,56	264,80	298,20	32,34	83,42	86,50	26,63	87,26	88,01

^{1/}CFT= compostos fenólicos totais; %IAA= percentagem de inibição da enzima alfa-amilase; AA= atividade antioxidante.

Os genótipos Oregon Giant Pole, Royal Burgundy, Trail of Tears, Gina e Flo obtiveram os maiores valores genotípicos preditos para característica CFT. Em relação ao teor de compostos fenólicos na cultura do feijão-de-vagem, Marinova, Ribarova e Atanassova (2005) e Baardseth et al. (2010) verificaram

valores de 35,5 mg de ácido gálico (GAE).100 g⁻¹ de peso fresco (PF) e 221,0 mg GAE. kg⁻¹ PF, respectivamente. Silva et al. (2009) trabalhando com grãos crus e cozidos de feijão comum obtiveram valores de compostos fenólicos que variaram de 0,01 a 4,51 mg de catequina por grama da amostra. Já Mesquita et al. (2007) trabalhando com feijão comum obtiveram valores variando de 0,28 a 1,08 g de ácido tânico/100 g de matéria seca. Vale ressaltar que o padrão para avaliação dos CFT, utilizado nessa pesquisa, foi o ácido gálico. Entretanto, as diferenças dos teores de CFT encontradas na literatura estão associadas a genética dos materiais e metodologia das análises.

Em relação a AA, os genótipos Royal Burgundy; Trail of Tears; Gina; Flo e Oregon Giant Pole obtiveram os maiores valores genotípicos preditos. Silva et al. (2009) trabalhando com feijão comum obtiveram resultados que variaram de 1,13±0,93 a 7,02±0,78 % de inibição ABTS⁺. Yao et al. (2013) avaliando a atividade antioxidante, pelo mesmo método ABTS⁺, em diferentes genótipos de feijão mungo (*Vigna radiata* L.), observaram valores de 8,76 µM TE (Trolox equivalente)/g a 21,19 µM TE/g.

A ingestão de alimentos com elevados teores de compostos fenólicos totais pode contribuir no tratamento do DM tipo 2, pois esses compostos podem aumentar a sensibilidade da insulina em pacientes portadores da doença, além de reduzir de maneira significativa os níveis de glicose, triglicerídeos e LDL-C (AL-AMIN et al., 2006; MAHLUJI et al., 2013).

O consumo de *Phaseolus vulgaris* L. pode auxiliar no tratamento do DM tipo 2, pois esse vegetal, além de fornecer CFT, apresenta atividade antioxidante. O DM tipo 2 pode ter seu desenvolvimento e progressão aumentados conforme o aumento de radicais livres no organismo humano, deficiência da proteção antioxidante e estresse oxidativo. Desse modo, o consumo de alimentos ricos em antioxidantes pode contribuir positivamente no controle dessa doença (MARITIM; SANDERS; WATKINS, 2003; DALLAQUA; DAMASCENO, 2011).

Os maiores valores genotípicos preditos para a variável %IAA foram para os genótipos Venture; Trail of Tears; Flo; Celtic e Spartacus. Com base nos resultados obtidos, os genótipos Flo, Gina, Oregon Giant Pole e Trail of Tears encontram-se entre as 10 primeiras ordens em todos os quesitos avaliados (CFT, IAA e AA).

Quanto a percentagem de inibição da enzima alfa-amilase, Funke e

Melzig (2006) obtiveram valores entre 45-75% na cultura do feijão-de-vagem. Já Oliveira e Pereira (2015) trabalhando sob diversas extrações com a espécie *Myrcia sphaerocarpa* DC, planta conhecida como a insulina vegetal e recomendada no tratamento do diabetes, observaram valores que variaram de 0 a $93,07 \pm 3,47$. Segundo Souza (2011) a percentagem de inibição da enzima alfa-amilase pode ser considerada boa e alta com valores maiores do que 50% e 80%, respectivamente.

A enzima alfa-amilase apresenta relevante importância no processo de digestão dos carboidratos, onde essa substância catalisa a hidrólise da ligação glicosídica α -1,4 do amido, glicogênio e vários oligossacarídeos para, em seguida, sofrerem a ação das glicosidases, resultando na liberação de açúcares simples que serão absorvidos nas membranas dos enterócitos (ALI; HOUGHTON; SOUMYANATH, 2006; PEREIRA et al., 2010). Sendo assim, a inibição dessa enzima no trato digestivo humano causa a diminuição da absorção de glicose, podendo controlar o DM tipo 2.

Os valores genotípicos devem ser os preferidos pelos pesquisadores, pois estes são os verdadeiros valores a serem preditos. Existem, também, os valores de nova média que são as predições feitas pelo BLUP para os cultivos comerciais. Sendo assim, nesses cultivos as progênies deverão produzir, em média, esses valores (BORGES et al., 2010).

Pela análise de Pearson verificou-se efeito significativo entre o conteúdo dos CFT e a AA, apresentando correlação de ($r=0,81$; $p \leq 0,01$) e ($r=0,80$; $p \leq 0,01$) para os dados preditos e reais, respectivamente. Esses resultados indicaram a importância dos compostos fenólicos como determinantes da atividade antioxidante em feijão-de-vagem. Além do mais, concordam com diversos autores que relataram correlação positiva entre CFT e AA (SAEED; KHAN; SHABBIR, 2012; BARBOSA et al., 2013; SKOTTI et al., 2014). Em relação à correlação entre %IAA com CFT e AA, verificou-se efeito não significativo para os dados preditos ($r=0,27$; $r=0,37$, respectivamente) e reais apenas para IAA x CFT ($r=0,23$; $p=0,23$). Barbosa et al. (2010) e Barbosa et al. (2013) trabalhando com *Malus domestica* e *Pyrus communis*, respectivamente, também não observaram correlação significativa entre CFT e %IAA.

Sendo assim, de acordo com os resultados obtidos neste estudo, os genótipos avaliados podem contribuir geneticamente no desenvolvimento de novas variedades de feijão-de-vagem com maiores teores de compostos fenólicos totais,

atividade antioxidante e percentagem de inibição da enzima alfa-amilase.

REFERÊNCIAS

ALI, H.; HOUGHTON, P. J.; SOUMYANATH, A. Alpha-amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 449-455, 2006.

AL-AMIN, Z. M.; THOMSON, M.; AL-QATTAN, K. K.; PELTONEN-SHALABY, R.; ALI, M. Anti-diabetic and hypolipidaemic properties of ginger (*Zingiber officinale*) in streptozotocin-induced diabetic rats. **British Journal of Nutrition**, v. 96, p. 660-666, 2006.

BAARDSETH, P.; BJERKE, F.; MARTISEN, B. K.; SKREDE, G. Vitamin C, total phenolic compounds and antioxidative activity in tip-cut green beans (*Phaseolus vulgaris*) and sweede rods (*Brassica napus* var. *napobrassica*) processed by methods used in catering. **Journal of the Science and Food Agricultural**, v. 90, p.1245-1255, 2010.

BARBOSA, A. C. L.; PINTO, M. S.; SARKAR, D.; ANKOLEKAR, C.; GREENE, D.; SHETTY, K. Varietal influences on antihyperglycemia properties of freshly harvested apples using *in vitro* assay models. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, p. 1313-1323, 2010.

BARBOSA, A. C. L.; SARKAR, D.; PINTO, M. S.; ANKOLEKAR, C.; GREENE, D.; SHETTY, K. Type 2 diabetes relevant bioactive potential of freshly harvested and long-term stored pears using *in vitro* assay models. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, p. 677—86, 2013.

BLAIR, M. W.; CHAVES, A.; TOFIÑO, A.; CALDERÓN, J. F.; PALACIO, J. D. Extensive diversity and inter-genepool introgression in a world-wide collection of indeterminate snap bean accessions. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 120, p. 1381-1391, 2010.

BORGES, V.; FERREIRA, P. V.; SOARES, L.; SANTOS, G. M.; SANTOS, A. M. M. Seleção de clones de batata-doce pelo procedimento REML/BLUP. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, p. 643-649, 2010.

CARTER, P.; GRAY, L. J.; TROUGHTON, J.; KHUNTI, K.; DAVIES, M. J. (2010). Fruit and vegetable intake and incidence of type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. **British Medical Journal**, v. 341, p. 1-8, 2010.

DALLAQUA, B.; DAMASCENO, D. C. Comprovação do efeito antioxidante de plantas medicinais utilizadas no tratamento do *Diabetes mellitus* em animais: artigo de atualização. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 13, p. 367-373, 2011.

FAO-Food and Agriculture Organization. Statistitical databases – Agriculture. Home: FAO. Available from: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acessado 07 março. 2016.

FUNKE, I.; MELZIG, M. F. Traditionally used plants in diabetes therapy – phytotherapeutics as inhibitors of α -amylase activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 1-5, 2006.

GRUSAK, M. A.; PEZESHGI, S.; O'BRIEN, K. O.; ABRAMS, S. A. Intrinsic ^{42}Ca -Labelling of green bean pods for use in human bioavailability studies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 70, p. 11-15, 1996.

MAHLUJI, S.; ATTARI, V. E.; MOBASSERI, M.; PAYAHOO, L.; OSTADRAHIMI, A.; GOLZARI, S. E. J. Effects of ginger (*Zingiber officinale*) on plasma glucose level, HbA1c and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 64, p. 682-686, 2013.

MARINOVA, D.; RIBAROVA, F.; ATANASSOVA, M. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. **Journal University Chemical Technological Metallurgy**, v. 40, p. 255-260, 2005.

MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A.; WATKINS III, J. B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 17, p. 24-38, 2003.

MESQUITA, F. R.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P.; LIMA, R. A. Z.; ABREU, A. F. B. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 1114-1121, 2007.

MOOSE, S. P.; MUMM, R. H. Molecular PLANT breeding as the foundation for 21st Century crop improvement. **Plant Physiology**, v. 147, p. 969-977, 2008.

OLIVEIRA, A. R.; PEREIRA, C. A. Inhibition of alpha-amylase by "insulin plant" (*Myrcia sphaerocarpa* DC) extracts: an alternative for the treatment of diabetes mellitus?. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, p. 89-93, 2015.

PELLEGRINI, N.; RE, R.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis (3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 379-389, 1999.

PEREIRA, L. L. S.; SOUZA, S. P.; SILVA, M. C.; CARVALHO, G. A.; SANTOS, C. D.; CORRÊA, A. D. ABREU, C. M. P. Atividade das glicosidases na presença de chá verde e de chá preto. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, p. 516-518, 2010.

RESENDE, M. D. V.; FURLANI-JÚNIOR, E. N. E. S.; MORAES, M. D.; FAZUOLI, L. C. Estimativas de parâmetros genéticos e predição de valores genotípicos no melhoramento do cafeeiro pelo procedimento REML/BLUP. **Bragantia**, v. 60, p. 185-193, 2001.

RESENDE, M. D. V. **SELEGEN-REML/BLUP: sistema estatístico e seleção genética computadorizada via modelos lineares mistos**. Embrapa Florestas, 360

p., 2007.

RIBEIRO, N. D. Potencial de aumento da qualidade nutricional do feijão por melhoramento genético. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, p. 1367-1376, 2010.

RIBEIRO, N. D.; LONDERO, P. M. G.; HOFFMANN JUNIOR, L.; POERSCH, N. L.; CARGNELUTTI FILHO, A. Dissimilaridade genética para teor de proteína e fibra em grãos de feijão dos grupos preto e de cor. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 11, p. 167-173, 2005.

SAEED, N.; KHAN, M. R.; SHABBIR, M. Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. **BMC Complementary & Alternative Medicine**, v. 12, p. 1-12, 2012.

SHETTY, K.; CURTIS, O.; LEVIN, R.; WITKOWSKY, R.; ANG, W. Prevention of Vitrification Associated with in vitro Shoot Culture of Oregano (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* spp. **Journal of Plant Physiology**, v. 147, p. 447-451, 1995.

SILVA, A. G.; ROCHA, L. C.; CANNIATTI BRAZACA, S. G. Caracterização físico-química, digestibilidade protéica e atividade antioxidante de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Alimentos e Nutrição**, v. 20, p. 591-598, 2009.

SKOTTI, E.; ANASTASAKI, E.; KANELLOU, G.; POLISSIOU, M.; TARANTILIS, P. A. Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. **Industrial Crops and Products**, v. 53, p. 46-54, 2014.

SOUSA, C. M. B. **Seleção de progênies F₂ de feijão-de-vagem para produção via modelos mistos**. 2015. 45 fls. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2015.

SOUZA, P. M. **Atividade de inibição enzimática por espécies vegetais do bioma cerrado**. 2011. 90 fls. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

TULIPANI, S.; MEZZETTI, B.; CAPOCASA, F.; BOMPADRE, S.; BEEKWILDER, J.; DE VOS, C. H. R.; CAPANOGLU, E.; BOVY, A.; BATTINO, M. Antioxidants, phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 696-704, 2008.

YAO, Y.; YANG, X.; TIAN, J.; LIU, C.; CHENG, X.; REN, G. Antioxidant and antidiabetic activities of black mung bean (*Vigna radiata* L.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 8104-8109, 2013.

7. CONCLUSÕES GERAIS

Os acessos de feijão-de-vagem de crescimento determinado e indeterminado, do banco de germoplasma da UEL, apresentam variabilidade genética.

Dentre as variedades de feijão-de-vagem testadas, UEL 402; UEL 405; UEL 407; UEL 408; UEL 412; UEL 417 e UEL 420 destacaram-se, perante as demais, em relação às características produtivas, podendo ser indicadas aos produtores orgânicos da região de Londrina-PR, e, também, utilizadas em programas de melhoramento como germoplasma melhorado.

O consumo de feijão-de-vagem pode favorecer a aquisição de antioxidantes, e contribuir na gestão da *Diabetes mellitus* tipo 2 em fase inicial.

Os genótipos de feijão-de-vagem Flo, Gina, Oregon Giant Pole e Trail of Tears mostraram-se promissores em programas de melhoramento para os caracteres relacionados aos compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante e percentagem de inibição da enzima alfa-amilase.