



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**AVALIAÇÃO DE SNPs ASSOCIADOS À DESCOLORAÇÃO DE FEIJÕES
ESPECIAIS DESTINADOS À EXPORTAÇÃO E CONSUMO INTERNO**

ALINE RODRIGUES DE SOUSA

Orientador:

Prof. Dr. Manoel Soares Soares Júnior

Abril 2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese

2. Nome completo do autor

Aline Rodrigues de Sousa

3. Título do trabalho

Avaliação de SNPs Associados à Descoloração de Feijões Especiais Destinados À Exportação e Consumo Interno

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:
a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Manoel Soares Soares Júnior, Professor do Magistério Superior**, em 26/04/2021, às 12:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **ALINE RODRIGUES DE SOUSA, Discente**, em 26/04/2021, às 14:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2015751** e o código CRC **685AF275**.

ALINE RODRIGUES DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DE SNPs ASSOCIADOS À DESCOLORAÇÃO DE FEIJÕES
ESPECIAIS DESTINADOS À EXPORTAÇÃO E CONSUMO INTERNO**

Dissertação apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Área de concentração: Produção Vegetal

Orientador (a):

Prof. Dr. Manoel Soares Soares Júnior

Co-orientadoras:

Profa. Dra. Priscila Zaczuk Bassinello e

Profa. Dra. Rosana Pereira Vianello

Goiânia, GO – Brasil

2021

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

Sousa , Aline Rodrigues de
Avaliação de SNPs associados à descoloração de feijões especiais destinados à exportação e consumo interno [manuscrito] / Aline Rodrigues de Sousa . - 2021.
81 f.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Soares Soares Júnior; co orientadora Dra. Rosana Pereira Vianello; co-orientador Dra. Priscila Zaczuk Bassinello.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia (EA), Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Goiânia, 2021.

Bibliografia. Apêndice.

Inclui siglas, fotografias, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Phaseolus vulgaris L. 2. Marcadores moleculares. 3. Mudança de cor no cozimento. 4. Agroindústria. I. Soares Júnior, Manoel Soares, orient. II. Título.

CDU 631/635



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

ESCOLA DE AGRONOMIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 72/2021 da sessão de Defesa de Dissertação de **Aline Rodrigues de Sousa**, que confere o título de Mestra em **Agronomia**, na área de concentração em **Produção Vegetal**.

Aos vinte e nove dias do mês de abril do ano de dois mil e vinte e um (29/04/2021), a partir das 08:30 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “Avaliação de SNPs Associados à Descoloração de Feijões Especiais Destinados À Exportação e Consumo Interno”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor **Manoel Soares Soares Júnior - EA/UFG**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora **Nara Oliveira Silva Souza - UNB**, membro titular externo; Professora Doutora **Luana Alves Rodrigues - Embrapa Arroz e Feijão**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata **APROVADA** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Manoel Soares Soares Júnior, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos vinte e nove dias do mês de abril do ano de dois mil e vinte e um (29/04/2021).

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Manoel Soares Soares Júnior, Professor do Magistério Superior**, em 29/04/2021, às 11:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luana Alves Rodrigues, Usuário Externo**, em 29/04/2021, às 13:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nara Oliveira Silva Souza, Usuário Externo**, em 10/05/2021, às 10:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código



verificador **2015782** e o código CRC **05FDC259**.

Aos meus pais José e Rozângela, pela educação e apoio que sempre me deram e o amor incondicional que me faz ser uma pessoa melhor a cada dia...

Orgulhosamente,

DEDICO

Ao meu melhor amigo e companheiro Michel que a vida me presenteou, e a minha querida irmã Tamires, pelo amor, paciência e apoio em todas as horas...

Carinhosamente,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida e saúde que ele me dá todos os dias e pela força e capacidade para realizar e conquistar os meus objetivos.

À Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás (EA), pela oportunidade de poder cursar o mestrado. À equipe do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UFG, professores e técnicos administrativos, pelos conhecimentos transmitidos e pela ajuda e atenção prestadas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo.

Ao meu orientador Professor Doutor Manoel Soares Soares Júnior, pela paciência e ensinamentos, sempre disponível a ajudar, sou muito grata pela sua orientação e apoio.

As minhas co-orientadoras da Embrapa Arroz e Feijão, Doutora Rosana Pereira Vianello e Doutora Priscila Zaczuk Bassinello pelo total apoio e ensinamentos sempre preciosos, que me ajudaram muito a crescer e a amadurecer profissionalmente, admiro muito vocês.

À Embrapa Arroz e Feijão, pela infraestrutura laboratorial, apoio técnico e financeiro, e auxílio na realização da pesquisa, em especial a Gesimária Ribeiro Costa Coelho e Paula Arielle Mendes Ribeiro Valdisser, pela ajuda na realização das análises no laboratório de biotecnologia, e a Rosangela Nunes Carvalho no laboratório de grãos e sementes.

Aos técnicos da Embrapa que me ajudaram muito na condução dos experimentos na casa de vegetação, Erick, Isaque, Jadelson, João Antônio, Pedro, obrigada. A doutora Vanderleia Schoeninger pela ajuda na parte de metodologias para o processamento do feijão e os artigos enviados.

Aos meus amigos do mestrado pela amizade e os momentos agradáveis Cássia, Renata, Denner, Daniela, Caio e Marília.

Ficam aqui registrados os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para mais essa conquista.

SUMÁRIO

RESUMO -----	13
ABSTRACT -----	14
1 INTRODUÇÃO -----	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -----	17
2.1 ORIGEM E TIPOS DE FEJJOEIRO CULTIVADOS NO BRASIL -----	17
2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E CADEIA PRODUTIVA DO FEIJÃO-----	19
2.3 ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DO FEJJOEIRO-----	21
2.3.1 Época de plantio, cultivares e manejo da cultura -----	21
2.3.2 Classificação e qualidade do feijão -----	24
2.4 PROCESSAMENTO DO FEIJÃO-----	25
2.4.1 Cocção do feijão -----	26
2.4.2 Conserva de feijão -----	28
2.5 MELHORAMENTO GENÉTICO DO FEIJÃO E MARCADORES MOLECULARES -----	30
3 OBJETIVOS -----	36
3.1 OBJETIVO GERAL-----	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	36
4 MATERIAL E MÉTODOS -----	37
4.1 CULTIVO, DADOS MORFOLÓGICOS E PRODUÇÃO DOS FEIJÕES-----	37
4.2 EXTRAÇÃO DO DNA, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS SNPS-----	38
4.3 TESTE DE COZIMENTO EM MATTSON E PERDA DE COR APÓS O COZIMENTO-----	40

4.4	TESTE E VALIDAÇÃO COM AS SONDAS TAQMAN E SEGUNDA FENOTIPAGEM-----	41
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA-----	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	43
5.1	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E RENDIMENTO-----	43
5.2	TESTE DE COZIMENTO, PRIMEIRA FENOTIPAGEM E IDENTIFICAÇÃO DOS MARCADORES SNP-----	46
5.3	SEGUNDA FENOTIPAGEM E VALIDAÇÃO DAS SONDAS TAQMAN-----	53
6	CONCLUSÃO-----	61
7	REFERÊNCIAS-----	63
	APÊNDICES-----	71

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Características morfológicas e rendimento dos genótipos cultivados na safra 2019 e 2019/2020 (primeira e segunda semeaduras).	44
Tabela 2. Terceira semeadura características morfológicas e rendimento dos genótipos Andinos cultivados no ano de 2020.	45
Tabela 3. Associação entre mudança de coloração após o cozimento (ΔE) e seleção de cinco regiões com SNPs que mostraram polimorfismo em genótipos de feijão de cores diversas dos pools gênicos Andino e Mesoamericano.	47
Tabela 4. Identificação dos sete SNPs depois que os vinte e um genótipos foram sequenciados.	52
Tabela 5. Desbotamento (ΔE) de 41 genótipos após maceração e cozimento em autoclave para a segunda fenotipagem usada na validação das sondas TaqMan.	55
Tabela 6. Quadro de Análise de Regressão Linear Simples para o SNP 1 para os genótipos de feijão do pool gênico Andino.	57
Tabela 7. Quadro de Análise de Regressão Linear Simples para o SNP 3 para os fenótipos de feijão do pool gênico Andino.	57

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Alinhamento das sequências feitas dos genótipos para identificação dos SNPs, marcadores e identificados.	50
Figura 2. Marcação no SNP 5 alvo e não alvo.	51
Figura 3. BoxPlots dos SNPs significativos 1 e 3 e os alelos resistentes ao desbotamento que provocam redução nos valores de Delta E nos genótipos de feijão do pool gênico Andino.	58
Figura 4. Boxplots diferença entre os pool gênicos quanto a descoloração da cor do grão.	59

RESUMO

SOUSA, A. R. de. *Avaliação de SNPs Associados à Descoloração de Feijões Especiais Destinados à Exportação e Consumo Interno*. 2021. 81 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2021.¹

O feijoeiro comum apresenta grãos de cores, formas e tamanhos variados. Existem os feijões especiais, com grãos grandes e coloridos. Estes feijões, podem apresentar perda de cor durante o processamento térmico, importante problema para a industrialização e comercialização. Ainda não foi possível elucidar a variação na sensibilidade ao processamento térmico durante a industrialização, que causa a perda de cor no grão cozido e deprecia sua qualidade física. Assim, o objetivo da pesquisa foi caracterizar e validar marcadores SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) para a característica de descoloração em variedades de feijões especiais. Para o sequenciamento e avaliação dos SNPs foram usados primeiramente 21 genótipos de feijão, sendo oito de origem Andina e 13 de origem Mesoamericana. Depois mais 20 genótipos de origem Andina foram plantados totalizando assim 41 genótipos (28 Andinos e 13 Mesoamericanos) na análise final. Os genótipos foram avaliados quanto ao polimorfismo de SNPs e desbotamento dos grãos após-cozimento, visando ampliar a base de materiais genéticos avaliados. Assim, sementes de 41 genótipos de feijões especiais foram semeadas em casa de vegetação para a multiplicação. Folhas trifoliadas jovens foram coletadas para extração de DNA, que foram usadas para o sequenciamento e alinhamento dos 21 genótipos, no intuito de encontrar os SNPs associados à perda de cor dos grãos. Sete regiões foram sequenciadas contendo SNPs-álvos, previamente identificados na literatura como associados à descoloração em germoplasma de feijão preto de origem Andina. Os grãos foram avaliados quanto ao parâmetro de diferença de cor (ΔE) antes e depois do cozimento, por método similar ao processo industrial para enlatamento de grão pré-cozido. Os resultados do sequenciamento revelaram quatro SNPs para as sete regiões avaliadas. Os valores de ΔE variaram entre 4,23 e 22,49 para os feijões Andinos (menor valor para Montcalm), e de 5,63 (BRS FP 403) a 9,35 (BRS Campeiro) para os Mesoamericanos. Somente para os feijões Andinos foram identificadas associações do SNP com os menores valores de ΔE . Para esses SNPs foram desenvolvidas sondas TaqMan, as quais foram avaliadas com uma amostragem ampliada de feijões caracterizados quanto ao ΔE . Dois com grande potencial para seleção indireta de genótipos de feijão associados a menores valores de ΔE , confirmados por meio de regressão linear simples (p -valor $\leq 0,01$ p -valor $\leq 0,01$) p -valor $\leq 0,01$ p -valor $\leq 0,01$). Esses SNPs serão incorporados na rotina da seleção assistida por marcadores junto ao programa de melhoramento genético de feijão para a seleção de genótipos de origem andina com menor descoloração de grãos no processamento térmico industrial.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L., marcadores moleculares, mudança de cor no cozimento, agroindústria.

¹Orientador: Prof. Dr. Manoel Soares Soares Júnior. Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás. Co-orientadoras: Dra. Rosana Pereira Vianello e Dra. Priscila Zaczuk Bassinello. Embrapa Arroz e Feijão.

ABSTRACT

SOUSA, A. R. de. **Assessment of SNPs associated with the decolorization of special beans for export and domestic consumption.** 2021. 81 f. Dissertation (Master in Agronomy: Crop Production) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2021.¹

The common bean has grains of different colors, shapes and sizes. There are special beans, with large, colorful beans. These beans may show color loss during thermal processing, an important problem for industrialization and commercialization. It has not yet been possible to elucidate the variation in sensitivity to thermal processing during industrialization, which causes color loss in the cooked grain and depreciates its physical quality. Thus, the objective of the research was to characterize and validate SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) markers for the discoloration characteristic in special bean varieties. For the sequencing and evaluation of the SNPs, 21 bean genotypes were used first, eight of Andean origin and 13 of Mesoamerican origin. Then another 20 genotypes of Andean origin were planted, thus totaling 41 genotypes (28 Andean and 13 Mesoamerican) in the final analysis. The genotypes were evaluated for polymorphism of SNPs and fading of post-cooking grains, aiming to expand the base of evaluated genetic materials. Thus, seeds of 41 special bean genotypes were sown in a greenhouse for multiplication. Young trifoliolate leaves were collected for DNA extraction, which were used for the sequencing and alignment of the 21 genotypes, in order to find the SNPs associated with grain color loss. Seven regions were sequenced containing target SNPs, previously identified in the literature as associated with discoloration in Andean black bean germplasm. The grains were evaluated for the color difference parameter (ΔE) before and after cooking, by a method similar to the industrial process for canning pre-cooked grain. The results of the sequencing revealed four SNPs for the seven regions evaluated. The ΔE values varied between 4.23 and 22.49 for Andean beans (lowest value for Montcalm), and from 5.63 (BRS FP 403) to 9.35 (BRS Campeiro) for Mesoamericans. Only for Andean beans, associations of the SNP with the lowest values of ΔE were identified. For these SNPs, TaqMan probes were developed, which were evaluated with an extended sampling of beans characterized in terms of ΔE . Two SNPs were identified with great potential for indirect selection of bean genotypes associated with lower values of ΔE , confirmed by simple linear regression (p -value ≤ 0.01). These SNPs will be incorporated into the marker-assisted selection routine within the bean breeding program for the selection of Andean genotypes with less grain discoloration in industrial thermal processing.

Key words: *Phaseolus vulgaris* L., molecular markers, color change in cooking, agribusiness.

¹Orientador: Prof. Dr. Manoel Soares Soares Júnior. Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás. Co-orientadoras: Dra. Rosana Pereira Vianello e Dra. Priscila Zaczuk Bassinello. Embrapa Arroz e Feijão.

1. INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) tem sua origem em dois principais centros: o andino e o mesoamericano. O pool genético do feijoeiro comum consiste nesses dois grandes centros geográficos de tipos selvagens, nos quais os grãos podem ser distinguidos pela sua morfologia, variação da faseolina e do tipo eletroforético de proteína da semente, e DNA mitocondrial (Mamidi et al., 2011, Almeida et al., 2020).

O feijão comum faz parte da dieta básica principalmente nos países em desenvolvimento. E este grão leguminoso tem grande importância nutricional, pois possui elevado teor de proteína, carboidratos e fibra alimentar, além de minerais (ferro e zinco), vitaminas do complexo B, compostos fenólicos e antocianinas, responsáveis por efeitos benéficos a saúde, como atividade anti-diabética, anti-inflamatória e de redução do risco de distúrbios carcinogênicos (Los et al., 2018; Carbas et al., 2020; Bento et al., 2021).

O tipo de feijão mais consumido no Brasil é de origem mesoamericana, que consiste de grãos pequenos que são da cor bege com listras marrons, marrom, rosinha e preto. Já os grãos andinos, que também são conhecidos como os grãos do tipo especial, apresentam grãos grandes e de cor vermelha, rosa, rajados e brancos (Ribeiro et al., 2014a). No Brasil existe uma tendência para o consumo quase que exclusivamente do feijão tipo “carioca” e do feijão preto. No entanto, os consumidores do mercado externo preferem os feijões do tipo especial (Brasil, 2018).

A diversificação do mercado com diferentes tipos de feijões, incluindo os de tipo especial, é uma alternativa para os consumidores do mercado interno, assim como o mercado externo é para os produtores de feijão do Brasil, já que a cadeia produtiva do feijão tem grande oscilação de preços em função de excesso ou escassez de safra (CONAB, 2018).

Entretanto, os feijões apresentam diferentes graus de perda de cor durante o cozimento, tanto a nível doméstico como industrial. As conservas de feijão, são produtos largamente consumidos em países da União Européia e EUA, que utilizam feijões do tipo especial. As cultivares que apresentam elevada perda de cor não são adequadas para este

tipo de produto industrializado, assim como para preparações culinárias, pois os consumidores não aceitam muito bem feijões com esse tipo de defeito (Pinto et al, 2016).

A perda de cor do feijão durante processos térmicos está ligada a uma região de QTL (*quantitative trait loci*), que confere características genótípicas por meio de um ou mais genes (Cichy et al., 2014). Existe uma variabilidade genética significativa na retenção de cor entre os genótipos de feijão preto para o enlatamento, pois nos cromossomos Pv05 e Pv11 existe um pequeno número de genes candidatos para seleção assistida por marcadores (Wright & Kelly, 2011). Embora já existam estudos de QTL para retenção de cor e qualidade em conservas de feijão preto (Wright & Kelly, 2011; Mendonza et al., 2014), marcadores moleculares para essas características ainda precisam ser desenvolvidos e integrados aos programas de melhoramento genético da cultura no Brasil. O processo de fenotipagem é mais caro do que o uso de marcadores moleculares, principalmente nas gerações iniciais quando se tem poucas sementes para realizar a análise.

Esta pesquisa teve por objetivo caracterizar e validar marcadores moleculares do tipo SNPs, previamente identificados como associados ao fenótipo de descoloração de grãos em cultivares e linhagens de feijões tipo especial, pertencente ao pool gênico Andino principalmente, no entanto genótipos de feijão do pool gênico Mesoamericano também foram avaliados, adaptadas às condições edafoclimáticas brasileiras, destinados à exportação e ao consumo interno.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ORIGEM E TIPOS DE FEIJOEIROS CULTIVADOS NO BRASIL

O feijoeiro comum é uma planta herbácea, que pertence à família *Fabaceae* compreende as plantas leguminosas, subfamília *Faboideae*, gênero *Phaseolus* e espécie *Phaseolus vulgaris* L. A planta possui caule; que pode ter crescimento ereto ou prostrado; as folhas são compostas por três folíolos ovais; as flores podem ser brancas, amarelas, azuis ou roxas, conforme a variedade; e o fruto, denominado vagem, quando está maduro e bem seco se abre liberando os grãos (deiscente) (Pinto, 2016).

Outras evidências indicam que o feijoeiro comum foi domesticado de forma independente em dois centros primários: 1) América Central e México e 2) ao sul dos Andes, além de um centro secundário, ao norte dos Andes. A múltipla domesticação nestes dois centros primários levou à formação de dois conjuntos gênicos principais, um mesoamericano e um andino, nos quais, forças evolutivas têm resultado em significativas mudanças morfológicas, fisiológicas e genéticas que podem ser melhores exploradas para o cultivo do feijão (Arteaga et al., 2019).

Entre as *pulses*, leguminosas secas com baixo conteúdo de óleo, *Phaseolus* é um gênero grande e diversificado, que compreende cerca de 70 espécies da América Central e do Norte. Cinco das quais foram domesticadas (*P. vulgaris*, *P. dumosus*, *P. coccineus*, *P. acutifolius*, *P. lunatus*), e algumas espécies adicionais mostram sinais de domesticação incipiente. De acordo com a distribuição geográfica, a maioria das espécies pertencentes ao gênero *Phaseolus* são consideradas de origem mesoamericana. Este grupo inclui quatro das cinco espécies domesticadas do gênero (*P. vulgaris*, *P. dumosus*, *P. coccineus*, *P. acutifolius*). Os parentes mais próximos de *P. vulgaris* são os genótipos Mesoamericanos das espécies *P. dumosus* e *P. coccineus*, e estas três espécies em conjunto são parcialmente entrecruzáveis. As outras espécies domesticadas (*P. lunatus* e *P. acutifolius*) são mais distintamente relacionadas (Bellucci et al., 2013).

Provas experimentais repetidas realçam a existência de dois grupos de genes selvagens diferentes e geneticamente divergentes entre as raças do feijoeiro comum mesoamericano e andino, que sofreram domesticação independentemente. O *pool* gênico andino é geralmente adaptado a altitudes relativamente mais elevadas e temperaturas mais baixas que o *pool* gênico Mesoamericano, que é adaptado a altitudes mais baixas e temperaturas mais elevadas (Ariani et al., 2016).

Com o uso de "Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados" ou- "Amplified Fragment Length Polymorphism" (AFLP), constatou-se de que o *pool* andino possuía uma base genética mais estreita e os feijoeiros são na maioria mais recentes (Raatz et al., 2019).

A atual distribuição do feijoeiro comum selvagem abrange uma grande área geográfica: do norte do México ao noroeste da Argentina (Bitocchi et al., 2012). O centro mesoamericano compreende desde o sudeste dos Estados Unidos da América (EUA) até o Panamá. As zonas principais são: México, Guatemala, Nicarágua, El Salvador, Honduras e Costa Rica, onde se encontram os tipos mais cultivados, como *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. coccineus* e *P. acutifolius*. O centro-sul andino compreende o sul do Peru até o noroeste da Argentina, sendo encontradas as espécies *P. vulgaris*, *P. lunatus* e *P. vulgaris var. aborigineus*. Enquanto, o centro-norte andino compreende a Colômbia, a Venezuela e o norte do Peru, e possui menos espécies que a região mesoamericana (MAPA, 2018).

As cultivares de feijoeiro comum do grupo mesoamericano apresentam grãos menores, como os do tipo carioca, mulatinho, pinto, preto, rosinha, roxinho e vermelho (Rodrigues, 2018). No Brasil, o cultivo de feijoeiros comuns mesoamericanos é predominante, e eles apresentam massa de 100 grãos em torno de 25 a 27 g (Blair et al., 2010). Os grãos carioca e preto corresponderam a 59,9% e a 14,7% da produção nacional de feijão, respectivamente, enquanto o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.)) constituiu 25,4% do total, esses valores correspondem a safra de 2017/2018 (CONAB, 2018).

Já os feijoeiros andinos apresentam massa de 100 grãos de média (25 a 40 g) a grande (> 40 g) (Blair et al., 2010). Neste grupo, encontram-se cultivares com grãos de tegumento branco, vermelho, creme, amarelo, preto e de outras cores, com ausência ou presença de estrias ou rajadas de outras cores, conhecidos como feijões do tipo especial. Esses grãos têm grande aceitação no mercado internacional (Thung et al., 2009), mas a produção

no Brasil ainda é muito limitada (Ribeiro et al., 2014a). Entre estas cultivares, destacam-se as de cor branca, cramberry, dark red kidney, jalo, light red kidney, rajado e sugar bean (Rodrigues, 2018).

A identificação de novas cultivares de feijões especiais com alta produtividade representa vantagens mercadológicas, no que diz respeito a exportação para o mercado externo e alternativas para os consumidores do mercado interno, melhorando assim os preços de venda para os produtores de feijão do Brasil (Ribeiro, 2014a). Aproximadamente oito cultivares de feijões especiais disponibilizadas no mercado brasileiro podem ser plantadas desde os estados do Nordeste até o sul do país e cultivadas em primeira, segunda ou terceira safra

A introdução do feijoeiro no Brasil, possivelmente ocorreu por três rotas distintas. A primeira, envolvendo genótipos da América Central, teve origem no México, seguindo para as ilhas do Caribe, Colômbia, Venezuela e, mais tarde, para o Brasil. Por esta rota provavelmente foram introduzidos os feijões atualmente predominantes no Brasil, mesoamericanos, que são pequenos, pretos, marrons e mulatinhos. A segunda rota teve origem nos Andes e possibilitou a entrada de plantas com grãos grandes, contendo a faseolina T, que é a proteína eletroforética da semente do feijoeiro, como os tipos: jalo, pintado e outros. A terceira rota ocorreu por intermédio dos imigrantes, após a descoberta da América. Como é o caso do feijão rajado, muito consumido no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, devido à colonização por imigrantes italianos e alemães (CONAB, 2018).

2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E CADEIA PRODUTIVA DO FEIJÃO

Em várias partes do mundo o feijão é uma das leguminosas consideradas mais significativas e de importância socioeconômica. Pois, muitas pessoas, principalmente nos países subdesenvolvidos das regiões tropicais e subtropicais do planeta, dependem deste grão como alimento básico fundamental. Por outro lado, os países desenvolvidos, como os EUA, Canadá e muitos países da Europa, dependem do feijão como fonte de renda, e o consumo é diferenciado, sendo mais consumidos os grãos do tipo especial (Pinto et al, 2016).

O feijoeiro comum também é conhecido como umas das culturas de leguminosas alimentares mais importante para consumo humano direto, sendo cultivado em todo o mundo devido ao elevado valor nutricional dos grãos, boa fonte de proteínas, calorias, fibra alimentar e micronutrientes (Raatz et al., 2019).

Segundo a Food and Agricultural Organization (FAO), os seis principais países produtores de feijão são responsáveis por cerca de 61% da produção mundial, e são: Brasil, Índia, Myanmar, EUA e México (MAPA, 2018). O comércio mundial deste grão movimentou em 2018 cerca de 26,5 milhões de toneladas, e este mercado é bastante limitado em função do consumo ser relativamente inelástico, já que se trata de um produto para consumo interno e poucos países o produzem visando o comércio externo. O Brasil se destaca como um dos maiores produtores e consumidores de feijão, com participação superior a 90% na produção e no consumo em relação aos países do Mercosul (CONAB, 2018).

No Brasil, de 60% a 80% do feijão produzido é do tipo “Carioca”, que apesar de ser a preferência nacional, ainda não tem boa aceitação no mercado externo. Por esse motivo há uma limitação na exportação desse tipo de grão. No entanto, o país tem exportado em quantidades pequenas feijão-caupi de classe comercial branca, tradicionalmente conhecido como feijão-de-corda e geralmente cultivado nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, para o mercado asiático, sendo a Índia o principal importador (MAPA, 2018).

Neste contexto, seria importante desenvolver novas variedades que tenham o padrão de qualidade que atenda às necessidades de diferentes grupos da população e às demandas do mercado internacional, para permitir agregar valor e estabilizar a cadeia produtiva do feijão. E em paralelo, o aprimoramento das características de campo, valor nutricional e funcional de grãos diferenciados é fundamental, com foco na redução de custos e aumento de rendimento, além de observar as características das regiões de cultivo, e resgatar padrões alimentares regionais, que valorizem a produção e o consumo de feijões locais ou regionais (CONAB, 2018).

Outro desafio a ser equacionado na cadeia produtiva do feijão, é que quando ocorre excesso de oferta, não há como escoá-la no mercado e a mercadoria fica escurecendo e endurecendo nos armazéns, perdendo qualidade, onerando os custos e sofrendo grandes

perdas na venda; ou ainda quando ocorre quebra de safra e o produto fica escasso no mercado, existe pouca ou nenhuma alternativa de substituição. O mercado de feijão é muito dinâmico e por esse motivo apresenta expressiva oscilação de preços e, frequentemente, quem planta mais cedo obtém melhor cotação na comercialização do produto. Portanto, o ideal para o produtor é fugir da concentração da colheita, pois o excesso de oferta influencia negativamente nos preços. O acesso ao mercado internacional representa um salto importante nas estratégias de produção e comercialização. Produzir para o mercado externo significa alcançar níveis superiores de qualidade dos produtos, tendo em vista as exigentes condições que prevalecem no comércio internacional, além da competitividade nos custos de produção. Outros benefícios que provêm da exportação derivam da diversificação dos mercados, viabilizando maiores volumes de produção, incorporação de novas tecnologias produtivas e aperfeiçoamento da qualificação da mão-de-obra. O Brasil apresenta boas vantagens competitivas, além da boa produtividade, e são três colheitas anuais contra uma dos demais países, o que nos permite antecipar informações fundamentais para o plantio da cultura do feijão (CONAB, 2018).

2.3 ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DO FEIJOEIRO

2.3.1 Época de plantio, cultivares e manejo da cultura

A cultura do feijão é considerada de ciclo curto e, por isso, apresenta uma vantagem para o produtor, que consegue adequar o seu plantio dentro de uma janela menor, sem ter que abrir mão da produção de outros grãos ainda no mesmo ano-safra. Nesse cenário, o Brasil possui três épocas distintas de plantio, favorecendo assim uma oferta constante do produto ao longo do ano. Dessa forma, tem-se o feijão de primeira safra, semeado entre agosto e dezembro, o de segunda safra cultivado entre janeiro e abril e o de terceira safra semeado de maio a julho. No ano de 2019/20, o feijão apresentou uma produção de 3,1 milhões de toneladas, sendo 1,92 milhão de toneladas de feijão comum cores, 516, 8 mil toneladas feijão comum preto e 686, 7 mil toneladas de feijão caupi ou macaçar. Na Região Centro-Oeste foram semeadas cerca de 116,9 mil ha com o feijão-comum cores no período de 2019/20, distribuídos entre os estados de Mato Grosso, Goiás e Distrito Federal. A expectativa de produção é na ordem de 310,9 mil toneladas, superando o ano anterior. A perspectiva para a produção é boa, tanto pelo aumento de área plantada,

bem como as melhores condições climáticas, favorecendo o desenvolvimento da cultura, que é manejada sob irrigação (CONAB, 2020).

Cultivado por pequenos e grandes produtores, em diversificados sistemas de produção e em todas as regiões brasileiras, o feijoeiro reveste-se de grande importância econômica e social. A cultura do feijoeiro tem uma ampla adaptação edafoclimática o que permite seu cultivo, durante todo o ano, em quase todos os estados da federação, possibilitando constante oferta do produto no mercado. Por ser uma espécie com ciclo anual e desenvolvimento precoce, o feijão é mais sensível às variações ambientais. Assim, alterações nas condições climáticas podem provocar mudanças acentuadas na produtividade de grãos (Oliveira et al., 2014).

Os feijoeiros desenvolvem-se bem em uma faixa de temperatura de 18 a 30 °C, médias noturnas e diurnas, respectivamente, mas fora destes limites ocorrem danos à produção. Os efeitos das altas temperaturas sobre a queda das flores e abortamento das vagens são bem conhecidos. Portanto, a produção de feijão está muito relacionada aos fatores climáticos. O que mais influencia o desenvolvimento da planta é a temperatura, por ter participação no florescimento e na frutificação do feijoeiro. Entretanto, a precipitação pluvial é de extrema importância 15 dias antes da floração e no estágio inicial de formação de vagens, além da radiação solar (Mantovani et al., 2012).

A partir da década de 1980, o feijoeiro passou a ser cultivado também na época de inverno sob irrigação, atraindo médios e grandes produtores. Neste sentido, o agricultor é estimulado a utilizar maiores níveis tecnológicos, obtendo produtividades de três a cinco vezes superiores às obtidas em sequeiro, devido a ser uma cultura altamente responsiva à irrigação e altamente eficiente no uso da água, chegando a produzir em torno de 10 kg ha⁻¹ mm (Mantovani et al., 2012).

Novas variedades que foram lançadas, como o Nuance, do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), podem significar um salto em termos de adequação ao mercado mundial. Pois, feijões especiais têm boa demanda no mercado internacional, especialmente os tipos brancos, vermelhos e rajados (tegumento creme com rajadas vermelhas) (Ribeiro et al., 2014b). A cultivar Nuance é do tipo Cranberry, plantado nos EUA, Canadá e Argentina, com consumo importante na Europa e Ásia. Já o tipo dark red kidney, como a cultivar BRS Embaixador da Embrapa, vem encontrando bom

desenvolvimento no Paraná, Rio Grande do Sul e, mais recentemente, sob irrigação, no noroeste de Minas Gerais (Thung et. al., 2009).

Para a cultura do feijão é recomendado fazer a calagem para elevar a saturação de bases a 50% em sistema de sequeiro e 60 % para sistemas irrigados, e utilizar calcário dolomítico, que complemente o teor de magnésio necessário no solo. A recomendação de adubação para o feijoeiro por hectare é de 20 kg de nitrogênio, de 30 a 60 kg de fósforo e de 40 a 60 kg de potássio na semeadura, e de 40 kg de nitrogênio em cobertura (EMBRAPA, 2004).

Em geral, devido à baixa fertilidade dos solos brasileiros onde se conduzem plantios de feijão, a adubação e a irrigação exercem papéis importantes, uma vez que contribuem para o desenvolvimento da cultura e aumento da produtividade. Embora, seja necessário o manejo com o uso eficiente de adubos, para atingir a produtividade esperada e ainda reduzir o custo de produção (Guimarães et al.,2011).

A competição das plantas daninhas com o feijoeiro pode constituir um dos principais fatores da baixa produtividade para a cultura do feijão. Pois, os feijoeiros apresentam limitada capacidade competitiva com as plantas daninhas, e dependendo do grau de interferência imposto pela interação existente entre a comunidade infestante e a cultura, dos fatores ambientais e do período de convivência, as perdas de produtividade podem variar entre 35% e 67%. Comparando os aspectos fisiológicos da cultura de feijão e das plantas daninhas, as plantas daninhas são mais eficientes na utilização da radiação por unidade de área foliar e na utilização da água, ou seja, com menor quantidade de recursos se sobressaem sobre a cultura do feijão (Tavares et al., 2013).

Na cultura do feijão, a ocorrência de pragas e doenças, muitas delas transmitidas também pelas sementes, é alta. As doenças mais graves e constantes é o mosaico comum (moléstia causado por vírus), a podridão bacteriana e a antracnose. Produtores que são acostumados a usar as suas próprias sementes colhidas na lavoura, quase sempre infectada por essas doenças, inconscientemente, espalham os patógenos de uma geração a outra e de uma localidade a outra. A forma de plantio do feijoeiro e os cuidados com a planta durante seu desenvolvimento interferem diretamente na sua produção final. Nas lavouras de feijão, a ocorrência de ataques de pragas e doenças é constante, também é um dos fatores que geram baixo rendimento e maior instabilidade na

produção. Muitos dos produtores não têm um cuidado especial e correto no manejo dessas pragas, acarretando em uma dificuldade maior em manter a cultura, e conseqüentemente optando por outras culturas. O método mais usado para o controle de pragas e doenças é a utilização dos defensivos químicos, com a necessidade de pulverizar diversas vezes (Nunes et al., 2017).

A propagação das principais pragas nas lavouras de feijão ocorre desde a sua sementeira até quando os grãos estão secos nas vagens, causando deficiências durante todo seu processo de desenvolvimento. As doenças fúngicas, bacterianas, virais e os nematóides variam de acordo com a região, época de plantio, variedade da semente e condições climáticas, podendo manifestar-se de acordo com as suas condições de desenvolvimento. O cultivo sucessivo do feijão também acarreta grandes problemas em sua produção, favorecendo o desenvolvimento dessas pragas, sendo importante o produtor realizar a rotação de culturas, e assim também melhorar a preservação dos nutrientes do solo (Nunes et al., 2017).

2.3.2. Classificação e qualidade do feijão

A qualidade do feijão segue um conjunto de normas e procedimentos do Ministério da Agricultura para o enquadramento do produto em grupo, classe e tipo (Knabben, 2012). No Brasil, o feijão é classificado em dois grupos: I e II. O grupo se refere à espécie botânica, podendo o feijão ser enquadrado no Grupo I, quando pertencente à espécie *Phaseolus vulgaris* L., ou no grupo II, que se encontra o feijão-caupi (feijão-de-corda ou feijão-macaçar), que pertence à espécie *Vigna unguiculata* (L) Walp. Em ambos grupos, a classe identifica o feijão de acordo com a coloração do tegumento (preto, branco, cores ou misturado), independente do grupo. A classe branco é subdividida em subclasses como brancão, branco e fradinho. Já a classe cores é subdividida em subclasses como carioca, mulato, canapu, corujinha, azulão, manteiga, verde e vinagre. Enquanto, o tipo está relacionado às características qualitativas do produto, sendo definido de acordo com os limites máximos de tolerância de defeitos encontrados na amostra, tais como: quebrado, mofado, queimado, esmagado, danificado por insetos (carunchado), brotado, amassado, manchado, descolorido e danificado por outras causas (Belan et al., 2015).

Os defeitos do feijão podem ser classificados em graves ou leves. Os defeitos graves comprometem a aparência, conservação e qualidade do grão, fazendo com que os consumidores evitem ou diminuam seu consumo. Os defeitos graves são grãos ardidos, carunchados, mofados e atacados por lagartas das vagens, germinados e com impurezas e matérias estranhas. Os defeitos leves, por outro lado, não comprometem tanto a aparência, conservação e qualidade dos grãos que podem ser consumidos sem prejuízos. Os defeitos leves são grãos amassados, danificados, imaturos, quebrados e partidos (bandinhas) (Knabben, 2012).

A qualidade dos grãos de feijão pode ser julgada pelos aspectos tecnológicos de três formas: comercial, culinária e nutricional. A qualidade comercial dos grãos requerida refere-se ao tamanho e à coloração, pois são os atributos primeiramente avaliados pelos consumidores, apresentando papel decisivo na aceitação do produto (Embrapa, 2012). As características culinárias desejáveis pelos consumidores são a rápida hidratação, baixo tempo de cozimento, produção de um caldo espesso, bom sabor e textura, grãos um pouco rachados, casca fina e boa manutenção de cor. A integridade dos grãos depois de cozidos é importante para a aplicação industrial. E em relação a qualidade nutricional, a proteína do feijão é de boa qualidade, há várias cultivares de feijão, disponíveis no Brasil, que apresentam teores de aminoácidos essenciais superiores ao padrão considerado adequado pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), para suprir as necessidades diárias de um indivíduo adulto. Além disso, o feijão é de maior digestibilidade protéica quando comparado à soja, apesar de possuir cerca da metade do teor de proteína (OLIVEIRA, et al., 2008).

2.4 PROCESSAMENTO DO FEIJÃO

No comércio varejista nacional, é possível encontrar feijão pré-cozido enlatado ou em embalagem asséptica a vácuo, com tempero tradicional ou adicionado de carnes, como feijoada. Há também o feijão liofilizado (desidratado a vácuo), e feijão processado por extrusão e por cozimento e desidratado em estufas. Duas grandes vantagens desses métodos são o prazo de validade do produto, que se estende por mais tempo, e a praticidade no preparo. Em outros países da América, por exemplo, o feijão pode ser consumido de

outras formas industrializadas, conforme os hábitos culturais da região (EMBRAPA, 2012; Belan et al., 2015).

2.4.1 Cocção do feijão

O feijão comum varia muito em relação às suas características e nas preferências dos consumidores. Estas baseiam-se principalmente em atributos físicos; cor, forma e tamanho do grão. A cor do revestimento dos grãos é o atributo mais importante na comercialização, porque os consumidores preferem feijões que mantenham a sua cor após o cozimento (Siqueira et al., 2014).

O escurecimento e o endurecimento durante o armazenamento também afetam diretamente a comercialização e consumo dos feijões. Este fenômeno, denominado *Hard-to-Cook* ocorre em até seis meses de armazenamento, alterando a qualidade culinária dos grãos, que requerem muito tempo de cozimento para amolecer, chegando algumas cultivares até a não amolecer. Este fenômeno é bem conhecido pelos comerciantes e consumidores no Brasil, onde o feijão carioca vale mais quanto mais claro for seu tegumento, cor associada à menor tempo de cocção (Alves et al., 2021). Embora o feijão seja rico em nutrientes que tornam o seu consumo vantajoso, é frequentemente ignorado e substituído por alimentos menos nutritivos, de cozedura mais rápida ou pré-cozidos. Esta mudança nos hábitos alimentares da população exige uma estratégia séria, para reduzir o tempo de cozimento e, ou introduzir cultivares de feijão de cozedura rápida (Wiesinger et al., 2016).

A qualidade de grãos de feijão pode ser determinada pela aceitabilidade ao consumo, que está relacionada principalmente às características tecnológicas de absorção de água antes e após o cozimento, tempo de cozimento, porcentagem de sólidos solúveis no caldo, cor do tegumento e do caldo. Essas características podem ser alteradas durante o armazenamento em condições inapropriadas ou mesmo pela presença de patógenos e insetos-praga (Coelho et al., 2009).

Rápida absorção de água e tempo reduzido de cocção do feijão conferem qualidade ao cozimento, e são características importantes para a aceitação de uma cultivar pelos consumidores. A qualidade tecnológica do feijão comum compreende tamanho, forma, grau de planeza, cor, absorção de água antes de cozinhar, e tempo de cozedura do

feijão. Considerando estas novas tendências de mercado, programas de melhoramento de feijões deveriam estabelecer padrões apropriados para estas características (Arns et al., 2018).

Cozinhar é o método mais comum e necessário para remover os fatores antinutricionais e para assegurar uma qualidade sensorial aceitável do feijão. Cozinhar também causa algumas alterações físico-químicas nos grãos, incluindo gelatinização do amido, desnaturação de proteínas, solubilização de alguns dos polissacarídeos (Wani et al., 2017). Os fatores que afetam a qualidade culinária das leguminosas incluem: a cultivar, as características e a composição dos grãos, o local e o ambiente de cultivo. As propriedades físicas, tais como tamanho e massa, bem como as características morfológicas dos grãos e cotilédones, influenciam a cozedura e a qualidade dos grãos de feijão (Wani et al., 2017).

O tratamento térmico melhora a qualidade protéica, através da destruição ou inativação de fatores antinutricionais das leguminosas. A cozedura resulta em significativas reduções do ácido fítico e taninos em leguminosas. Ao longo do tempo de cocção, o valor nutritivo pode ser reduzido, como os níveis de alguns aminoácidos essenciais, que são acentuadamente reduzidos (Wang et al., 2010).

O cozimento também aumenta a biodisponibilidade dos nutrientes. O principal método de cozedura convencional de grãos leguminosos secos ou encharcados é ferver em água numa panela aberta durante um período prolongado de uma a duas horas, ou sob pressão durante 10 a 15 minutos. A cozedura sob pressão tem as vantagens de ser mais rápida e requer menos energia do que a cocção em panela aberta, pois a distribuição do calor é muito mais uniforme, profunda e rápida (Guzel & Sayar, 2012). O processamento térmico permite o adequado consumo do feijão, melhorando as características sensoriais, a digestão e a absorção de nutrientes. O cozimento também resulta em substanciais alterações na capacidade antioxidante dos grãos (Cavalcante et al., 2017).

2.4.2. Conserva de feijão

Devido à necessidade de alternativas mais adequadas para satisfazer as exigências dos consumidores de feijão no Brasil e em outros países, e para acrescentar valor aos alimentos através de processamento industrial e ofertar alimentos semi-preparados de alta qualidade nutricional, se faz necessário reduzir os tempos de cozedura dos grãos. Os feijões pré-processados ou processados podem trazer benefícios, como agregação de valor e maior rentabilidade para os agricultores e indústrias de processamento de alimentos. Diferentes produtos de feijões, tais como desidratados, enlatados, flocos, pré-cozidos, preparados para microondas, congelados e refrigerados, são muito procurados e podem ser opções para os consumidores (Schoeninger, Coelho & Bassinello, 2017).

Uma das principais formas de feijão processado são as conservas (prontas para o consumo), um mercado muito comum e de grande aceitação nos países desenvolvidos de toda a Europa e América do Norte. As conservas de feijão são uma alternativa conveniente no mercado alimentar, uma vez que são mais fáceis de ser preparadas. Com o aumento do número de profissionais, exigências sociais/financeiras das famílias e a redução da quantidade de tempo disponível para cozinhar, as escolhas alimentares se tornaram cada vez mais baseadas no custo, sabor, conveniência, qualidade e tempo de cozedura. Neste tipo de processamento, os grãos secos normalmente são preparados por operações de hidratação, branqueamento em água quente, enchimento da embalagem (latas, vidros ou plásticos autoclaváveis), com adição de salmoura e de outros componentes, tais como molho de tomate, carne de porco ou aditivos de sabor, seguido de fechamento hermético e cozimento, por processamento térmico de esterilização (apertização) (Schoeninger, Coelho & Bassinello, 2017).

Os feijões comuns são geralmente preparados por indústrias de alimentos enlatados, e o produto geralmente é consumido com algum tipo de molho ou como uma pasta de purê com um cereal ou tubérculo (Rocha-Guzmán et al., 2013). Produtos de feijão enlatados tais como o feijão frito, sopas e feijões cozidos, também são formas comuns de venda e consumo. A qualidade das conservas é uma característica complexa e está associada com características como a hidratação, palatabilidade e preferências do consumidor (Alemu, 2018). A cor é a primeira característica a ser percebida pelo consumidor, sendo utilizada como indicador da aceitação ou rejeição de feijão cru e cozido.

A cor representa uma propriedade física fundamental de qualquer alimento, uma vez que tem sido amplamente demonstrada sua correlação com outros indicadores físicos, químicos e sensoriais da qualidade do produto. Portanto, a retenção da cor é um componente importante da qualidade dos feijões coloridos utilizados para a elaboração das conservas (Mendoza et al., 2014).

Os feijões possuem atividade antioxidante, que está correlacionada com a cor da semente, sugerindo que a mesma está relacionada indiretamente com genótipos de feijão preto ou de outras cores, e com níveis mais elevados de compostos promotores de saúde. As antocianinas são solúveis em água e lixiviam-se facilmente das sementes durante a imersão e o processamento térmico. A lixiviação de antocianinas influencia a aceitabilidade dos consumidores de produtos de feijão preto em conserva. Nos EUA uma grande porcentagem de feijão preto é consumida na forma processada termicamente em latas e, o sucesso da aceitação de uma cultivar, em última análise, está ligado à sua capacidade de manter sua cor após o cozimento (Mendonza et al., 2014).

Já na África do Sul, as conservas de feijão branco são tradicionalmente enlatadas em molho de tomate. Mais de 80% dos feijões brancos produzidos são utilizados pela indústria processadora, onde são embebidos, cozinhados e enlatados com molho de tomate para tornar o feijão palatável, inativar anti-nutrientes termolábeis, e permitir a digestão e assimilação de proteínas e amido (De Lange & Labuschagne, 2000).

A indústria de conservas procura feijões que se expandem rápida e uniformemente na embalagem durante o processamento, que não deixem muitos sólidos no fundo do recipiente, precisam ter pesos e textura drenados aceitáveis após cozinhar, além de cozinhar de forma rápida e uniforme. A taxa de absorção de água afeta a capacidade de inchaço da semente, o que afeta o número de latas de feijão que podem ser produzidas a partir do produto bruto, conhecido como rendimento. Os consumidores estão mais conscientes da qualidade do feijão, tais como cor, aparência geral e firmeza. Portanto, a qualidade dos feijões enlatados não é determinada apenas pelo processo de apertização, mas também pela genética da matéria-prima, pois os feijões secos utilizados para processamento influenciam a composição química e características estruturais e biológicas (Mendoza et al., 2014).

Como opção mais conveniente, muitos consumidores compram as conservas de feijões. Estas são cozidas e seguras para comer sem processamento adicional, e são mais acessíveis ao consumidor moderno com tempo limitado para a preparação de alimentos. Contudo, há algumas limitações, que incluem a falta de prevalência em países em desenvolvimento, devido seu custo adicional e percepções de saúde negativas em relação ao feijão seco, que podem fazer com que o seu consumo seja menor. A conserva de feijão oferece uma solução para o longo tempo de cozimento, assim como o feijão de cozedura rápida, que também é valioso para consumidores que compram feijão seco. Além disso, estes genótipos poderiam beneficiar a indústria, reduzindo o tempo necessário para preparo do feijão em conserva, resultando em poupança de energia. A compreensão destes aspectos permitirá aos produtores de feijão satisfazer melhor as necessidades dos consumidores e da indústria conserveira, através do desenvolvimento de variedades que sejam convenientes e rentáveis para preparação, tanto na cozinha como na lata (Bassett, Dolan & Cichy, 2020).

2.5 MELHORAMENTO GENÉTICO DO FEIJÃO E MARCADORES MOLECULARES

O melhoramento genético de feijões especiais no Brasil tem sido incipiente em comparação com o do feijão comum ou do tipo carioca (Ribeiro et al., 2014b). O feijoeiro possui dois grandes grupos genéticos: o *pool* genético da América Central, que se estende do México à América Central e Colômbia, e o *pool* genético andino localizado no Peru, Chile, Bolívia e Argentina (Almeida et al., 2020). Estes dois *pools* genéticos têm estruturas genéticas selvagens e domesticadas de forma paralela, portanto, o *pool* gênico mesoamericano possui uma grande diversidade em relação ao andino (Bitocchi et al., 2012). A divisão do *pool* genético é baseada na variação da proteína *faseolina* da semente, morfologia, isoenzimas e diferenças de DNA mitocondrial (Mamidi et al., 2011).

Os feijoeiros de ambos *pools* genéticos são separados em diferentes classes de mercado que são identificados com base no hábito de crescimento, características fenológicas, tamanho, forma, cor (vermelho, preto, branco, amarelo e roxo), conservas e qualidades culinárias das sementes (Al-Dossary, 2016). Cada *pool* genético possui raças que são caracterizadas com base na variação da morfologia de plantas e sementes e regimes de adaptação (Singh, Gepts & Debouch, 1991; Beebe et al., 2014).

No feijão, já existem marcadores moleculares para numerosos genes de resistência a doenças que foram integrados em programas de melhoramento. Por exemplo, para a doença bacteriana comum, importante fator redutor de rendimento do feijoeiro, duas regiões amplificadas foram caracterizadas pela sequência (SCARs) BC420 e SU91, ligadas a dois QTLs resistentes à doença bacteriana comum (Miklas et al., 2006). Através do desenvolvimento de um marcador genético candidato e seleção de genes específicos, em outro estudo se determinaram nove e seis marcadores polimórficos nos loci BC420 e SU91-QTL, respectivamente (Shi et al., 2012).

Cultivares que retêm mais cor, antioxidantes e a aparência do feijão após o cozimento possuem atributos importantes para a indústria processadora e para os consumidores. No caso do feijão preto principalmente, essas características são mais exigidas pelos consumidores (Cichy et al., 2014). No entanto, os polifenóis, pigmentos de antocianina no revestimento de sementes de feijão preto, são altamente solúveis em água e são lixiviados durante o processamento térmico (Wright & Kelly, 2011).

Assim, grãos de feijão preto ótimos para uso comercial não só devem reter mais cor, mas ter capacidade de se expandir rápida e uniformemente durante a imersão, e permanecerem firmes durante o processamento. Pois, a produção de conservas inclui imersão em água, e cocção dos grãos seguindo vários protocolos e, em seguida, transferi-los para latas. Além disso, o processamento térmico é uma forma tradicional de preservar alimentos e garantir sua segurança e armazenamento. Normalmente, os feijões são processados termicamente por fervura, fervura sob pressão ou vapor antes do consumo (Al-Dossary, 2016).

A retenção de cor de feijão preto não é afetada apenas pelo processo utilizado nas conservas e nas preparações culinárias, mas também por sua composição genética. Existe uma variabilidade genética significativa para a retenção de cor de feijão preto após o enlatamento (Wright & Kelly, 2011). Um estudo indicou que o traço de retenção de cor em feijão preto é função de QTLs para concentração de antocianinas nas sementes após o enlatamento do produto, que se localizam no cromossomo Pv05 (Cichy et al., 2014).

Para esta característica, um pequeno número de genes candidatos para seleção assistida por marcadores (MAS) no cromossomo Pv05 e em Pv11 foram determinados. De fato, há uma variabilidade genética significativa na retenção de cor entre os genótipos de

feijão preto para o enlatamento (Wright & Kelly, 2011). Portanto, a boa compreensão das diferenças genéticas de características de qualidade de conservas de várias classes de mercado de feijão preto ajudará a melhorar o processo de produção e comercialização (Al-Dossary, 2016).

Existe um protocolo de enlatamento em pequena escala, que é o método padrão usado para identificar genótipos com qualidade aceitável para conservas, que possuem a característica de reter a cor após o tratamento térmico. Entretanto, este método além de equipamento especializado, requer pelo menos 200 g de sementes por genótipo. O que é pouco viável para materiais de geração precoce, nem é acessível a todos os genótipos de um banco de germoplasma. Enquanto, os marcadores moleculares como ferramenta são amplamente utilizados no melhoramento de plantas e, quando comparados com o melhoramento genético tradicional, reduzem o tempo e o esforço. Os marcadores moleculares ainda precisam ser desenvolvidos para o desbotamento após a esterilização das conservas ou cozimento tradicional, e integrados aos programas de melhoramento de feijão (Al-Dossary, 2016).

Os marcadores moleculares surgiram devido à necessidade da detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA. Marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente. Em contraste com caracteres morfológicos, os marcadores moleculares exibem neutralidade fenotípica, geralmente são herdados de maneira codominante, com efeito equivalente na determinação das características dos descendentes, raramente exibem interações epistática (um gene exerce ação inibitória sobre outro), ou pleiotrópicas, podendo ser detectados tanto em tecidos jovens como em adultos (Milach, 1998a; 1998b).

Os marcadores de DNA são independentes das condições ambientais e mostram alto nível de polimorfismo, são muito abundantes, possibilitando assim uma descrição mais detalhada da estrutura genética de populações. Marcadores moleculares são definidos como um segmento específico de DNA representativo das diferenças ao nível do genoma que permitem fazer inferências diretas sobre a diversidade genética e inter-relações entre os organismos ao nível do DNA (Turchetto-Zolet et al., 2017).

A aplicação de marcadores moleculares na detecção da variabilidade genética vem sendo aplicada, tanto em estudos genéticos como em programas de melhoramento

genético (EMBRAPA, 2000). O uso de marcadores moleculares permite que a seleção e novos cruzamentos sejam realizados em uma mesma geração, o que aumenta consideravelmente a eficiência do programa de melhoramento. E eles podem ser usados ainda que não tenham sido mapeados, ou seja, associados a um gene, a uma região cromossômica ou a um fenótipo, desde que possam ser seguidos em gerações subseqüentes, comprovando sua natureza genética (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O advento de técnicas baseadas em PCR (“Reação em Cadeia pela Polimerase” - “Polymerase Chain Reaction”) permitiu a opção do uso de marcadores moleculares. A técnica foi desenvolvida em meados da década de 1980 e alcançou uso disseminado e extenso em diversas áreas de biologia de forma rápida. PCR é uma técnica de considerável poder, usada para amplificar pequenas sequências específicas de nucleotídeos em quantidades acessíveis à análise, a partir de uma ínfima quantidade de DNA. Baseia-se na síntese enzimática *in vitro* de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase e *primers* específicos ou não. Tais *primers* delimitam a sequência de DNA de fita dupla a ser amplificada, cujos resultados são milhões de cópias idênticas (Mullis & Faloona, 1987; White, Arnheim & Erlich, 1989).

A disponibilidade de marcadores moleculares tem possibilitado estudos de genética quantitativa, tais como a determinação do número de genes afetando um caráter, a localização e o percentual da variância explicada por tais genes, o tipo de ação gênica associada, à importância da epistasia e o efeito ambiental em cada gene. Para características quantitativas, vários marcadores estão frequentemente envolvidos. A herança quantitativa para o melhoramento clássico tem o mesmo significado de QTLs (*quantitative trait loci*). Seu controle é condicionado por vários genes, e o fenótipo dos indivíduos é definido em termos de variâncias (EMBRAPA, 2003). QTLs são regiões do genoma associadas a fenótipos com distribuição contínua, como por exemplo altura e peso de plantas e de animais; produção de grãos; teor de óleo, entre outras. Um QTL é chamado de locus, podendo conter vários genes. Uma das grandes dificuldades do mapeamento de QTLs é determinar a posição dos loci identificados e a proporção do efeito de cada um. Além da posição e do número de loci é possível identificar o tipo de herança dos loci, classificando-os como aditivos, epistáticos, recessivos ou dominantes (EMBRAPA, 2003).

Um dos marcadores moleculares mais abundantes nos genomas são os *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP). Os SNPs são mutações de ponto, inserções ou deleções em regiões do genoma, e consistem em alterações de uma única base entre fragmentos homólogos de DNA, além destas pequenas inserções ou deleções, elas podem ocorrer tanto em regiões codificadoras como em não codificadoras dos genomas. Em regiões codificadoras, quando resultam em uma substituição de aminoácidos na sequência protéica, são denominados não sinônimos. As mutações não sinônimas resultam na alteração da composição de aminoácidos, ausência ou modificações do produto proteico. As mutações sinônimas não alteram o aminoácido traduzido (Turchetto-Zolet et al., 2017).

Os marcadores SNP tem como base as alterações mais elementares da molécula de DNA, ou seja, mutações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas (Adenina, Citosina, Timina e Guanina). As mutações mais comuns são as transições, onde ocorrem trocas de uma purina por outra purina (A / G) ou de uma pirimidina por outra pirimidina (C / T). Normalmente, os marcadores SNP são bi-alélicos, ou seja, geralmente são encontradas apenas duas variantes em uma espécie, por exemplo: um alelo corresponde a um par de bases A/T e o outro a um G/C. Os SNPs podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória, porém, na maior parte das vezes são encontrados em espaços intergênicos, sem função determinada (Caetano, 2009).

SNPs em regiões não codificadoras são chamados de SNPs não codificantes (ncSNPs), e os ncSNPs localizados dentro de íntrons são chamados de SNP sincrônicos. Já os SNPs encontrados em regiões codificadoras são chamados de SNPs codificadores (cSNPs), como por exemplo, em éxons (SNPsexônicos). Qualquer SNP em um éxon de um gene que pode ter impacto sobre a função da proteína codificada é chamado de SNP candidato, pelo fato de poder estar associado a alguma característica fenotípica (Turchetto-Zolet et al., 2017).

Os marcadores moleculares são valiosos no apoio ao germoplasma de feijão comum por meio da coleta de impressões digitais e da caracterização da diversidade genética. Diferentes tipos de marcadores foram utilizados em vários estudos genéticos, os marcadores do tipo SNPs por exemplo, o que tem demonstrado a sua utilidade em estudos de genética. Os SNPs são diferenças na sequência do DNA de apenas um nucleótido e geralmente bi-alélico. São o tipo mais comum de polimorfismo, e os SNPs são distribuídos

por todo o genoma. A descoberta do SNP requer geralmente uma extensa sequenciação de DNA, que se tornou disponível através de tecnologias de sequenciação da próxima geração (NGS) (alterável a plataformas automatizadas de alto rendimento). Os marcadores de SNP são úteis para estudos genéticos porque estão disponíveis em grande número, co-dominantes e transferíveis entre diferentes genótipos (Raatz et al., 2019).

As tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) e os marcadores moleculares são estudos genéticos revolucionários para o desenvolvimento, pois tem aumentado exponencialmente o número de variantes genéticas que podem ser descobertas em uma única experiência. Com estas tecnologias, o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) e a detecção e genotipagem de inserção-deleção (InDel) vêm se tornando viáveis à escala de todo o genoma e são amplamente aplicados a estudos de diversidade e associação em plantas (Ariani et al., 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar e validar regiões genômicas previamente identificadas como associadas ao fenótipo de descoloração de grãos de feijão quanto à presença de marcadores moleculares do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) no germoplasma de interesse brasileiro destinados à exportação e ao consumo interno.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Multiplicar 41 acessos de feijão para a obtenção de sementes para realizar as fenotipagens e avaliar algumas características agronômicas;
- Identificar, a partir dos genomas de referência de feijão encontrados na literatura, as regiões contendo os SNPs-alvos associadas à descoloração de grão, previamente identificadas em estudo de GWAS, e desenhar pares de oligonucleotídeos flanqueando esses SNPs;
- Avaliar o perfil de descoloração de grão em genótipos de feijão de origem Mesoamericana e Andina submetidos ao tempo de cozimento pré-estabelecido para cada cultivar em cozedor Mattson, incluindo grãos dos tipos dark red kidney (DRK), preto, rosinha, roxo e vermelho;
- Validar e otimizar sete pares de primers para a obtenção de amplicons únicos para sequenciamento e genotipagem de SNPs por sequenciamento;
- Construir sondas TaqMan e validar os SNPs identificados pelas mesmas através da integração com os fenótipos associados ao desbotamento dos grãos.
- Caracterizar o polimorfismo dos marcadores SNPs e relacionar a variação identificada ao fenótipo de descoloração de grãos de feijão de origem Andina submetidos a um processo térmico de esterilização, similar ao do enlatamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de genótipos de feijões especiais do programa de melhoramento de feijão da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás - GO, oito (8) de origem Andina e treze (13) de origem Mesoamericana, foram semeadas em dois plantios, com o objetivo de multiplicá-las visando a obtenção de material em quantidade suficiente para realização dos testes e análises. Posteriormente, sementes de mais feijões foram adicionadas ao plantio e as análises.

Os genótipos de origem Andina foram representados pelos acessos de cor dark red kidney (CF 240050, CF 840732, CNFRX 15446, BRS Embaixador, Mont Calm), light red kidney (CF 250007), rajado (BRS FS 305 (CAL96) e cranberry (BRS Executivo). Enquanto os genótipos de origem Mesoamericana foram representados pelos feijões do grupo preto (BRS FP 403, BRS Esplendor, BRS Esteio, Rico 23, IPR Uirapuru, BRS Campeiro e IPR Tuiuiú), rosinha (CNFRS 15558 e BRS Vereda), mulatinho (BRS Agreste e BRS Marfim), roxo (BRS Pitanga) e vermelho (Ouro Vermelho).

Para o terceiro plantio foram semeados somente genótipos de feijões de origem Andina, mais vinte novos genótipos de feijões Andinos, totalizando vinte e oito Andinos, além dos treze genótipos de feijão Mesoamericanos, totalizando quarenta e um diferentes materiais genéticos. Os novos genótipos Andinos foram do grupo de cor preta (CNF 000840, CNF 00 1602, CNF 002023, CNF 11351, CF 200011, CF 230005 e CF 240060), do grupo de cor vermelha (CF 840725, CF 840745, CF 870138, CF 200008, CF 240065, CNF 001574) e do grupo de cor roxa (CNF 011463, CF 200009, CNF 008782, CF 240050, CNF 007659, CNF 011368) (Apêndice 1).

4.1 CULTIVO, DADOS MORFOLÓGICOS E PRODUÇÃO DOS GENÓTIPOS

Três semeaduras para os diferentes genótipos de feijão especial foram realizadas, nas safras da seca em 2019 e 2020, e das águas em 2019/2020. As sementes de

cada acesso foram semeadas em doze vasos (10 L) com solo do tipo latossolo vermelho, três sementes em cada unidade, e o ensaio foi mantido sob telado.

A primeira semeadura foi realizada no dia 23 de julho de 2019, e a segunda em 27 de novembro de 2019, ambas para multiplicação das sementes e para sequenciamento e genotipagem dos genótipos andinos e mesoamericanos. A adubação de semeadura foi 7 g de formulado NPK (5-30-15) por vaso. As plantas daninhas foram controladas manualmente toda semana, e o controle preventivo de doenças e pragas foi realizado quatro vezes durante o ciclo do feijão, e os agroquímicos foram pulverizados com bomba costal manual (20 litros de água com 50 mL de abamectina, 50 mL de triflumizol e 50 mL de neonicotinoides). A irrigação foi feita de forma manual com mangueira plástica uma vez ao dia. A primeira colheita dos grãos teve início em outubro de 2019 e estendeu-se até o fim do mês, e a segunda entre o início e o fim de fevereiro de 2020, devido a existência de genótipos mais precoces e outros mais tardios, cada genótipo teve os seus grãos contados separadamente.

A terceira semeadura ocorreu no dia 30 de julho de 2020, e foram utilizados somente acessos de origem Andina, mais vinte genótipos de feijão, visando fazer a validação da sonda TaqMan, que foi construída a partir do sequenciamento e genotipagem dos acessos andinos e mesoamericanos obtidos nas primeiras e segundas semeaduras. O manejo utilizado neste ensaio foi igual ao relatado para os anteriores. Nos três ensaios, as vagens foram colhidas quando as plantas apresentaram os primeiros sinais de senescência, secas ao sol e debulhadas manualmente. Depois, os grãos foram pesados, contados e acondicionados em sacos plásticos perfurados. Estes foram dispostos em caixa de papelão e, então, armazenados em câmara fria a 10 °C até o momento da nova semeadura, e/ou análise instrumental de cor antes e depois do cozimento. A contagem do número de vagens foi realizada após a colheita, assim como número de grãos, massa de 100 grãos e massa total de grãos.

4.2 EXTRAÇÃO DO DNA, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS SNPS

As folhas trifoliadas jovens de cada genótipo de feijão foram colhidas e usadas para a extração de DNA pelo método CTAB, utilizando *β -mercaptoetanol* (cetyltrimethyl ammonium bromide), conforme descrito por Doyle e Doyle (1990). A qualidade do DNA foi confirmada por eletroforese em gel de 1% de agarose. O DNA foi quantificado em

Qubit 2.0 Fluorometer Invitrogen (Oregon, USA) e diluído para a concentração de 5 ng μL^{-1} .

Ao todo, sete SNPs previamente identificados através de análise de GWAS (Al-Dossary, 2016) como associados ao fenômeno de descoloração em germoplasma de origem andina foram selecionados e acessados para o desenho dos pares de oligonucleotídeos. O acesso às sequências desses SNPs foi feito através da plataforma Phytozome, utilizando como referência o posicionamento do SNP no genoma informado no documento de referência (Al-Dossary, 2016; Cichy et al. 2014).

Os oligonucleotídeos, sete pares de primers iniciadores, foram construídos pela Alpha DNA (Montreal, CA), e posicionados flanqueando o SNP-alvo e a síntese foi ordenada. As checagens quanto à eficiência e especificidade de amplificação foram realizadas via reação da polimerase em cadeia (PCR) utilizando DNA genômico obtido da etapa de extração (Doyle & Doyle, 1990). As reações de amplificação foram conduzidas individualmente em um volume final de 10 μL , seguido por amplificação em termociclador. As temperaturas de anelamento foram individualmente ajustadas para cada par de oligonucleotídeos, com a finalidade de se obter um padrão específico de amplificação sem a formação de produtos amplificados secundários.

Os fragmentos amplificados foram submetidos ao sequenciamento genômico, tanto a partir da extremidade 3' (iniciador *reverse*), quanto da extremidade 5' (iniciador *forward*), de acordo com Sanger (1977). Para a reação de sequenciamento dos fragmentos-alvo foi utilizado o reagente Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing. Para tanto, as amostras foram previamente purificadas (remoção das impurezas) com isopropanol a 65%, álcool 60% e álcool 70%, e centrifugação, e depois secas em estufa a 37°C por 15 min. O precipitado foi finalmente ressuspensão em 10 μL de formamida (Hi-Di). Posteriormente, os fragmentos amplificados foram sequenciados na plataforma ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA). Os dados foram coletados através do programa Foundation Data Collection 2.0 (Applied Biosystems, EUA) e analisados pelo programa Sequencing Analysis (Applied Biosystems, EUA).

As informações de sequenciamento foram individualmente geradas por genótipo, e reunidas em um único arquivo para cada SNP-alvo analisado. Os arquivos individuais foram analisados utilizando o programa Codon Code Aligner (Codon Code

Corporation, EUA), e as sequências dos genótipos alinhadas no programa Clustal W, desenvolvido por Confluence da Atlassian 6.13.3, RU. A partir dos resultados de alinhamentos os SNPs-alvo foram identificados e manualmente genotipados, sendo a informação transcrita para um arquivo Excel.

4.3 TESTE DE COZIMENTO EM MATTSON E PERDA DE COR APÓS O COZIMENTO

Um teste preliminar de cozimento foi realizado com 19 genótipos dos 21 genótipos, porque dois genótipos não apresentaram grãos suficientes para a fenotipagem. Os dados obtidos foram usados para o sequenciamento genético, assim como uma análise da mudança de cor (ΔE) após o cozimento (Tabela 7), para que com base nestes resultados as sondas TaqMan fossem construídas. Assim, o tempo de cozimento de cada cultivar foi determinado de acordo com Proctor & Watts (1987). Amostras de 25 grãos inteiros e intactos de cada genótipo de feijão foram macerados durante 18 h, e em seguida dispostos na placa do cozedor Mattson. Neste equipamento, 25 varetas foram dispostas uma em cima de cada grão, e foi adicionado 1 L de água. O tempo de cozimento de cada feijão foi determinado com um cronômetro, que foi disparado no início do cozimento e parado quando 13 das 25 varetas perfuraram os grãos.

Posteriormente, outras amostras de 50 grãos de cada genótipo de feijão foram maceradas por 18 h, cozidos em béquer de 500 mL cheio de água, aquecido por uma placa aquecedora, pelo tempo de cocção determinado anteriormente pelo cozedor de Mattson, uma vez que cada genótipo apresentou um tempo de cozimento peculiar. Os testes de cozimento foram realizados em replicatas, devido a insuficiência de grãos, que foram multiplicados três vezes até a obtenção de material suficiente para a fenotipagem com três repetições, em condições semelhantes ao processamento de uma conserva, adotado posteriormente.

Os parâmetros de cor instrumental, luminosidade (L^*) e coordenadas de cromaticidade a^* (+ vermelho; - verde) e b^* (+ amarelo, - azul), dos grãos crus e cozidos, cada um no tempo de cozimento determinado no teste descrito anteriormente, foram capturados por leitura direta em colorímetro HunterLab Colorimeter (HunterLab, Color Quest XE, Virginia, USA), de acordo com (Mendoza et al., 2014). A partir destes

parâmetros a diferença de cor (ΔE) foi calculada (Equação 1). Os grãos de cada genótipo foram dispostos em uma cubeta de 50 e 30 mm para a realização de 3 leituras em cada estado (antes e depois do cozimento).

$$\Delta E = \sqrt{(L * antes - L * depois)^2 + (a * antes - a * depois)^2 + (b * antes - b * depois)^2}$$

(Eq. 1)

4.4 TESTE E VALIDAÇÃO COM AS SONDAS TAQMAN E SEGUNDA FENOTIPAGEM

As sondas TaqMan (Thermo Fisher Scientific, USA) foram desenhadas com o objetivo de eliminação das etapas de sequenciamento e de genotipagem manual, tornando assim o processo mais rápido e menos dispendioso. A partir do sequenciamento dos primeiros 21 acessos de genótipos avaliados, os SNPs que mostraram polimorfismo relacionado com a descoloração dos grãos após o cozimento foram identificados, e as sequências específicas de DNA do genoma do feijão marcadas como relacionadas a esta característica. Um teste para a verificação da funcionalidade da sonda foi feito primeiramente com o genótipo Mont Calm, que não apresentou desbotamento acentuado durante o cozimento, e os genótipos que desbotam muito durante o cozimento (Cal 96, CNFRX 15446, CF 240050). O teste foi bem sucedido, e então seguiu-se com a validação das sondas, tanto dos genótipos que já tinham sido sequenciados, como para os novos acessos de feijões andinos.

Para a validação da sonda foi realizado uma PCR em tempo real no equipamento Applied Biosystems Real-Time PCR Systems Quant Studio 7500 (CA, USA). A PCR em tempo real com sondas mostra os genótipos que tem o alelo de resistência, ou que desbota pouco, sendo o genótipo Mont Calm referência para este alelo. Os genótipos Cal 96 e CNFRX 15446 tem o alelo desfavorável ou que desbota muito os grãos durante o cozimento. Então, no gráfico de plotagem da PCR eles foram separados em alelo 1 e alelo 2, e conforme a identificação das amostras e dos controles, os genótipos se separam nestes dois grupos de alelos. Assim, identificaram-se quais eram os genótipos que possuíam o alelo de pouco desbotamento e muito desbotamento da cor dos grãos.

A segunda fenotipagem dos grãos foi realizada nos 41 genótipos (Tabela 5). Os grãos foram submetidos à análise de cor, tanto os crus como os cozidos, conforme descrito anteriormente. Após alguns testes preliminares (não apresentados), o cozimento de 30 grãos, em triplicata, foi realizado com base no protocolo americano, com modificações, principalmente relacionadas ao tamanho dos recipientes, composição do caldo e o volume de grãos. Estes ficaram em hidratação por 1 h, em copos de 200 mL com água destilada, conforme Mendoza et al. (2018). Depois, os volumes dos grãos foram medidos em proveta de 100 mL, e os grãos foram cozidos somente em água. A quantidade do caldo foi estabelecida pelo volume de grãos multiplicado por três, em todos os genótipos. Os grãos e o caldo medidos foram colocados em potes de vidro de 170 mL. O cozimento foi realizado em autoclave vertical CS (Primatec, SIE Engenharia, BRA, 2008) a temperatura de 121°C com pressão de 15 psi ou 1 kgf/cm² por 15 min., conforme Basset et al. (2020). Logo após o cozimento, os grãos foram resfriados em água corrente fria até a temperatura ambiente, e a análise de cor foi realizada.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir dos perfis de genotipagem gerados e que foram integrados aos dados fenotípicos foi realizada uma análise de regressão linear simples utilizando o software R, versão 4.0.1 (R Core Team, 2020). Delineamento inteiramente casualizado foi utilizado, com esquema fatorial (41x2), sendo 41 genótipos de feijão especial; antes e após o tratamento térmico em condições de conserva (2), em 3 repetições originais, totalizando 168 unidades experimentais. Os resultados obtidos das variáveis instrumentais de cor: luminosidade (L*), coordenadas de cromaticidade a e b (a* e b*), foram utilizadas para o cálculo da variação de cor (ΔE), e foram avaliadas por meio de análise de variância (Anova) e as médias comparadas pelo teste Tukey 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E RENDIMENTO

Os genótipos Andinos apresentaram massa de 100 grãos variando entre 19,01 e 55,96 g (Tabelas 1 e 2), enquanto os Mesoamericanos entre 18,24 e 27,57 g (Tabela 1). No Brasil, o cultivo de feijoeiros comuns Mesoamericanos é predominante, e segundo relato de Blair et al. (2010), a maioria dos genótipos apresenta massa de 100 grãos em torno de 25 a 27 g, faixa de valores obtida por vários genótipos avaliados nesta pesquisa.

De forma geral, os genótipos Andinos apresentaram grãos maiores que os Mesoamericanos, exceto os genótipos CNF 008782, CNF 000840, CF 840725, CF240060, CNF 002023 e CNF 001602, que apresentaram massa de 100 grãos menor ou igual a 26,66 g (Tabela 2). Blair et al. (2010) verificaram que os feijões de origem Andina provenientes da África e cultivados no Brasil também foram maiores que os Mesoamericanos. Ribeiro et al. (2014) avaliaram algumas linhagens de feijão tipo especial (linhagens light red kidney, dark red kidney, cranberry), como as cultivares Cal 96 e Montcalm, ambos de origem Andina, e reportaram grãos grandes, com massa de 100 grãos maior que 40 g, de acordo com os valores obtidos neste estudo (Tabela 1).

A massa total dos grãos variou de 57,27 a 441,53 g para os genótipos Mesoamericanos (Tabela 1), e entre 33,27 a 278,08 g para os Andinos (Tabelas 1 e 2), sinalizando que, de forma geral, os genótipos Mesoamericanos foram mais produtivos, o que ficou evidenciado principalmente na segunda semeadura 2019/20 (Tabela 1). Entretanto, na primeira semeadura, destacou-se como mais produtiva entre todos a cultivar Montcalm, que também apresentou o maior número de vagens e maior número de grãos entre os genótipos de origem Andina (Tabela 1), que também apresentou o maior número de vagens e maior número de grãos entre os genótipos de origem Andina (Tabela 1). Por outro lado, na segunda semeadura, a cultivar Rico 23, de origem Mesoamericana, e a cultivar BRS Esplendor foram as mais produtivas, com elevado número de vagens e número de grãos (Tabela 1).

Tabela 1. Características morfológicas e rendimento dos genótipos cultivados na safra 2019 e 2019/2020 (primeira e segunda safras).

Identificação do genótipo	Origem 1	Número de vagens		Número de grãos		Massa de 100 grãos (g)		Massa total dos grãos (g)	
		1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
BRS FS 305 (Cal 96)	A	54	126	145	318	48,47	55,96	70,33	177,94
CF 250007	A	66	124	250	432	32,52	37,91	75,00	163,78
CF 240050	A	79	165	130	481	46,09	45,78	94,36	220,22
CF 840732	A	142	189	119	594	45,62	46,81	50,18	278,08
BRS Executivo	A	41	78	121	216	46,87	47,39	56,71	102,37
CNFRX 15446	A	43	179	129	403	35,87	47,18	60,78	190,15
BRS Embaixador	A	36	143	107	360	40,00	42,88	42,80	154,36
Montcalm	A	108	170	295	477	42,00	42,43	118,90	202,38
BRS FP 403	M	91	209	421	1104	27,12	26,04	110,58	287,49
BRS Esplendor	M	110	396	561	2519	18,91	17,53	102,52	441,53
BRS Esteio	M	110	225	434	1408	23,47	20,89	101,08	294,11
Rico 23	M	108	336	467	1910	18,54	19,16	86,58	365,93
IPR Uirapuru	M	75	241	400	1304	22,99	23,74	91,96	309,59
BRS Campeiro	M	87	230	285	937	25,6	26,85	64,26	251,60
BRS Pitanga	M	117	257	468	1213	18,24	19,88	85,36	241,09
Ouro Vermelho	M	103	204	163	1077	26,44	25,14	61,48	270,72
IPR Tuiuiu	M	92	226	438	1279	26,47	22,78	101,91	291,37
CNFRS 15558	M	142	219	462	856	26,40	27,57	115,77	236,01
BRS Agreste	M	124	217	338	767	24,40	23,87	76,59	183,09
BRS Vereda	M	86	258	299	1303	20,64	23,58	57,37	307,24
BRS Marfim	M	88	298	340	1238	24,25	26,47	82,45	327,66

¹A: Andino; M: Mesoamericano

Em relação aos genótipos de origem Andina, na segunda safra, a linhagem CF 840732 foi a mais produtiva, seguida pela CF 240050 (Tabelas 1), que apresentaram massa de 100 grãos de 46,81 g e 45,78 g, respectivamente. Enquanto, na terceira safra, a linhagem CNF 11351 foi uma das mais produtivas, mas apresentou grãos pouco menores (massa de 100 grãos de 39,24 g) que as duas que mais se destacaram na segunda safra.

Tabela 2. Terceira semeadura características morfológicas e rendimento dos genótipos Andinos cultivados no ano de 2020.

Identificação do genótipo	Número de vagens	Número de grãos	Massa de 100 grãos (g)	Massa total dos grãos (g)
BGF 11369	140	319	42,69	138,68
CF 240050	65	187	40,78	76,26
CNF 11351	207	541	39,24	226,37
CNF 007659	59	139	39,07	54,46
CNF 001574	95	311	37,35	116,66
CNF 011463	46	163	36,82	60,01
CNF 011368	140	466	35,3	168,55
CF 870138	99	300	32,49	97,48
CF 230005	91	244	31,34	76,48
CF 200008	151	343	30,91	110,37
CF 200011	124	361	29,72	107,29
CF 240029	57	224	29,15	65,3
CNF 008782	39	143	26,66	33,27
CNF 000840	147	519	26,65	138,3
CF 240065	153	579	26,34	152
CF 840745	130	436	24,23	106,8
CF 840725	147	483	23,01	118,22
CF 240060	117	342	22,67	79,23
CNF 002023	190	815	19,61	166,48
CNF 001602	175	816	19,01	160,43

A indústria de conservas precisa de feijões mais graúdos, que se expandem rápido e uniformemente na embalagem durante o processamento, que não deixem muitos sólidos no fundo do recipiente, além de cozinharem de forma rápida e uniforme. Assim os grãos devem ter massa drenada considerável e textura aceitáveis após o processamento. Por sua vez, a taxa de absorção de água pode afetar a capacidade de inchaço do grão, o que afeta o número de latas de feijão que podem ser produzidas a partir do produto bruto (rendimento industrial) (Mendoza et al., 2014).

Os genótipos que tiveram maior produção de vagem foram os CF 840732, CF 240050, CNFRX 15446 e o Montcalm que são de origem Andina (Tabela 1). Outros genótipos que também apresentaram maior produção de vagens e grãos foram BGF 11369, CNF 11351, CNF 011368, CF 20008, CF840725, CNF 002023 e CNF 001602 (Tabela 2). Muitos programas de melhoramento buscam desenvolver novas cultivares para a classe comercial de ‘grãos especiais’, como as variedades ‘Cranberry’, ‘Feijão Pinto’, ‘Dark Red Kidney’, ‘Marinha’ e ‘Alubia’, principalmente para fins de exportação. Ao contrário do Brasil, na Europa e nos EUA, é encontrada grande variedade desses feijões, com predomínio de acessos de origem Andina (Almeida et al., 2020).

5.2. TESTE DE COZIMENTO, PRIMEIRA FENOTIPAGEM E IDENTIFICAÇÃO DOS MARCADORES SNP

Na primeira fenotipagem a cocção dos genótipos de feijão foi feita em cozedor de Mattson, e o tempo que os feijões levaram para cozinhar foram utilizados para o cozimento dos grãos em recipiente aberto, para a avaliação de cor (Béqueres de 500 mL). Para os grãos de origem Andina os tempos de cozimento variaram de 19,32 min para o genótipo CNF RX 15446 até 44,90 min para o genótipo CF 840732 (**Tabela 3**). Enquanto, para os genótipos de origem Mesoamericana os valores determinados oscilaram de 30,90 min para o IPR Tuiuiú a 59,77 min para o BRS Pitanga.

Cichy et al. (2015) também avaliaram as principais classes de cores de feijões do *pool* Andino cultivados na América do Norte e África, das cores light red kidney, dark red kidney, white kidney, red mottled, purple speckled, white e yellow, quanto ao tempo de cozimento em cozedor de Mattson. Estes autores reportaram o menor tempo de cozimento para o feijão branco (30,2 min), enquanto o mosqueado vermelho/roxo apresentou o maior (41,1 min). Também verificaram que houve uma correlação fraca, mas significativa, entre o tempo de cozimento e a massa do grão, de modo que os maiores demoram mais para cozinhar do que as menores. Além de relatarem que a cor do tegumento da semente influencia no tempo de cozimento, que é mais rápido quando os grãos apresentaram níveis mais baixos de compostos fenólicos, o que foi verificado no tegumento dos feijões mais claros em comparação com as sementes pretas e coloridas

Tabela 3. Associação entre mudança de coloração após o cozimento (ΔE) e seleção de cinco regiões com SNPs que mostraram polimorfismo em genótipos de feijão de cores diversas dos pools gênicos Andino e Mesoamericano.

ID.do genótipo	$\Delta E \pm DP^1$	Tempo de Cocção (min)	Cor do Grão	Pool Gênico	SNP 2	SNP 4 (não alvo)	SNP 5	SNP 5 (não alvo)	SNP 7
MontCalm	7,46 ^A ± 0,96	41,20	Dark Red Kidney	Andino	T	A	A	A	A
Ouro Vermelho	8,18 ^{AB} ± 1,19	40,20	Vermelho	Mesoamericano	C	A	G	C	G
IPR Tuiuiú	9,90 ^{ABC} ± 0,94	30,90	Preto	Mesoamericano	C	A	G	-	G
BRS Campeiro	10,67 ^{ABCD} ± 0,95	35,60	Preto	Mesoamericano	C	G	G	T	A
BRS FP 403	10,78 ^{ABCD} ± 0,88	37,15	Preto	Mesoamericano	C	G	G	T	G
BRS Vereda	11,03 ^{ABCD} ± 1,15	33,95	Rosinha	Mesoamericano	C	A	G	A	A
CF 250007	11,42 ^{BCD} ± 1,75	30,43	Light Red Kidney	Andino	T	A	A	A	A
BRS Esteio	12,44 ^{CDE} ± 1,01	47,08	Preto	Mesoamericano	C	G	G	T	C
BRS Agreste	12,97 ^{CDE} ± 1,66	53,30	Mulatinho	Mesoamericano	C	G	G	T	A
CNFRS 15558	13,28 ^{CDE} ± 1,43	39,37	Rosinha	Mesoamericano	C	A	A	A	G
IPR Uirapuru	13,09 ^{CDE} ± 1,78	31,13	Preto	Mesoamericano	T	A	G	A	A
Rico 23	13,88 ^{DE} ± 0,32	46,02	Preto	Mesoamericano	C	A	G	A	G
BRS Esplendor	14,18 ^{DE} ± 1,18	33,97	Preto	Mesoamericano	T	A	G	A	G
BRS Marfim	15,38 ^{EF} ± 0,63	43,62	Mulatinho	Mesoamericano	C	A	G	A	G
BRS FS 305	18,96 ^{FG} ± 0,86	33,27	Rajado	Andino	C	G	G	T	G
BRS Pitanga	19,36 ^G ± 0,84	59,77	Roxo	Mesoamericano	C	A	G	A	G
CNFRX 15446	19,73 ^G ± 0,68	19,32	Dark Red Kidney	Andino	C	G	G	T	G
CF 240050	22,21 ^G ± 1,75	43,05	Dark Red Kidney	Andino	C	G	G	T	G
CF 840732	22,22 ^G ± 1,42	44,90	Dark Red Kidney	Andino	C	G	G	T	G
BRS Embaixador*	-	32,13	Dark Red Kidney	Andino	C	G	G	T	G
BRS Executivo*	-	40,83	Cranberry (Rajado)	Andino	C	G	G	T	G

¹ Médias com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$); * Estes genótipos não tinham grãos suficientes para fazer a primeira fenotipagem.

Durante o remolho com água (18 h a temperatura aproximada de 25°C), os grãos apresentaram visualmente mudanças de coloração para cada genótipo. O que pode indicar a existência de pigmentos nos grãos de feijão com diferentes graus de solubilidade em água (Wright & Kelly, 2011).

Os valores da diferença de cor antes e depois do cozimento (ΔE) dos grãos de feijão de genótipos Andinos durante o tempo de cozimento determinado previamente variaram entre 7,46 e 22,22 (Tabela 3). O menor valor de ΔE determinado foi no feijão dark red kidney do cultivar Montcalm, o que confirmou este genótipo de feijão como referência, tanto para a identificação do SNP como para a menor perda de cor dos grãos; enquanto o maior valor de ΔE foi determinado na linhagem CF 840732.

Considerando os valores de ΔE para os feijões preto, rosinha e mulatinho separadamente (todos com origem Mesoamericana), o menor ΔE para os genótipos de feijão preto foi de 9,88 (cultivar IPR Tuiuiu) e o maior de 14,18 (cultivar BRS Esplendor). Já para os feijões rosinha e mulatinho, os menores ΔE foram de 11,03 (cultivar BRS Vereda) e 12,97 (cultivar BRS Agreste), respectivamente; enquanto os maiores ΔE foram de 13,28 (cultivar CNFRS 15558) e 15,38 (cultivar BRS Marfim) (Tabela 3).

Bornowski et al. (2020) reportaram que o traço de cor foi pontuado em uma escala de intensidade de atributos de 1-5, onde '1' representou uma amostra com cor marrom claro e '5' com cor preta escura. Para medir com mais precisão a retenção de cor, também usaram painelistas que foram treinados para avaliar a cor e a aparência do feijão enlatado em escalas independentes e duas medidas objetivas foram tomadas, uma usando o espectrofotômetro e uma análise de imagem digital.

A diferença de cor (ΔE) é descrita no National Bureau of Standards Unit (NBS), o qual estabelece uma escala detectável por humanos: 0 a 0,5 - pouco perceptível; 0,5 a 1,5 - ligeiramente perceptível; 1,5 a 3,0 - perceptível; 3,0 a 6,0 considerável perceptível; 6,0 a 12,0 - muito perceptível; maior que 12,0 - muitíssimo perceptível (Hongxia et al., 2011). Considerando esta escala, a mudança de cor dos genótipos Montcalm, Ouro Vermelho, IPR Tuiuiu, BRS Campeiro, BRS FP 403, BRS Vereda e CF 250007, quando cozidos em aparelho Mattson, pode ser considerada muito perceptível, enquanto os demais genótipos, muitíssimo perceptível (Tabela 3).

Entretanto, como a cultivar Montcalm tem sido utilizada pelas indústrias de conservas, por possuir baixo nível de desbotamento após o tratamento térmico rápido sob pressão, ficou evidenciado que os elevados valores de ΔE determinados poderiam estar refletindo o maior tempo de cozimento aplicado no teste, praticamente o dobro ou mais do que é utilizado pela indústria, normalmente (15 min em autoclave). De qualquer modo, todos os genótipos foram submetidos ao mesmo procedimento, portanto, as diferenças observadas nesse teste preliminar foram válidas e úteis para escanear materiais mais ou menos susceptíveis ao desbotamento nessas condições, e que seriam validados, no último experimento, pelo processamento similar ao industrial. O tratamento hidrotérmico, muitas vezes afeta negativamente os parâmetros de qualidade culinária/tecnológica dos grãos. Os efeitos indesejáveis incluem divisão do tegumento da semente e/ou cotilédone, aglomeração de grãos devido aos amidos extrusados, e mudança da cor do tegumento da semente (Bornowski et al. 2020).

Para o olho humano, feijões com valores mais baixos de L^* , a^* e b^* parecem mais escuros. Pois, as antocianinas por serem hidrossolúveis lixiviam na água de remolho ou cozimento mais facilmente que os carotenóides (lipossolúveis), o que resulta no aumento dos valores de luminosidade, croma a^* e croma b^* . Isso indica que as amostras ficam com cor mais clara, mais avermelhadas e amareladas (menos verde e azul e mais vermelho e amarelo nas escalas a^* e b^* , respectivamente após o processamento) (Cichy et al. 2014). Os pigmentos antocianinas são solúveis em água e apresentam cor entre o azul e o púrpura em frutas, vegetais e bebidas, enquanto os carotenóides são pigmentos lipofílicos responsáveis pelas cores entre o amarelo e o vermelho dos alimentos vegetais (Rodrigues- Amaya, 2018).

Consumidores e processadores de feijão preto preferem cultivares que retêm a cor escura quando cozidos e enlatados, respectivamente. As antocianinas são os compostos solúveis em água, responsáveis pela cor da semente que se acumula no revestimento de sementes. A variabilidade na retenção da cor pode ser atribuída à quantidade total de antocianinas ou quantidade de lixiviação de antocianina. As antocianinas são conhecidas por terem capacidade antioxidante; grãos de feijão que retêm a cor podem ter benefícios para a saúde (Wright & Kelly, 2011). Na identificação dos SNPs (**Figura 1**), para um mesmo fragmento sequenciado, mais de um SNP foi identificado na sequência, além do SNP-alvo de interesse (**Figura 2**).

PRIMER 2

GATTCTTTCTGGTTGCAAACATCCTCGGACACCGTCCTTTGCCGTGTACAGCGGCGGAAA [C/T] GAACCTCGTCATCATCACCATCACCACCAT
GTTTCATGTTTCGCAACAACAACAACGATGCA

MONTCALM	GTCGT---GTAAGCGGC	GAAAT	GAACCTCGTCAT-CTCACCATCGCCACCATGTTTCATG	109
MONTC.FE-3	GCCGTCGTCACAGCGGC	GAAAT	GAACCTCGTCATCATCACCATCACCACCATGTTTCATG	120
BRSAGRESTE	GCCGT-GTC-CAGCGGC	GAAAC	GAACCTCGTCATCATCACCATCACCACCATGTTTCATG	116
BRSVEREDA	GCCGT-GT-ACAGCGGC	GAAAC	GAACCTCGTCATCATCACCATCACCACCATGTTTCATG	113
CF840732	GCCGT-GTACAGCG--G	GGAAC	GAACCTCGTCATCATCACCATCACCACCATGTTTCATG	114
CNFRS15558	GCCGT-GTA-CAGCGGC	GAAAT	GAACCTCGTCATCATCACCATCACCACCATGTTTCATG	115
BRSEEXECUTIVO	GCCGT-GTCACAGCGGC	GAAAC	GAACCTCGTCATCATCACCATCACCACCATGTTTCATG	115
CF240050	GCCGT-GTCACAGCGGC	GAAAC	GAACCTCGTCATCATCACCATCACCACCATGTTTCATG	114

* *** * ** ***** ***** *****

Figura 1. Alinhamento das sequências feitas dos genótipos para identificação dos SNPs, marcadores e identificados.

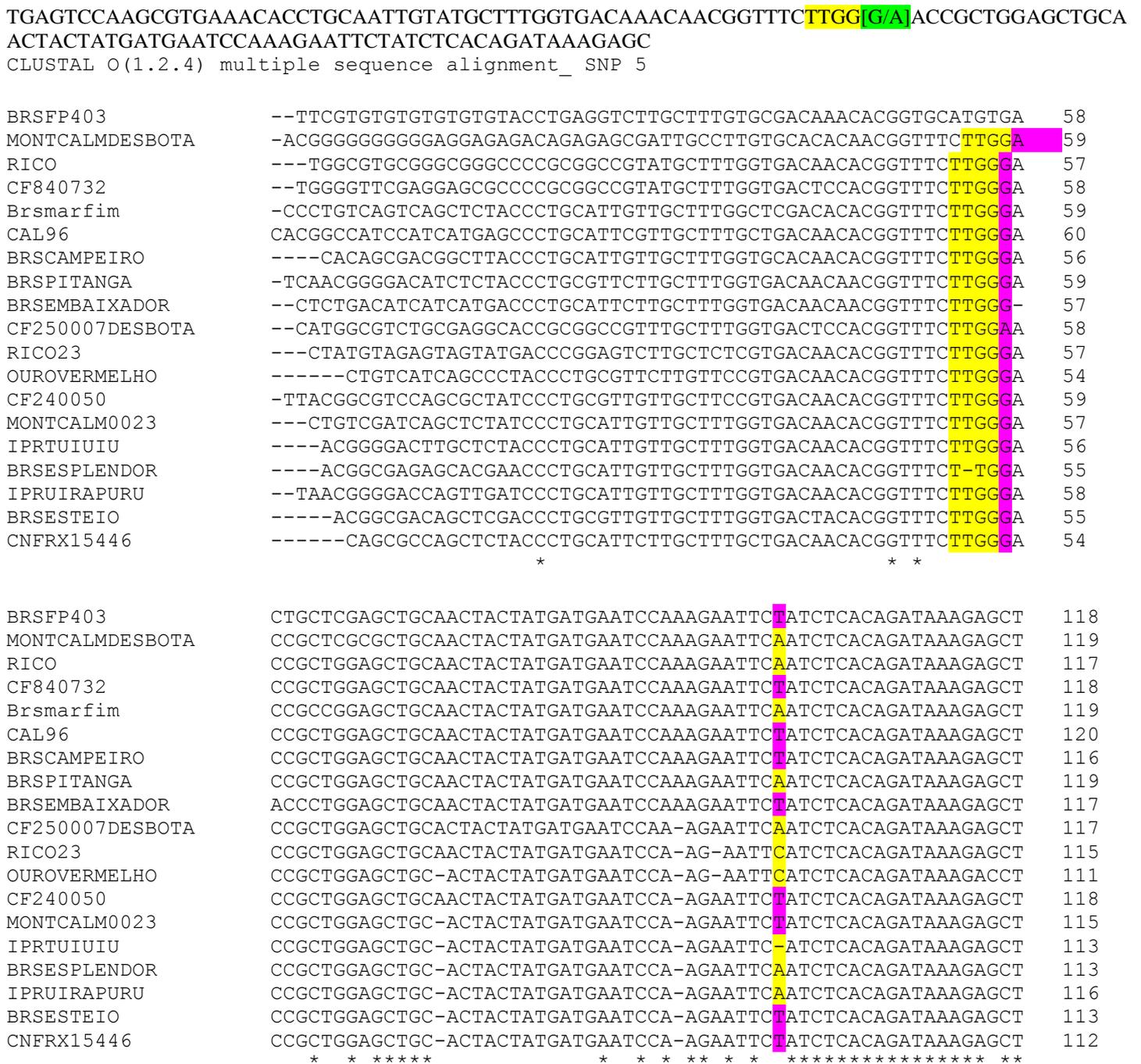


Figura 2. Marcação no SNP 5 alvo e não alvo.

Das sete regiões avaliadas (Tabela 4), em quatro foram identificados polimorfismos nos SNPs-alvo.

Tabela 4. Identificação dos sete SNPs depois que os vinte e um genótipos foram sequenciados.

ID (genótipo)	Pool Gênico ¹	Classe de Cor	SNP 1	SNP 2	SNP 3	SNP 4	SNP 5	SNP 6	SNP 7
CF 840732	A	Dark Red Kidney	G* G C* C A* C G* A G G* T A* A G* G - T						
CNFRX 15446	A	Dark Red Kidney	G* T C* C A* C G* C G G* T G* A G* A C T						
CF 240050	A	Dark Red Kidney	G* G C* G A* C G* C G G* T G* G* G G T						
Montcam	A	Dark Red Kidney	G* T T* G A* T G* C A A* A G* G A* A C -						
BRS Embaixador	A	Dark Red Kidney	G* G C* C A* C G* A G G* T A* A G* A C T						
CF250007	A	Light Red Kidney	G* G T* G A* T G* C A A* A G* G A* A C -						
BRS FS 305 (Cal 96)	A	Calima (Rajado)	G* G C* C A* C G* C G G* T A* A G* A C T						
BRS Executivo	A	Cranberry (Rajado)	G* G C* G A* T G* C G G* T A* G G* G - -						
Rico 23	M	Preto	G* G C* C G* T T* C A G* A G* A G* A C -						
BRS Esplendor	M	Preto	A* G T* C A* C G* C A G* A T* G G* G - C						
BRS Campeiro	M	Preto	G* T C* C A* C G* A G G* T A* G A* A C T						
BRS Esteio	M	Preto	G* T C* C A* C G* A G G* T A* G c- A C T						
IPR Uirapuru	M	Preto	A* G C* C G* C T* C A G* A A* G G* A C T						
IPR Tuiuiú	M	Preto	A* T C* C G* C T* C A G* - T* G G* A C T						
BRS FP 403	M	Preto	G* G C* C A* C G* A G G* T T* G G* A C T						
BRS Pitanga	M	Roxo	A* G C* C G* C T* C A G* A G* G G* A C T						
Ouro Vermelho	M	Vermelho	A* G C* C G* C T* A A G* C T* G G* A C T						
BRS Agreste	M	Mulatinho	G* T C* G A* T G* C G G* T G* G A* A C T						
BRS Marfim	M	Mulatinho	G* G C* C G* C T* C A G* A T* G G* A C T						
CNFRS 15558	M	Rosinha	A* G T* G A* T G* A A A* A A* G A* A G A						
BRS Vereda	M	Rosinha	G* G C* G G* C T* A A G* A A* A A* A G T						

¹A: Andino; M: Mesoamericano *SNP Alvo

Enquanto, nas demais o SNP-alvo não mostrou polimorfismo desejado como nas outras quatro regiões, sendo que uma das regiões mostrou polimorfismo do SNP na região alvo e não alvo no SNP 5 (Figura 2). E para uma mesma sequência, mais de um SNP foi identificado além do SNP-alvo (Tabela 3).

Os genótipos de feijão foram segregados e analisados de acordo com a origem. Para os genótipos de origem Andina, tendo a cultivar Montcalm como referência, foram identificados quatro SNPs que apresentaram um padrão consistente com o valor de ΔE (Tabela 3). Entre todos os genótipos, apenas a linhagem CF 250007 de origem Andina apresentou SNP igual ao da cultivar Montcalm, e entre os fenótipos Andinos o menor valor de ΔE (7,46), que representa a menor perda de cor, sendo fortemente sugestivo da associação entre SNP e fenótipo. Enquanto, para os genótipos de origem Mesoamericana não foi observado um padrão de associação entre SNP e o ΔE , sugerindo que diferentes regiões no genoma podem estar envolvidas no controle dessa característica. Isso pode ter como causa as diferenças edafoclimáticas das regiões de origem, e as diferentes rotas de seleção natural e/ou domesticação dos genótipos de cada pool genético em questão (Almeida et al., 2020).

Bornowski et al. (2020) reportaram linhagens consanguíneas recombinantes (RIL) e mapearam populações usadas para identificar regiões no genoma do feijão seco associadas à retenção de cor. Muitos QTLs de efeito leve a moderado foram detectados para retenção de cor pós-processamento em feijão preto, apoiando pesquisas anteriores de que esta característica está sob controle poligênico. Vários desses QTLs co-localizados nas mesmas regiões genômicas, nos cromossomos Pv08 e Pv11, ao longo dos anos, corroboram os resultados deste estudo.

5.3 SEGUNDA FENOTIPAGEM E VALIDAÇÃO DAS SONDAS TAQMAN

Com as sondas TaqMan desenvolvidas e ajustadas quanto à amplificação, a etapa de sequenciamento dos fragmentos genômicos contendo os SNPs foram suprimidas nesta segunda parte do trabalho. Pois, a genotipagem por sondas TaqMan alelo-específicas é um processo mais eficiente, rápido, menos dispendioso e com menor número de etapas. As sondas TaqMan foram desenvolvidas tendo como alvo sete regiões genômicas, das quais em cinco foram identificados polimorfismos nos SNPs-alvo que estão nas posições 39.699.447 pb, 39.715.422 pb, 39.721.323 pb, 39.721.366 pb, 39.744.784 pb do cromossomo cinco de

feijão. A validação das sondas com a segunda fenotipagem, agora com um método de cozimento mais semelhante com o do enlatamento industrial, indicou a presença dos alelos relacionados com a menor perda de cor ou menor desbotamento.

A cultivar Montcalm foi utilizada novamente como referência de baixa intensidade de desbotamento (baixo valor de ΔE) após o tratamento térmico na autoclave. Assim, os genótipos que apresentaram o alelo igual ao deste genótipo também apresentaram reduzido desbotamento (Apêndice 2). Enquanto, o genótipo BRS FS 305 (Cal 96) possui alelo relacionado com alta intensidade de desbotamento após o cozimento, e os genótipos que apresentaram o alelo igual ao deste genótipo também apresentaram acentuada perda de cor dos grãos (Tabela 5).

A identificação de regiões genômicas e marcadores moleculares associados a características de qualidade de conservas podem permitir a geração precoce da seleção assistida pelo marcador, que já foi implementada para muitos genes de resistência a doenças, mas ainda não implementada para características de qualidade de conservas de feijões especiais. A seleção assistida por marcador na geração inicial para retenção de cor e outras características de qualidade não só reduziria os custos associados ao avanço da geração e teste de linhas de enlatamento de baixa qualidade, mas também permitiriam a seleção na ausência de maquinário industrial de enlatamento. Alternativamente, melhorar o rendimento e a precisão da fenotipagem permite decisões de seleção mais fundamentadas nas gerações posteriores (Bornowski et al., 2020).

Na segunda fenotipagem, com base no protocolo industrial, foram identificados apenas três genótipos que apresentaram o alelo de resistência ao desbotamento do grão: Montcalm ($\Delta E = 4,23$), CF 250007 ($\Delta E = 4,85$) e o BGF 0001574 ($\Delta E = 5,60$) (Tabela 5). Segundo a escala do NBS, a perda de cor após o cozimento nestes três genótipos foi consideravelmente perceptível (3,0 a 6,0), enquanto nos demais genótipos variou entre muito perceptível (6,0 a 12,0) e muitíssimo perceptível (maior que 12,0), exceto na cultivar de tegumento preto BRS FP 403, do pool Mesoamericano, cujo $\Delta E = 5,63$, e assim podendo ser classificada junto ao grupo consideravelmente perceptível (Hongxia et al., 2011).

Tabela 5. Desbotamento (ΔE) de 41 genótipos após maceração e cozimento em autoclave para a segunda fenotipagem usada na validação das sondas TaqMan.

Genótipo	Pool Gênico Classe de cor	Classe de cor	$\Delta E \pm$ desvio-padrão
Montcalm	Andino	Dark Red Kidney	4,23 ^A \pm 1,16
CF 250007	Andino	Light Red Kidney	4,85 ^{AB} \pm 1,35
BGF 0001574	Andino	Vermelho	5,60 ^{ABC} \pm 1,40
BRS FP 403	Mesoamericano	Preto	5,63 ^{ABC} \pm 0,52
Ouro Vermelho	Mesoamericano	Vermelho	6,15 ^{ABCD} \pm 1,66
IPR Uirapuru	Mesoamericano	Preto	6,63 ^{ABCDE} \pm 0,85
IPR Tuiuiu	Mesoamericano	Preto	6,77 ^{ABCDEF} \pm 1,67
RICO 23	Mesoamericano	Preto	7,43 ^{BCDEFG} \pm 0,89
BGF 0016155	Andino	Vermelho	7,64 ^{CDEFGH} \pm 1,39
BRS Pitanga	Mesoamericano	Roxo	7,97 ^{CDEFGH} \pm 2,00
CAL 96 (BRS FS 305)	Andino	Calima (Rajado)	7,99 ^{CDEFGH} \pm 1,35
BRS Esteio	Mesoamericano	Preto	8,11 ^{CDEFGH} \pm 0,93
BGF 0007659	Andino	Purple	8,57 ^{DEFGHI} \pm 0,58
BGF 0008782	Andino	Purple	8,677 ^{DEFGHI} \pm 0,88
BGF 0014020	Andino	Vermelho	8,67 ^{DEFGHI} \pm 1,96
BRS Vereda	Mesoamericano	Rosinha	8,80 ^{DEFGHI} \pm 2,89
BGF 0014855	Andino	Vermelho	8,84 ^{DEFGHI} \pm 1,96
BRS Esplendor	Mesoamericano	Preto	8,90 ^{DEFGHI} \pm 1,14
BRS Campeiro	Mesoamericano	Preto	9,35 ^{EFGHIJ} \pm 2,23
BGF 0014000	Andino	Vermelho	9,44 ^{FGHIJ} \pm 2,48
BGF 0016195	Andino	Vermelho	9,54 ^{GHIJ} \pm 1,52
CNFRX 15446	Andino	Dark Red Kidney	9,91 ^{GHIJ} \pm 1,24
BRS Embaixador	Andino	Dark Red Kidney	10,22 ^{HIJ} \pm 2,22
BGF 0001602	Andino	Preto	10,39 ^{HIJ} \pm 1,13
CF 240050	Andino	Dark Red Kidney	11,23 ^{IK} \pm 2,33
BRS Agreste	Mesoamericano	Mulatinho	11,23 ^{IK} \pm 5,00
BGF 0011367	Andino	Purple	11,26 ^{JK} \pm 0,98
BRS Executivo	Andino	Cranberry (Rajado)	12,0 ^Q \pm 2,24
CF 840732	Andino	Dark Red Kidney	13,43 ^{KL} \pm 2,85
CNFRS 15558	Mesoamericano	Rosinha	13,52 ^{KL} \pm 2,59
BRS Marfim	Mesoamericano	Mulatinho	13,53 ^{KL} \pm 3,34
BGF 0011350	Andino	Preto	15,11 ^{LM} \pm 1,45
BGF 0016000	Andino	Vermelho	15,39 ^{LM} \pm 2,07
BGF 000840	Andino	Preto	15,80 ^{LM} \pm 1,27
BGF 0016003	Andino	Preto	15,97 ^{LM} \pm 1,86
BGF 0016186	Andino	Preto	16,32 ^M \pm 1,29
BGF 0002023	Andino	Preto	17,76 ^{MN} \pm 1,07
BGF 11369	Andino	Rajado	17,80 ^{MN} \pm 2,42
BGF 0016103	Andino	Preto	19,66 ^{NOP} \pm 1,69
BGF 0014020	Andino	Purple	21,65 ^{OP} \pm 1,96
BGF 0016176	Andino	Purple	22,50 ^P \pm 1,21

*Médias com letras sobrepostas diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$).

Os três genótipos que apresentaram o alelo de resistência ao desbotamento do grão são de origem Andina, da classe de cor Dark Red Kidney, Light Red Kidney e Vermelho, respectivamente.

Os genótipos que são testemunhas para alelo que perde cor no processamento térmico e no enlatamento foram BRS FS 305 ($\Delta E = 7,98$), da classe de cor calima (rajado) e CNF RX 15446 ($\Delta E = 9,91$), da classe de cor Dark Red Kidney, ambos de origem Andina. Os ΔE s determinados para os genótipos Montcalm, CF 250007, BGF 0001574, BRS FP 403, Ouro Vermelho, IPR Uirapuru e IPR Tuiuiú, não diferiram entre si (Tabela 5), sugerindo que os quatro últimos (mesoamericanos) têm potencial para o enlatamento.

A diferença nos valores de ΔE entre a primeira e a segunda fenotipagem deve-se às diferentes formas de processamento empregadas. Na primeira fenotipagem foi utilizado maior tempo de maceração (18h) e maior tempo de cozimento (de 19,32 a 59,77 min, Tabela 3) em recipiente aberto e sob temperatura de ebulição da água, método utilizado devido a pouca quantidade de grãos nesta fase do estudo. Enquanto na segunda fenotipagem, a maceração foi de 1 h e o tempo de tratamento térmico foi de 15 min a 120°C, em autoclave. Desta forma, o tratamento com menor tempo de maceração e cozimento causou menor descoloração na maioria dos materiais, devido a menor lixiviação dos pigmentos para a água de maceração e de cozimento, resultando em maiores valores de ΔE .

Os genótipos da classe de cor preto e purple de origem Andina não apresentaram nenhum genótipo que tivesse o alelo resistente ao desbotamento quando processados termicamente e também apresentaram um maior desbotamento, quando submetidos ao processamento térmico (Tabela 5). A mudança de cor induzida pelo processamento térmico é particularmente perceptível no mercado de feijão da classe preto, onde o feijão cozido ganha uma cor marrom desbotada devido à lixiviação de antocianinas do tegumento da semente solúveis em água (Bornowski et al. 2020).

Dos sete SNPs sequenciados e identificados, cinco mostraram o polimorfismo desejado no primeiro momento e foram usados para a construção das cinco sondas TaqMan. Os cinco SNPs selecionados foram renomeados novamente em SNP 1, SNP 2, SNP 3, SNP 4 e SNP 5 que estão nas posições 39.699.447 pb, 39.715.422 pb, 39.721.323 pb, 39.721.366 pb, 39.744.784 pb, respectivamente, do cromossomo cinco de feijão. Dos cinco SNPs avaliados com as sondas, somente os SNPs 1 e 3 mostraram associação com os menores

valores de ΔE , e se mostraram significativos na análise de regressão (Tabelas 5, 6 e 7), o que significa que os materiais genéticos com tais SNPs desbotaram menos do que os genótipos que não os apresentaram, e obtiveram maiores valores de ΔE .

Tabela 6. Quadro de Análise de Regressão Linear Simples para o SNP 1 para os genótipos de feijão do pool gênico Andino.

F.V	GL	SQ	QM	F	R ²	p-valor
SNP1 ^a	1	176,9	176,9	9,6	0,24	0,00461
Resíduo	26	478,5	18,4			
Total	27	655,4	195,3			

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^aContraste testado: TT vs CC

Tabela 7. Quadro de Análise de Regressão Linear Simples para o SNP 3 para os genótipos de feijão do pool gênico Andino.

F.V	GL	SQ	QM	F	R ²	p-valor
SNP3 ^a	1	175,3	175,3	9,2	0,24	0,005655
Resíduo	25	478,3	19,1			
Total	26	653,7	194,5			

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^aContraste testado: AA vs GG; Obs: Os graus de liberdade do SNP 3 são menores porque houve um genótipo que não apresentou o SNP nesta região.

Existem dois SNPs associados ao desbotamento reduzido em germoplasma de feijões especiais de origem Andina, que podem ser indicados para a seleção assistida por marcadores (SAM). Dos sete SNPs sequenciados e identificados, cinco mostraram o polimorfismo desejado no primeiro momento, e foram usados para a construção das cinco sondas TaqMan. Dos cinco SNPs avaliados com as sondas, somente os SNPs 1 e 3 mostraram associação com os menores valores de ΔE (Tabela 5). Os feijões com tais SNPs alelos CC e TT para o SNP 1 e o alelo AA e GG para o SNP 3, desbotaram menos do que os que não os apresentaram, e obtiveram maiores valores de ΔE . A partir da análise de regressão foi observado uma significância de 1% para os SNPs 1 e 3, sugerindo que mudanças no perfil fenotípico estão associadas com a mudança no perfil molecular (Tabelas 6 e 7). O valor baixo de R² para ambos SNPs, certamente se deve ao reduzido número de genótipos amostrados que apresentaram ΔE reduzido (somente três). A genotipagem de um conjunto maior de acessos, representativos desta classe fenotípica, poderia proporcionar um melhor

ajuste do modelo aos dados e, conseqüentemente, maiores coeficientes de determinação. Assim, é possível afirmar que há dois SNPs potenciais associados ao desbotamento reduzido após o cozimento dos feijões de origem Andina, que podem ser indicados para a seleção assistida por marcadores (SAM) (**Figura 3**).

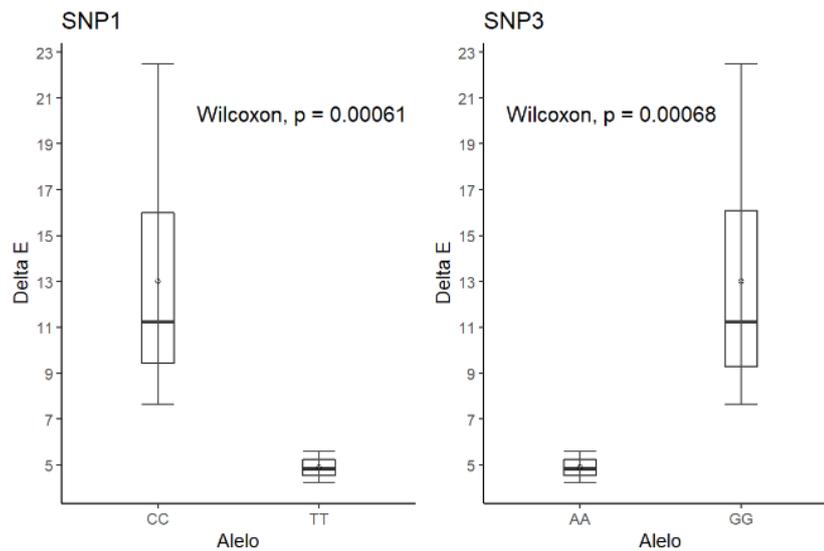


Figura 3. BoxPlots dos SNPs significativos 1 e 3 e os alelos resistentes ao desbotamento que provocam redução nos valores de Delta E nos genótipos de feijão do pool gênico Andino.

A análise de regressão linear não revelou p-valores significativos e, com isso, os valores de R^2 não foram gerados para o germoplasma mesoamericano. Isso significa que o germoplasma de origem Mesoamericana não apresentou evidência de associação do marcador SNP com a característica de desbotamento de grãos (Tabela 5). Diante disso, para o germoplasma mesoamericano, estudos de associação ou mapeamento genético, são demandados com o objetivo de identificar nesse germoplasma as regiões no genoma que estão associadas com o fenótipo de desbotamento de grãos em feijão (Figura 4).

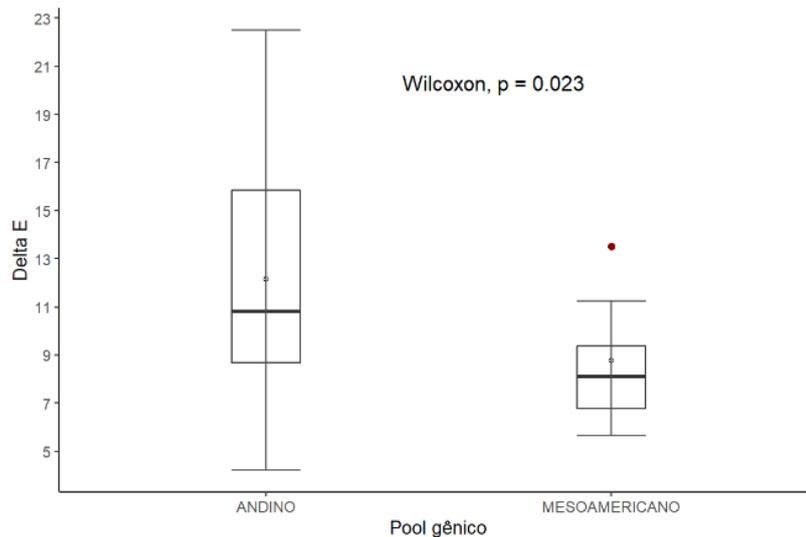


Figura 4. Boxplots diferença entre os pool gênicos quanto a descoloração da cor do grão.

As informações sobre a fenotipagem, relacionadas ao atributo de descoloração de grãos após o processamento (ΔE) realizadas em grãos de origem Mesoamericana, são relevantes para o programa de melhoramento, tendo em vista o considerável desbotamento pós-cozimento observado em algumas cultivares de feijão, que tem sido um motivo de insatisfação pelo consumidor.

A diferença de coloração dos genótipos de feijão especial após o processamento térmico não diferiu ($p < 0,05$) entre os genótipos Montcalm (Andino, e usado como padrão de baixo desbotamento) e os mesoamericanos Ouro Vermelho (cor vermelha), BRS Tuiuiú e BRS Uirapuru (cor preta). O que poderia indicar potencial de menor grau de descoloração entre os genótipos do grupo Mesoamericano (Tabela 5). Os feijões fotografados antes e depois do cozimento sob pressão, similar ao cozimento industrial, mostram que o BRS Pitanga e os genótipos da classe de cor preta de origem Mesoamericana apresentaram mudança de cor em alguma intensidade depois de cozidos (**Apêndice 2**).

O cozimento pode modificar a cor dos grãos de feijão, além da genética estar envolvida, dependendo dos tipos de compostos que compõem a cor dos grãos de feijão, elas podem sofrer modificação, ser facilmente degradadas ou lixiviadas, podendo ocorrer o escurecimento ou clareamento dos grãos de alguns genótipos. Guzel e Sayar (2012) reportaram que o cozimento pode afetar a cor das sementes, ele mediu a cor dos grãos cru e cozidos do feijão Barlotto, feijão faba, grão-de-bico e feijão Branco. Após o processamento,

o grão-de-bico e o feijão Branco ficaram mais escuros. As degradações mais comuns dos pigmentos são as reações de escurecimento, oxidação do ácido ascórbico, acidez e contaminação por metais pesados.

6 CONCLUSÃO

Os quarenta e um genótipos de acessos de origem Andina ($4,22 \leq \Delta E \leq 22,49$) e Mesoamericana foram multiplicados e avaliados quanto ao rendimento e o tamanho dos grãos, no qual os genótipos de feijão do pool gênico Andino apresentam grãos maiores que os Mesoamericanos.

As estimativas de diferença de cor, ΔE , geradas para o conjunto de 41 genótipos de origem andina ($4,22 \leq \Delta E \leq 22,49$) e mesoamericana ($5,631 \leq \Delta E \leq 13,526$) são de grande relevância para o programa de melhoramento genético de feijão possibilitando a seleção de genótipos com reduzido ΔE que podem integrar blocos de cruzamento com a finalidade de transferir essa característica para cultivares comerciais de feijão.

Os marcadores SNPs desenvolvidos a partir de regiões genômicas associadas ao desbotamento previamente identificadas por outros autores, amplificaram produtos específicos via PCR gerando perfis adequados de sequenciamento, a partir dos quais foi possível a identificação do polimorfismo dos SNPs e desenvolvimento das sondas TaqMan.

Foram desenvolvidas sondas TaqMan tendo como alvo sete regiões genômicas, das quais em cinco foram identificados polimorfismos nos SNPs-alvo que estão nas posições 39.699.447 pb, 39.715.422 pb, 39.721.323 pb, 39.721.366 pb, 39.744.784 pb do cromossomo cinco de feijão.

A partir da genotipagem das cinco sondas TaqMan nos 21 genótipos inicialmente avaliados não foi observado um padrão de correlação visual entre o SNP e os valores de ΔE . Diante disso, os genótipos foram segregados de acordo com a origem andina e mesoamericana e novamente avaliados.

Para os genótipos de origem Andina, tendo o Montcalm como referência, foram identificados dois SNPs que apresentam um padrão consistente com os valores de ΔE menores que 5,599, e teste de correlação linear significativo ($p\text{-valor} \leq 0,01$), sendo fortemente sugestivo da associação entre SNP e fenótipo. Esses dois SNPs são potenciais

Para os genótipos de origem Mesoamericana não foi observado um padrão de associação entre SNP e ΔE , sugerindo que diferentes regiões no genoma podem estar envolvidas no controle dessa característica.

Com esse estudo será possível indicar aos melhoristas ferramentas mais rápidas de seleção assistida por marcadores (MAS) nos programas de melhoramento para que esta característica dos feijões seja trabalhada e contribua assim na obtenção de mais genótipos de feijões andinos que mantenham boa qualidade de processamento na indústria, e assim recomendar genótipos estáveis e que sejam produzidos para a exportação.

7 REFERÊNCIAS

AL-DOSSARY, O. M. **Color retention and anthocyanin concentration in canned black beans**. 2016. 173 f. Thesis (Master of Science in Crop and Soil Sciences), Michigan State University, Michigan, 2016.

ALEMU, H. Breeding common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) for canning quality traits: a review. **Journal of Agriculture Science and Food Research**, New York, v. 9, p. 203-211, 2018.

ALMEIDA, C. P., PAULINO, J. F. C., MORAIS CARBONELL, S. A., CHIORATO, A. F., SONG, Q., DI VITTORI, V., RODRIGUEZ, M., PAPA R., BENCHIMOL-REIS, L. L. Genetic Diversity, Population Structure, and Andean Introgression in Brazilian Common Bean Cultivars after Half a Century of Genetic Breeding. **Genes**, Basel, v. 11, n. 11, p. 1298-1304, 2020. doi: <https://doi.org/10.3390/genes11111298>.

ALVES, N. E. G., GOMES, M. J. C., VASCONCELOS, C. M., LIMA, A. C., LIMA, S. L. S. D., BRITO, E. S., BASSINELLO, P. Z., MARTINO, H. S. D. Six months under uncontrolled relative humidity and room temperature changes technological characteristics and maintains the physicochemical and functional properties of carioca beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, Londres, v. 342, n. 4, p. 128390, 2021. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128390>.

ARIANI, A.; MIER, B.; TERAN, J. C.; GEPTS, P. Genome-wide identification of SNPs and copy number variation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using genotyping-by-sequencing (GBS). **Molecular breeding**, Oxfordshire, v. 36, n. 7, p. 1-11, 2016. doi: <https://doi.org/10.1007/s11032-016-0512-9>.

ARNS, F. D.; RIBEIRO, N. D.; MEZZOMO, H. C.; STECKLING, S. D. M.; KLÄSENER, G. R.; CASAGRANDE, C. R. Combined selection in carioca beans for grain size, slow darkening and fast-cooking after storage times. **Euphytica**, Wageningen, v. 214, n. 4, p. 66, 2018, doi: <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2149-8>.

ARTEAGA, S.; YABOR, L.; TORRES, J., SOLBES, E.; MUÑOZ, E., DÍEZ, M. J., VICENTE, O., BOSCAIU, M. Sugenith et al. Morphological and agronomic characterization of spanish landraces of *Phaseolus vulgaris* L. **Agriculture**, Barcelona, v. 9, n. 7, p. 149, 2019. doi:<https://doi.org/10.3390/agriculture9070149>.

BASSETT, A.; DOLAN, K. D., CICHY, K. Reduced retort processing time improves canning quality of fast-cooking dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York, v. 100, n. 10, p. 3995-4004, 2020. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.10444>.

BEEBE, A. S. E.; RAO, A. I. M.; JYOSTNA-DEVI, M. B.; POLANIA, J. A. Common beans, biodiversity, and multiple stresses: challenges of drought resistance in tropical soils. **Crop & Pasture Science**, London, v. 65, n. 7, p. 667–675, 2014. doi:<http://dx.doi.org/10.1071/CP13303>.

BELAN, P. A.; ARAÚJO, S. A.; SANTANA, J. C. C. Um sistema de análise de imagens para classificação automática de grãos de feijão brasileiro. In: CILAMCE - IBERO-LATIN AMERICAN CONGRESS ON COMPUTATIONAL METHODS IN ENGINEERING. **Anais...** 2015. p. 1-7.

BELLUCCI, E.; BITOCCHI, E.; RAU, D.; RODRIGUEZ, M.; BIAGETTI, E.; GIARDINI, A.; PAPA, R. Genomics of origin, domestication and evolution of *Phaseolus vulgaris*. **Genomics of Plant Genetic Resources**, Clayton, p. 483–507, 2013. doi: https://doi.org/10.1007/978-94-007-7572-5_20.

BENTO, J. A. C.; RIBEIRO, P. R. V.; BASSINELLO, P. Z.; BRITO, E. S. D.; ZOCOLLO, G. J.; CALIARI, M.; SOARES JÚNIOR, M. S. Phenolic and saponin profile in grains of carioca beans during storage. **LWT -Food Science Technology**, Amsterdam, v. 139, n. 3, p. 110599, 2021. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110599>.

BITOCCHI, E., BELLUCCI, E., GIARDINI, A., RAU, D., RODRIGUEZ, M., BIAGETTI, E., PAPA, R. Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Mesoamerica and the Andes. **New Phytologist**, Lancaster, v. 109, n. 14, p. 788–796, 2012. Disponível em: doi:<https://doi.org/nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1469-8137.2012.04377.x>. Acesso em 27 ago. 2019. doi: [org/10.1111/j.1469-8137.2012.04377.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04377.x).

BORNOWSKI, N., SONG, Q., KELLY, J. D. QTL mapping of post-processing color retention in two black bean populations. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 133, n. 11, p. 3085–3100, 2020. doi:<https://doi.org/10.1007/s00122-020-03656-3>.

BLAIR, M. W., GONZÁLEZ, L. F., KIMANI, P. M., BUTARE, L. Genetic diversity, inter-gene pool introgression and nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from Central Africa. **Theoretical Applied Genetic**, New York, v. 121, n. 2, p. 237–248, 2010. doi: <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1305-x>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano Nacional de Desenvolvimento da Cadeia do Feijão e Pulses**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2018. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/plano-para-aumentar-producao-de-feijao-e-pulses-e-lancado-no-mapa/cartilhafeijaobaixa.pdf>. Acesso em: 18 maio 2019.

CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s. l.], v.38, p.64-71, 2009 (supl. especial), 2009. doi

CARBAS, B.; MACHADO, N.; OPPOLZER, D.; FERREIRA, L.; QUEIROZ, M.; BRITES, C.; ROSA, E.A.; BARROS, A.I. Nutrients, Antinutrients, Phenolic Composition, and Antioxidant Activity of Common Bean Cultivars and their Potential for Food Applications. **Antioxidants**, Bruxelas, v. 9, n. 2, p. 186-192, 2020. <https://doi.org/10.3390/antiox9020186>.

CAVALCANTE, R. B. M.; ARAÚJO, M. A. D. M.; ROCHA, M. D. M.; MOREIRA-ARAÚJO, R. S. D. R. Effect of thermal processing on chemical compositions, bioactive compounds, and antioxidant activities of cowpea cultivars. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 30, n. 4, p. 1050–1058, 2017. doi: <https://doi.org/10.1590/1983-21252017v30n426rc>.

CICHY, K. A., FERNANDEZ, A., KILIAN, A., KELLY, J. D., GALEANO, C. H., SHAW, S., TROXTELL, E. QTL analysis of canning quality and color retention in black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Molecular breeding**, Oxfordshire, v. 33, n. 1, p. 139-154, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9940-y>.

CICHY, K. A.; WIESINGER, J. A.; MENDOZA, F. A. Genetic diversity and genome-wide association analysis of cooking time in dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 128, n. 8, p. 1555-1567, 2015. doi: <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2531-z>.

COELHO, S. R. M., PRUDENCIO, S. H.; NOBREGA, L. H. P., LEITE, C. F. R. Alterations in the cooking time and texture of the common bean grains during storage. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 539-544, 2009. ISSN 1981-1829. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542009000200028>.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento safra brasileira de grãos**, v. 7 - Safra 2019/20 - Décimo segundo levantamento, Brasília, p. 1-68, setembro 2020. ISSN 2318-6852. <http://www.conab.gov.br>.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **A cultura do feijão**. Brasília, DF, : Conab, 2018. 244 p. ISBN: 978-85-62223-12-9. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb>. Acesso em: 18maio 2019.

DE LANGE, A.; LABUSCHAGNE, M. Multivariate assessment of canning quality, chemical characteristics and yield of small white canning beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in South Africa. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York, v. 81, n. 1, p. 30–35, 2000. doi:10.1002/1097-0010(20010101)81:1<30::aid-jsfa774>3.0.co;2-m.

OLIVEIRA, D. M. de; BISCHOFF, T. Z.; SILOCHI, R. M. Q.; SCHOENINGER, V.; COELHO, S. R. M. Considerações acerca da produção e qualidade de grãos de feijão. **Journal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v. 3, n. especial, p.16-22, 2014. 2014.

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

ELSADR, H. T.; WRIGHT, L. C.; PAULS, K. P.; BETT, K. E. Characterization of seed coat post harvest darkening in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and**

Applied Genetics, Berlim, v. 123, n. 8, p. 1467-1472, 2011. DOI: 10.1007/s00122-011-1683-8.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. Manual de classificação do feijão: instrução normativa n. 12, de 28 de março de 2008. **Embrapa Arroz e Feijão-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E)**, 2012.

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/101039/1/manualilustrado-06.pdf>. Acessado em 21 de outubro de 2020.

EMBRAPA. Embrapa Arroz e Feijão. **Utilização de marcadores moleculares em programas de ampliação da base genética de espécies cultivadas**. 2003. 40p. ISSN 1678-9644. Sítio <https://www.embrapa.br/arroz-e-feijao>. Acesso em: 19 maio 2019.

EMBRAPA. Embrapa Trigo. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo. 2000. 30 p. ISSN 1518-6512.2000. Disponível em: <https://www.embrapa.br/trigo>. Acesso em: 19 maio 2019.

EMBRAPA. SOUSA, D.M.G de, LOBATO, E. Cerrado Correção do Solo e Adubação. 2 ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 416 p.

EMBRAPA. KNABBEN, C. C.; COSTA, J. S. Manual de classificação do feijão: instrução normativa n. 12, de 28 de março de 2008. **Embrapa Arroz e Feijão-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E)**, 2012.

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

GUIMARÃES, G.; DE PAULA LANA, R.; DE MIRANDA SOUZA, M. R.; MENDONÇA, B. P. C.; ALVES, E. E. N. Recomendação de fertilizantes com base na lei do retorno decrescente. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, Viçosa, v. 1, n. 1, p.53-59, 2011.

GÜZEL, D.; SAYAR, S. Effect of cooking methods on selected physicochemical and nutritional properties of barlotto bean, chickpea, faba bean, and white kidney bean. **Journal of Food Science and Technology**, New York, v. 49, n. 1, p. 89–95, 2012. doi:10.1007/s13197-011-0260-0.

HONGXIA, Z.; ZHIYANG, L.; XIN, Y.; YUAN, L. Study on colour classification of pork with computer vision system based on different colour difference formula. **Key Engineering Materials**, Bern, v. 474–476, p. 1638-1642, 2011.

LIU, B. H. **Statistical Genomics: Linkage, Mapping and QTL Analysis**. Boca Raton: CRC Press, 1998. 611 p.

LOS, F. G. B.; ZIELINSKI, A. A. F.; WOJEICCHOWSKI, J. P.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I. M. Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): whole seeds with complex chemical

composition. **Current Opinion in Food Science**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 63-71, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.010>

MAMIDI, S.; ROSSI, M.; ANNAM, D.; MOGHADDAM, S.; LEE, R.; PAPA, R.; MCCLEAN, P. Investigation of the domestication of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using multi locus sequence data. **Journal Compilation**, North Dakota, v. 38, n. 12, p. 953–967, 2011. Doi <http://dx.doi.org/10.1071/FP11124>.

MANTOVANI, E. C.; MONTES, D. R.; VIEIRA, G. H.; RAMOS, M. M.; SOARES, A. A. Estimativa de produtividade da cultura do feijão irrigado em Cristalina-GO, para diferentes lâminas de irrigação como função da uniformidade de aplicação. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 32, n. 1, p. 110-120, 2012.

MAPA- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Plano Nacional de Desenvolvimento da Cadeia do Feijão e Pulses**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2018. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/plano-para-aumentar-producao-de-feijao-e-pulses-e-lancado-no-mapa/cartilhafeijaobaixa.pdf>. Acesso em: 18 maio 2019.

MENDOZA, F. A.; CICHY, K.; LU, R. Y.; KELLY, J. D. Evaluation of canning quality traits in black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by visible/near-infrared spectroscopy. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 7, n. 9, p. 2666-2678, 2014. doi: 10.1007 / s11947-014-1285-y.

MENDOZA, F. A.; CICHY, K. A.; SPRAGUE, C.; GOFFNETT, A.; LU, R.; KELLY, J. D. Prediction of canned black bean texture (*Phaseolus vulgaris* L.) from intact dry seeds using visible/near infrared spectroscopy and hyperspectral imaging data. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York, v. 98, n. 1, p. 283-290, 2018. Doi: 10.1002/jsfa.8469.

MIKLAS, P. N.; KELLY, J. D.; BEEBE, S. E.; BLAIR, M. W. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical to MAS breeding, **Euphytica**, Michigan, v. 147, n. 1-2, p. 105–131, 2006. DOI: 10.1007/s10681-006-4600-5.

MILACH, S. C. K. **Marcadores de DNA em plantas**. UFRGS, Porto Alegre, 1998a. 141 p.

MILACH, S. C.K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 5, p. 14-17, 1998b.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, *Book*, v. 55, n. 1, p. 335-350, 1987. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1986. 51: 263-273. PMID: 3472723 DOI: 10.1101/sqb.1986.051.01.032.

NUNES, C. S.; KURZ, V.; FIGUEIREDO, A. M. B.; TRAVI, M. R. L. Métodos de controle e pragas nas lavouras de feijão. **Revista Tecnológica**, Maringá, v. 6, n. 1, p. 128-146, 2017. Doi: 238-1-782-1-10-20170906.pdf.

Oliveira, V. R. D., Ribeiro, N. D., Jost, E., & Londero, P. M. G. Nutritional and microbiological quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cooked with or without the use of soaking water. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1912-1918, 2008.

PINTO, J. V. **Propriedades físicas, químicas, nutricionais e tecnológicas de feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) de diferentes grupos de cor.** 2016. 167 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Escola de Agronomia. Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2016.

PROCTOR, J. R.; WATTS, B. M. Development of a modified Mattson bean cooker procedure based on sensory panel cook ability evaluation. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, Burlington, v. 20, n. 1, p. 9-14, 1987. Doi: 10.1016/s0315-5463(87)70662-2.

RAATZ, B.; MUKANKUSI, C.; LOBATON, J. D.; MALE, A.; CHISALE, V.; AMSALU, B.; FOURIE, D.; MUKAMUHIRWA, F.; MUIMUI, K.; MUTARI, B.; NCHIMBI-MSOLLA, S.; NKALUBO, S.; TUMSA, K.; CHIRWA, R.; MAREDA, M. K.; HE, C. Analyses of African common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm using a SNP fingerprinting platform: diversity, quality control and molecular breeding. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Amsterdam, v. 66, n. 3, p. 707-722, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10722-019-00746-0>.

RIBEIRO, N. D.; DOMINGUES, L. da S.; GRUHN, E. M.; ZEMOLIN, A. E. M. Avaliação dos Componentes da Produtividade de Grãos em Feijão de Grãos Especiais. **Científica: Jaboticabal**, v. 42, n. 2, p. 178–186, 2014a. ISSN: 1984-5529.

RIBEIRO, N. D.; DOMINGUES, L. da S.; GRUHN, E. M.; ZEMOLIN, A. E. M.; RODRIGUES, J. de A. Desempenho agrônômico e qualidade de cozimento de linhagens de feijão de grãos especiais. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 45, n. 1, p. 92-100, 2014b. ISSN 1806-6690.

ROCHA-GUZMÁN, N. E.; GALLEGOS-INFANTE, J. A.; GONZALEZ-LAREDO, R. F.; CARDOZA-CERVANTES, V.; REYNOSO-CAMACHO, R.; RAMOS-GOMEZ, M.; GARCIA-GASCA, T.; DE ANDA SALAZAR, A. Evaluation of culinary quality and antioxidant capacity for Mexican common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) canned in pilot plant. **International Food Research Journal**, Serdang, v. 20, n. 3, p. 1087, 2013. [http://www.ifrj.upm.edu.my/20%20\(03\)%202013/7%20IFRJ%2020%20\(03\)%202013%20Infante%20\(329\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/20%20(03)%202013/7%20IFRJ%2020%20(03)%202013%20Infante%20(329).pdf).

RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Update on natural food pigments-A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. **Food Research International**, Burlington, v. 124, p. 200-205, 2018. doi:10.1016/j.foodres.2018.05.028.

RODRIGUES, L. L. **Controle genético do escurecimento dos grãos de feijão com diferentes tipos de grão e origens.** 2018. 62 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.

- SANGER, F., AIR, G. M., BARRELL, B. G., BROWN, N. L., COULSON, A. R.; FIDDES, J. C., HUTCHISON, C. A., SLOCOMBE, P. M.; SMITH, M.. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. **Nature**, London, v. 265, n. 5596, p. 687-695, 1977. doi:10.1038/265687a.
- SCHOENINGER, V.; COELHO, S. R. M.; BASSINELLO, P. Z. Industrial processing of canned beans. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 5, p. 1-9, 2017. doi:10.1590/0103-8478cr20160672.
- SHI, C.; YU, K.; XIE, W.; DEIDRE, P. N. M. Development of candidate gene markers associated to common bacterial blight resistance in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**. Berlin, v. 125, n. 7, p. 1525–1537, 2012. doi: 10.1007/s00122-012-1931-6.
- SINGH, G. **Seed Quality**. Nova Deli: Gene-Tech Books. 2009.p. 38-47.
- SINGH, S. P.; GEPTS, P.; DEBOUCH, D. G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, New York, v. 45, n. 3, p. 379-396, 1991. doi: 10.1007/BF02887079.
- SIQUEIRA, B. S.; PEREIRA, W. J.; BATISTA, K. A.; OOMAH, B. D.; FERNANDES, K. F.; BASSINELLO, P. Z. Influence of storage on darkening and hardening of slow- and regular-darkening carioca bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. **Journal of Agricultural Studies**, Las Vegas, v. 2, n. 2, p. 87-?, 2014. doi:10.5296/jas.v2i2.5859.
- TAVARES, C. J.; JAKELAITIS, A.; REZENDE, B. P.; DA CUNHA, P. C. Fitossociologia de plantas daninhas na cultura do feijão. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 8, n. 1, p. 27-32, 2013. DOI:10.5039/agraria.v8i1a1849.
- THUNG, M.; SOARES, D. M.; AIDAR, H.; KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F. Agregação de valores com feijões especiais. In: **Fundamentos para uma agricultura sustentável, com ênfase na cultura do feijoeiro**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2009. p. 83-96.
- TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. **Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. 181p. ISBN 978-85-89265-26-3.
- WANG, N.; HATCHER, D. W.; TYLER, R. T.; TOEWS, R.; GAWALKO, E. J. Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). **Food Research International**, Burlingtonv, v. 43, n. 2, p. 589–594, 2010. doi:10.1016/j.foodres.2009.07.012.
- WANI, I. A.; SOGI, D. S., WANI, A. A.; GILL, B. S. Physical and cooking characteristics of some Indian kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, Riyadh, v. 16, n. 1, p. 7-15, 2017. doi:10.1016/j.jssas.2014.12.002.

WHITE, T. J.; ARNHEIM, N.; ERLICH, H. A. The polymerase chain reaction. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 5, n. 6, p. 185-189, 1989. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(89\)90073-5](https://doi.org/10.1016/0168-9525(89)90073-5).

WIESINGER, J. A., CICHY, K. A., GLAHN, R. P., GRUSAK, M. A., BRICK, M. A., THOMPSON, H. J., & TAKO, E. Demonstrating a nutritional advantage to the fast-cooking dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 64, n. 45, p. 8592-8603, 2016. doi:10.1021/acs.jafc.6b03100.

WRIGHT, E. M.; KELLY, J. D. Mapping QTL for seed yield and canning quality following processing of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, Michigan, v. 179, n. 3, p. 471–484, 2011. DOI 10.1007/s10681-011-0369-2.

APÊNDICES

Apêndice 1. Características dos genótipos de feijão usados na genotipagem e fenotipagem.

Nome Comum	Id. Bag	Id. Melhoramento	Pool Gênico	Germoplasma	Origem	Cor do Grão	P ₁₀₀ Grãos	Tamanho
CF 840732	BGF 14007	CF 840732	Andino	Cultivar/Line	Brasil	Dark Red Kidney	46,81	M
CNF 0001574	BGF 1574	Montcalm	Andino	Cultivar/Line	USA	Dark Red Kidney	42,43	G
CF 240050	BGF 16176	CF 240050	Andino	Cultivar/Line	Brasil	Dark Red Kidney	49,11	M
CF 250007	BGF 16251	CF 250007	Andino	Cultivar/Line	Brasil	Light Red Kidney	37,91	M
BRS FS 305	BGF 19700	CAL 96 (BRS FS 305)	Andino	Cultivar/Line	Brasil	Calima (Rajado)	55,96	G
BRS Embaixador	BGF 9066	CNF 0009066	Andino	Cultivar/Line	Brasil	Dark Red Kidney	42,88	G
BRS Executivo	BGF 9593	CNF 0009593	Andino	Cultivar/Line	Brasil	Cranberry (Rajado)	64,02	G
CNFRX 15446	CNFRX 15446	CNFRX 15446	Andino	Cultivar/Line	Brasil	Dark Red Kidney	47,93	M
Crioulo Taquara	BGF 0016103	CF 230005	Andino	Landrace	Brasil	Preto	33,6	G
-	BGF 0000840	CNF 000840	Andino	Cultivar/Line	França	Preto	19,3	P
Black Wonder	BGF 0001602	CNF 001602	Andino	Cultivar/Line	África	Preto	25,9	M
-	BGF 0002023	CNF 002023	Andino	Cultivar/Line	Chile	Preto	23,54	P
Royal Red	BGF 0007659	CNF 007659	Andino	Cultivar/Line	USA	Purple	39,07	G
Nicaragua 0105	BGF 0008782	CNF 008782	Andino	Cultivar/Line	Nicaragua	Purple	26,66	MG
-	BGF 0011350	CNF 011351	Andino	Cultivar/Line	Camarões	Preto	47,94	G
Velazco Largo	BGF 0011367	CNF 011368	Andino	Cultivar/Line	Cuba	Purple	39,34	G
Piligue	BGF 0011462	CNF 011463	Andino	Cultivar/Line	Guatemala	Purple	36,82	M
Campuçal Vermelho	BGF 0014000	CF 840725	Andino	Cultivar/Line	Brasil	Vermelho	32,21	M
Vermelhinho	BGF 0014020	CF 840745	Andino	Landrace	Brasil	Vermelho	33,6	M
Amendoim Vermelho	BGF 0014855	CF 870138	Andino	Landrace	Brasil	Vermelho	35,7	MG

Bagem Amare	BGF 0016000	CF 200008	Andino	Landrace	Brasil	Vermelho	35,16	P
Preto Graúdo	BGF 0016003	CF 200011	Andino	Landrace	Brasil	Preto	36,88	M
Americano	BGF 0016155	CF 240029	Andino	Landrace	Brasil	Vermelho	29,15	M
Manteiga Vermelhinho	BGF 0016176	CF 240050	Andino	Landrace	Brasil	Purple	40,78	M
-	BGF 0016186	CF 240060	Andino	Landrace	Brasil	Preto	28,47	M
-	BGF 0016195	CF 240065	Andino	Landrace	Brasil	Vermelho	28,4	G
-	BGF 1574	CNF 0001574	Andino	Cultivar/Line	USA	Vermelho	44,35	P
Ouro Vermelho	BGF 16227	CF 240097	Mesoamericano	Cultivar/Line	Brasil	Vermelho	25,14	P
IPR Uirapuru	BGF 10003	CNF 0010003	Mesoamericano	Cultivar/Line	Brasil	Preto	23,74	P
Rico 23	BGF 10356	CNF 0010356	Mesoamericano	Cultivar/Line	Brasil	Preto	49,11	P
BRS Esplendor	BGF 18671	CNFP 8000	Mesoamericano	Cultivar/Line	Brasil	Preto	17,53	P
BRS Esteio	BGF 19665	BRS Esteio	Mesoamericano	Cultivar/Line	Brasil	Preto	20,89	P
BRS FP 403	BGF 19704	CNFP 10794	Mesoamericano	Cultivar/Line	Brasil	Preto	26,04	P
BRS Marfim	BGF 6911	CNF 0006911	Mesoamericano	Cultivar/Line	Brasil	Mulatinho	26,47	P
BRS Vereda	BGF 7552	CNF 0007552	Mesoamericano	Cultivar/Line	Brasil	Rosinha	23,58	P
BRS Agreste	BGF 7559	CNF 0007559	Mesoamericano	Cultivar/Line	Brasil	Mulatinho	23,87	P
BRS Pitanga	BGF 7866	CNF 0007866	Mesoamericano	Cultivar/Line	Brasil	Roxo	19,88	P
BRS Campeiro	BGF 8104	CNF 0008104	Mesoamericano	Cultivar/Line	Brasil	Preto	26,85	P
IPR Tuiuiu	IPR Tuiuiu	IPR Tuiuiu	Mesoamericano	Cultivar/Line	Brasil	Preto	22,78	P
CNFRS 15558	BRS FS 212	CNFRS 15558	Mesoamericano	Cultivar/Line	Brasil	Rosinha	27,57	P

Apêndice 2. Associação da genotipagem dos SNPs com a fenotipagem por desbotamento de grãos após cozimento (ΔE) com o uso das sondas TaqMan nos 41 genótipos de feijão.

Genótipo	Pool Gênico	Classe de Cor	ΔE	Sonda 1		Sonda 2		Sonda 3		Sonda 4		Sonda 5		FOTOS	
				Alelo	SNP	Grão cru	Grão Cozido								
Montcalm	Andino	Dark Red Kidney	4,23	Alelo 2 Alelo 2	T T	Alelo 2 Alelo 2	A A								
CF 240050	Andino	Dark Red Kidney	11,23	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	T T	Alelo 1 Alelo 1	G G		
CF 840732	Andino	Dark Red Kidney	13,43	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	No amp.	-	Alelo 1 Alelo 1	T T	Alelo 1 Alelo 1	G G		
BRS Embaixador	Andino	Dark Red Kidney	10,22	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	T T	Alelo 1 Alelo 1	G G		

CF 250007	Andino	Light Red Kidney	4,85	Alelo 2 Alelo 2	T T	Alelo 1 Alelo 2'	A G	Alelo 2 Alelo 2	A A	Alelo 2 Alelo 2	A A	Alelo 2 Alelo 2	A A		
CF 840725	Andino	Vermelho	9,44	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1'	G G	Alelo 1 Alelo 1	T T	Alelo 1 Alelo 1'	G G		
CF 840745	Andino	Vermelho	8,67	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1'	G G	Alelo 1 Alelo 1	T T	Alelo 1 Alelo 1'	GG		
CF 200008	Andino	Vermelho	14,87	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1'	G G	Alelo 1 Alelo 1'	T T	Alelo 1 Alelo 1'	G G		
CF 870138	Andino	Vermelho	8,83	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	T T	Alelo 1 Alelo 1	G G		

CNF 001574	Andino	Vermelho	5,60	Alelo 2 Alelo 2	T T	Alelo 2 Alelo 2	A A	Alelo 2 Alelo 2	A A	Alelo 2 Alelo 2	A A	Alelo 2 Alelo 2	A A	
CF 240065	Andino	Vermelho	9,54	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	T T	Alelo 1 Alelo 1	G G	
CF 240029	Andino	Vermelho	7,64	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 1Alelo 1	T T	Alelo 1 Alelo 1	G G	
CNF 011368	Andino	Purple	11,26	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	T T	Alelo 1 Alelo 1	G G	
Manteiga Vermelhinho CF 240050	Andino	Purple	22,49	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1'	G G	Alelo 1 Alelo 1	T T	Alelo 1 Alelo 1	G G	

CNF 007659	Andino	Purple	8,57	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	T T	Alelo 1 Alelo 1'	G G	
														BGF 007659 CF 34666 ROYAL REC
CNF 008782	Andino	Purple	8,67	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1'	G G	Alelo 1 Alelo 1	T T	Alelo 1 Alelo 1	G G	
														BGF 008782 CF 01487
CNF 011463	Andino	Purple	21,65	Alelo 1 Alelo 1	CC	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	T T	Alelo 1 Alelo 1	G G	
														BGF 0011463 CF 34666 PLAZUE
CNF 000840	Andino	Preto	15,79	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	T T	Alelo 1 Alelo 1	G G	
														BGF 000840 CF 34666
CNF 001602	Andino	Preto	10,39	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	T T	Alelo 1 Alelo 1	G G	
														BGF 0001602 CF 34666

CF 230005	Andino	Preto	19,83	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	T T	Alelo 1 Alelo 1	G G	 <small>BGF 0016103 CF 23005</small>	
CF 200011	Andino	Preto	15,99	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 2 Alelo 2	A A	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 2 Alelo 2	A A	Alelo 2 Alelo 2	A A	 <small>IGF 001600 CF 20011</small>	
CNF 011351	Andino	Preto	15,11	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	T T	Alelo 1 Alelo 1	G G	 <small>BGF 0011350 CNF 011351</small>	
CNF 002023	Andino	Preto	17,76	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	T T	Alelo 1 Alelo 1	G G	 <small>BGF 0002023 CNF 002023</small>	
CF 240060	Andino	Preto	16,32	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	T T	Alelo 1 Alelo 1	G G	 <small>BGF 0016100 CF 24060</small>	

BRS FS 305	Andino	Calima (Rajado)	7,99	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1	T T	Alelo 1 Alelo 1	G G		
BRS Executivo	Andino	Cranberry (Rajado)	12,01	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1'	G G	Alelo 1 Alelo 1	T T	Alelo 1 Alelo 1	G G		
Ouro Vermelho	Meso-americano	Vermelho	6,15	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 2	A G	Alelo 1 Alelo 1'	G G	Alelo 2 Alelo 2	A A	Alelo 1 Alelo 1	G G		
IPR Tuiuiu	Meso-americano	Preto	6,76	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 2	A G	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 2 Alelo 2	A A	Alelo 1 Alelo 1	G G		
BRS Campeiro	Meso-americano	Preto	9,35	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1'	G G	Alelo 1 Alelo 1	T T	Alelo 2 Alelo 2	A A		

BRS FP 403	Meso-americano	Preto	5,63	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1'	G G	Alelo 1 Alelo 1	T T	Alelo 1 Alelo 1	G G	
														<small>BRS FP403</small>
BRS Esteio	Meso-americano	Preto	8,11	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1'	G G	Alelo 1 Alelo 1	T T	Alelo 1 Alelo 1	G G	
														<small>BRS Esteio</small>
IPR Uirapuru	Meso-americano	Preto	6,63	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 2	A G	Alelo 1 Alelo 1'	G G	Alelo 2 Alelo 2	A A	Alelo 1 Alelo 1	G G	
														<small>IPR Uirapuru</small>
Rico 23	Meso-americano	Preto	7,43	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 2	A G	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 2 Alelo 2	A A	Alelo 1 Alelo 1	G G	
														<small>Rico 23</small>
BRS Esplendor	Meso-americano	Preto	8,90	Alelo 2 Alelo 2	T T	Alelo 1 Alelo 2	A G	Alelo 2 Alelo 2	A A	Alelo 2 Alelo 2	A A	Alelo 1 Alelo 1	G G	
														<small>BRS Esplendor</small>

BRS Pitanga	Meso-americano	Roxo	7,97	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 2	A G	Alelo 1 Alelo 1'	G G	Alelo 2 Alelo 2	A A	Alelo 1 Alelo 1	G G		
BRS Vereda	Meso-americano	Rosinha	8,80	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 2	A G	Alelo 1 Alelo 1'	G G	Alelo 2 Alelo 2	A A	Alelo 2 Alelo 2	A A		
CNF RS 15558	Meso-americano	Rosinha	13,52	Alelo 2 Alelo 2	T T	Alelo 1 Alelo 2	A G	Alelo 2 Alelo 2	A A	Alelo 2 Alelo 2	A A	Alelo 2 Alelo 2	A A		
BRS Agreste	Meso-americano	Mulatinho	11,23	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 1	G G	Alelo 1 Alelo 1'	G G	Alelo 1 Alelo 1	T T	Alelo 2 Alelo 2	A A		
BRS Marfim	Meso-americano	Mulatinho	13,53	Alelo 1 Alelo 1	C C	Alelo 1 Alelo 2	A G	Alelo 1 Alelo 1'	G G	Alelo 2 Alelo 2	A A	Alelo 1 Alelo 1	G G		

BGF 11369	Andino	Rajado	17,80	Alelo 1	C	Alelo 1	G	Alelo 1	G	Alelo 1	T	Alelo 1	G
				Alelo 1	C	Alelo 1	G	Alelo 1'	G	Alelo 1'	T	Alelo 1'	G

