

**MAPEAMENTO DE QTLs EM FEIJOEIRO,  
POR MEIO DE MARCADORES RAPD, EM  
DIFERENTES AMBIENTES**

**LEONARDO CUNHA MELO**

**2000**

CONFIDENTIAL

SECRET

CONFIDENTIAL

SECRET

CONFIDENTIAL

SECRET

50353  
35414

**LEONARDO CUNHA MELO**

**MAPEAMENTO DE QTLs EM FEIJOEIRO, POR MEIO DE  
MARCADORES RAPD, EM DIFERENTES AMBIENTES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de plantas, para obtenção do título de "Doutor".

Orientador  
Prof. Dr. João Bosco dos Santos

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2000

REPOSICIONAMENTO DE DOCUMENTOS DE ARQUIVAMENTO  
REPOSICIONAMENTO DE DOCUMENTOS DE ARQUIVAMENTO

REPOSICIONAMENTO DE DOCUMENTOS DE ARQUIVAMENTO  
REPOSICIONAMENTO DE DOCUMENTOS DE ARQUIVAMENTO  
REPOSICIONAMENTO DE DOCUMENTOS DE ARQUIVAMENTO

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Melo, Leonardo Cunha

Mapeamento de QTLs em feijoeiro, por meio de marcadores RAPD, em diferentes ambientes / Leonardo Cunha Melo. -- Lavras : UFLA, 2000.  
148p. : il.

Orientador: João Bosco dos Santos.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Feijão. 2. Phaseolus vulgaris. 3. Marcador-RAPD. 4. Mapeamento de QTLs.  
5. Melhoramento genético. 6. Interação QTLs x ambiente. I. Universidade  
Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.6523

**LEONARDO CUNHA MELO**

**MAPEAMENTO DE QTLs EM FEJJOEIRO, POR MEIO DE  
MARCADORES RAPD, EM DIFERENTES AMBIENTES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de plantas, para obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 01 de setembro de 2000

Dr. Daniel Furtado Ferreira - UFLA

Dr. Magno Antonio Patto Ramalho - UFLA

Dra. Ângela de Fátima Barbosa Abreu - EMBRAPA/EPAMIG

Dr. Luiz Antônio dos Santos Dias - CEPEC/DBG/UFV

  
Prof. Dr. João Bosco dos Santos  
Orientador

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA

DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL

Este documento é propriedade do  
Estado e não pode ser vendido,  
reproduzido ou publicado sem  
a autorização expressa do  
Departamento de Economia Rural.

Este documento é propriedade do

Estado e não pode ser vendido,

reproduzido ou publicado sem

a autorização expressa do

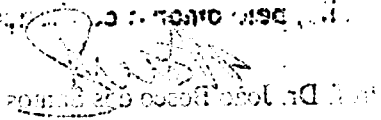
Departamento de Economia Rural.

Este documento é propriedade do

Estado e não pode ser vendido,

reproduzido ou publicado sem

a autorização expressa do



Departamento de Economia Rural

MINAS GERAIS - BRASIL

**A minha esposa Patrícia, que com muito amor e compreensão  
compartilhou comigo essa conquista;**

**Ao meu filho Mateus, que com seu carinho e alegria me incentivou a  
prosseguir e lutar pelos meus objetivos;**

**Aos meus pais, Gentil e Maria Helena, pelo amor e incentivo em todas  
etapas da minha vida;**

**Aos meus irmãos, Leandro, Cristiane e Gentil Eduardo, eternos  
companheiros;**

**A todos da família, pelo amor e confiança dedicados**

**DEDICO**

MEMORANDUM

A Date

of the University of California, Los Angeles

obtained

information from the University of California, Los Angeles

obtained from the University of California, Los Angeles

information from the University of California, Los Angeles

information from the University of California, Los Angeles

information from the University of California, Los Angeles

information from the University of California, Los Angeles

information from the University of California, Los Angeles

information from the University of California, Los Angeles

information from the University of California, Los Angeles

information from the University of California, Los Angeles

information from the University of California, Los Angeles

information from the University of California, Los Angeles

information from the University of California, Los Angeles

information

information



## AGRADECIMENTOS

À Deus.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia pelo apoio durante a fase de análise e elaboração dessa tese de doutorado.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), em especial a EPAMIG/Patos de Minas, pelo apoio na condução deste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) que financiou parte deste trabalho.

Ao orientador, professor João Bosco dos Santos pelas oportunidades, ensinamentos, confiança e amizade demonstrados durante todos esses anos.

Aos professores Daniel Furtado Ferreira e Magno Antonio Patto Ramalho pelas orientações e contribuições dadas durante toda a realização deste trabalho.

Aos pesquisadores Luiz Antônio dos Santos Dias e Ângela de Fátima Barbosa Abreu, pelas sugestões apresentadas.

Aos professores do Departamento de Biologia da Universidade Federal de  
Lavras, em especial aos professores do curso de Genética e Melhoramento de  
Plantas, pela amizade e ensinamentos transmitidos.

À pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
(EMBRAPA/MILHO E SORGO) Dra. Cláudia Teixeira Guimarães pela valiosa  
colaboração na utilização dos programas de mapeamento.

Aos amigos, e meus primeiros orientados, José Wilacildo de Matos, Ana  
Luíza Monteiro Castanheira e Jair Moura Duarte pela ajuda e incentivos na  
condução desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular DBI/UFLA.

Aos amigos do curso de Genética e Melhoramento de Plantas.

Aos amigos de outros cursos de pós-graduação pelo convívio e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, pelos auxílios prestados.

A todos que não foram citados mas contribuíram para o sucesso desse  
trabalho, os meus sinceros votos de gratidão

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Tipos de marcadores moleculares.....	7
2.2 Mapeamento utilizando marcadores moleculares.....	12
2.3 Mapeamento molecular de poligenes (QTLs).....	19
2.4 Marcadores moleculares em genética quantitativa.....	26
2.5 Utilização de marcadores moleculares no melhoramento de plantas.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Material genético.....	39
3.2 Ambientes de avaliação das famílias e procedimentos experimentais...	39
3.3 Características avaliadas.....	40
3.4 Análise estatística dos experimentos.....	41
3.5 Extração de DNA.....	43
3.6 Obtenção dos marcadores RAPD.....	44
3.7 Teste de distorção mendeliana dos marcadores RAPD.....	45
3.8 Identificação de marcadores ligados a QTLs com análise de regressão linear múltipla.....	46
3.9 Análise estatística para detecção dos QTLs.....	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1 Avaliações fenotípicas.....	50
4.1.1 Época de florescimento.....	51

4.1.2	Peso de 100 sementes.....	56
4.1.3	Reação ao oídio e mancha angular.....	60
4.1.4	Produtividade de grãos.....	68
4.2	Avaliação molecular.....	74
4.2.1	Identificação de marcadores RAPD ligados a QTLs por meio de análise de regressão linear múltipla.....	80
4.2.1.1	Análise de regressão para época de florescimento.....	80
4.2.1.2	Análise de regressão para peso de 100 sementes.....	84
4.2.1.3	Análise de regressão para reação à mancha angular.....	89
4.2.1.4	Análise de regressão para reação ao oídio.....	92
4.2.1.5	Análise de regressão para produtividade de grãos.....	96
4.2.2	Mapa de ligação dos marcadores RAPD.....	102
4.2.3	Mapeamento de QTLs utilizando a metodologia do intervalo composto (CIM).....	104
4.2.3.1	Mapeamento para época de florescimento.....	106
4.2.3.2	Mapeamento para peso de 100 sementes.....	110
4.2.3.3	Mapeamento para reação à mancha angular.....	106
4.2.3.4	Mapeamento para reação ao oídio.....	119
4.2.3.5	Mapeamento para produtividade de grãos.....	123
4.3	Considerações Gerais.....	128
5	CONCLUSÕES.....	133
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135

## RESUMO

MELO, Leonardo Cunha. Mapeamento de QTLs em feijoeiro, por meio de marcadores RAPD, em diferentes ambientes. Lavras: UFLA, 2000. 148p. (Tese de Doutorado em Genética e Melhoramento de plantas)\*

A identificação de marcadores moleculares ligados a genes controladores de características quantitativas (QTLs) no feijoeiro pode auxiliar os programas de melhoramento, aumentando sua eficiência e agilidade. Com base nisso, os objetivos desse trabalho foram: 1- identificar e mapear, em diferentes ambientes, marcadores RAPD ligados aos locos gênicos controladores da produtividade de grãos, peso de sementes, época de florescimento e reação ao oídio (*Erysiphe polygoni*) e a mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*), em uma população segregante de feijoeiro; 2- Avaliar a existência de interação QTL por locais e por época de plantio para os caracteres considerados; 3- comparar os processos de detecção dos marcadores ligados aos QTLs utilizando o método de mapeamento por intervalo composto e o método de regressão múltipla, com seleção das variáveis regressoras (marcadores) pelo processo de Stepwise. Para isso, foram utilizadas 196 famílias (linhagens recombinantes) do cruzamento entre os genitores Carioca e Flor de Mayo. A partir da geração  $F_1$  foram obtidas as gerações  $F_2$  até  $F_5$ , sendo a população conduzida através do método da população. Na geração  $F_5$  foram coletadas sementes de 196 plantas individuais, tomadas ao acaso, originando 196 famílias  $F_{5,6}$  que, multiplicadas originaram as linhagens recombinantes utilizadas nesse trabalho. Essas linhagens foram avaliadas em duas épocas tradicionais de cultivo do feijoeiro (seca e inverno) nos anos de 1996, 1997 e 1998, em dois locais de Minas Gerais (Patos de Minas e Lavras). Para a avaliação fenotípica das famílias, foram conduzidos sete experimentos, onde foi utilizado o delineamento experimental em látice quadrado (14 x 14) parcialmente balanceado, com duas repetições. Cada parcela foi constituída por duas linhas de 2 metros de comprimento com espaçamento de 50 cm entre as linhas e 15 sementes por metro linear. Foram obtidas as estimativas dos parâmetros genéticos dessa população, bem como identificados os marcadores ligados a QTLs com a análise de regressão múltipla e com o mapeamento por intervalo composto nos vários ambientes (locais e épocas de cultivo), inferindo, assim, sobre o efeito da interação genótipos por ambientes na expressão dos QTLs. Os resultados mostraram que existe a possibilidade de identificar marcadores moleculares ligados a características de importância agrônoma em feijoeiro utilizando tanto

---

\* Comitê de orientação: João Bosco dos Santos - UFLA (Orientador); Daniel Furtado Ferreira - UFLA (Co-orientador)

o processo de regressão múltipla quanto o processo de mapeamento por intervalo composto. As interações de QTLs por locais e QTLs por épocas de cultivo foram expressivas, sendo identificados poucos QTLs com maior estabilidade. A maioria dos QTLs com maior estabilidade foram aqueles de menor efeito. O método da regressão múltipla identificou mais marcadores ligados a QTLs do que o processo de mapeamento por intervalo composto, não havendo grande concordância entre os resultados apresentados pelos dois métodos, para a maioria das situações. Os marcadores que se mostraram mais promissores para serem utilizados na seleção assistida foram OPE-20 (891 pb) e OPO-13 (1318 pb) para época de florescimento; OPN-02 (1445 pb) e OPM-06 (1096 pb) para peso de sementes; OPR-02 (832 pb), OPD-08 (759 pb) e OPN-10 (851 pb) para reação a oídio; OPN-02 (436 pb) e OPN-07 (1072 pb) para reação a mancha angular e OPO-20 (933 pb) e OPN-07 (1445 pb) para produtividade de grãos.

## ABSTRACT

MELO, Leonardo Cunha. Mapping QTLs in common beans under different environments utilizing RAPD markers. Lavras: UFLA, 2000. 148p. (Doctorate Thesis in Genetic and Plant Breeding)\*

The identification of molecular markers linked to genes which control quantitative trait loci (QTLs) in common beans is expected to play important role in breeding programs involving this crop species, enhancing efficiency and speed of selection procedures. Based on such premises, the objectives of this research were: 1 - to identify and to map, under different environments, RAPD markers linked to loci that control grain yield, seed weight, days to flowering and reactions to powdered mildew (*Erysiphe polygoni*) and to angular leaf spot (*Phaeoisariopsis griseola*), in a segregating population of common beans; 2 - to evaluate the existence of interactions involving QTL's with locations and planting dates for the traits; 3 - to compare detection procedure of markers linked to QTLs utilizing the methods of mapping and multiple regression, with selection of the regression variables (markers) by stepwise analysis. One hundred and ninety-six families (recombinant inbred lines) derived from the cross of cultivars Carioca x Flor de Mayo were used to attain the objectives proposed. From the F<sub>1</sub> generation and through bulk population propagation, it was obtained generations F<sub>2</sub> through F<sub>5</sub>. In the F<sub>5</sub> generation seed of individually plants, taken randomly were harvested, originating 196 F<sub>5,6</sub> families, the recombinant inbred lines used in this research. Such advanced lines were evaluated under two traditional sowing dates for common beans ("drought" and winter) in 1996, 1997 and 1998 and in two locations: Patos de Minas and Lavras, both in the State of Minas Gerais, Brazil. For the phenotypic evaluation of the families, seven field experiments were conducted. The experimental design used was a 14 x 14 partially balanced Square Lattice, with two replications. Each plot consisted of two 2m-long rows spaced 50 cm apart and sowed with 15 seeds per meter. Genetic population parameters were estimated and markers linked to QTL's were identified through multiple regression analysis and through composite interval mapping, under the several environments (locations and sowing times), making possible to infer the effects of the genotype by environment interactions on the expression of QTLs. Results indicated that there is the possibility of identifying molecular markers related to agronomic traits in common beans, utilizing both multiple regression technique and composite interval mapping. The interactions of QTLs by locations and

---

\* Guidance Committee: João Bosco dos Santos - UFLA (Major Professor); Daniel Furtado Ferreira - UFLA (Adviser)

QTLs by sowing times were significant, and a few QTLs with great stability were identified. QTLs of great effect did not show environmental stability and the majority of the QTLs with great stability were those of minor effects. Multiple regression analysis identified a greater number of QTL's-linked markers than the process of composite interval mapping. There was no coincidence between results obtained with the two methods for the majority of the traits studied. Molecular markers which were considered of greater potential use on marker-assisted selection were: OPE-20 (891 pb) and OPO-13 (1318 pb) for day to flowering; OPN-02 (1445 pb) and OPM-06 (1096 pb) for weight of 100 seeds; OPR-02 (832 pb), OPD-08 (759 pb) and OPN-10 (851 pb) for reaction to powdery mildew; OPN-02 (436 pb) and OPN-07 (1072 pb) for reaction to leaf blight and finally OPO-20 (933 pb) and OPN-07 (1445 pb) for grain yield.



## 1 INTRODUÇÃO

O melhoramento genético da maioria das espécies, até o momento, é predominantemente realizado por meio das técnicas clássicas de melhoramento. Essas técnicas se fundamentam basicamente na realização de hibridações artificiais para gerar populações segregantes, que são conduzidas por um método específico e submetidas a vários ciclos de seleções, visando a identificação de genótipos recombinantes superiores. No entanto, com o desenvolvimento de cultivares superiores, fica cada vez mais difícil identificar novos genótipos que superam as cultivares já utilizadas. Dessa forma, a identificação de marcadores moleculares ligados a genes controladores de características quantitativas poderá auxiliar os programas de melhoramento da grande maioria das espécies, inclusive do feijoeiro, aumentando sua eficiência e agilidade.

Com o desenvolvimento das técnicas biotecnológicas, principalmente as relativas aos marcadores moleculares, houve também um aprimoramento de seus usos e aplicações. A área de melhoramento genético de plantas poderá ser muito beneficiada com o desenvolvimento dos estudos de mapeamento utilizando marcadores moleculares, principalmente com a utilização dessas informações na seleção assistida por marcadores. Muitas dificuldades da análise fenotípica podem ser reduzidas através da identificação direta de genótipos. Isso é possível quando se utilizam marcadores moleculares que segregam conjuntamente com os alelos de interesse. Segundo Ferreira e Grattapaglia (1996), a tendência geral do melhoramento genético de plantas é a integração das técnicas clássicas com aquelas mais modernas da biotecnologia, levando-se em consideração as vantagens e limitações de cada uma delas. Os autores ressaltam que a integração efetiva de metodologias de marcadores moleculares no processo de melhoramento representa, ainda, o principal desafio da área.

O processo de melhoramento genético é geralmente iniciado pela identificação de cultivares com características indesejáveis e que, portanto, precisam ser alteradas. Quando os alelos dessas características são de genes qualitativos, ou seja, com maior efeito fenotípico, a identificação de recursos genéticos pode ser feita com uma simples avaliação fenotípica dos materiais. Neste tipo de característica, a introdução dos alelos favoráveis na cultivar deficiente pode ser efetuada rapidamente pelos procedimentos clássicos de melhoramento. Neste caso, os melhoristas têm uma clara relação entre genótipo e fenótipo para monitorar a presença dos alelos favoráveis na população. Todavia, os procedimentos clássicos de melhoramento têm algumas limitações em estabelecer uma relação entre genótipo e fenótipo quando a característica é controlada por um número muito grande de genes, devido, principalmente, ao pequeno efeito de cada gene e ao grande efeito do ambiente na expressão da característica. Normalmente, os modelos genéticos utilizados para análise destes caracteres requerem uma série de restrições que nem sempre conseguem ser atendidas, o que limita a utilização das informações obtidas.

Embora um importante número de caracteres nas espécies vegetais seja controlado por genes qualitativos, a maioria das características com importância econômica é de natureza quantitativa, ou seja, resulta da ação conjunta de vários locos gênicos. A variação fenotípica destes caracteres apresenta uma distribuição contínua, em vez de classes fenotípicas discretas. Estes locos são denominados de locos de caracteres quantitativos (QTL = quantitative trait loci). O estudo destes caracteres é feito através de análises e inferências estatísticas que procuram descrever as características de uma distribuição fenotípica contínua. Uma alternativa a essas análises consiste na identificação dos QTLs por marcadores moleculares, os quais poderão fornecer informações mais precisas e detalhadas

da arquitetura dos genes que controlam caracteres quantitativos, bem como auxiliar na seleção de genótipos superiores.

A principal dificuldade no mapeamento de QTLs é o fato de vários fatores genéticos e ambientais afetarem a expressão final do fenótipo. Assim, os delineamentos experimentais devem envolver a medição e genotipagem de um grande número de indivíduos ou famílias para permitir a precisão necessária à identificação do QTL (Ferreira e Grattapaglia, 1996; Paterson, 1998). Agora, na utilização de marcadores moleculares para seleção deve-se considerar a consistência da informação de ligação entre marcador e QTL em diferentes populações, a interação entre QTLs e ambientes e também a possibilidade de seleção simultânea para várias características. Desta forma, os marcadores constituem uma ferramenta que poderá contribuir para aumentar a eficiência do processo seletivo e, conseqüentemente, maximizar os ganhos com a seleção.

Os objetivos desse trabalho foram: 1- identificar e mapear, em diferentes ambientes, marcadores RAPD ligados aos locos gênicos controladores da produtividade de grãos, peso de 100 sementes, época de florescimento e reação ao oídio (*Erysiphe polygoni*) e a mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*), em uma população segregante de feijoeiro; 2- Avaliar a existência de interação QTL por locais e por época de plantio para os caracteres considerados; 3- comparar os processos de detecção dos marcadores ligados aos QTLs utilizando o métodos de mapeamento por intervalo composto e de regressão linear múltipla, com seleção das variáveis regressoras (marcadores) pelo processo de Stepwise.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

O mapeamento genético de uma espécie consiste na geração de um conjunto ordenado de informações sobre as sequências do DNA que cobrem a totalidade ou parte do seu genoma. O processo de mapeamento baseia-se na hipótese de que a co-transmissão de dois marcadores reflete a proximidade entre eles, uma vez que a probabilidade de ocorrer permutas genéticas entre dois marcadores é menor, quanto mais próximos eles estiverem localizados. Esse fato torna possível ordenar linearmente a informação genética ao longo dos cromossomos. Dessa forma, o mapa genético consiste na representação da ordem e da distância entre genes em grupos de ligação genética.

O processo de mapeamento genético pode ser considerado um detalhamento das análises genéticas que já vêm sendo realizadas desde que a genética foi considerada como ciência. Vallejos (1994) relata que foi Gregor Mendel, em 1866, que conduziu a primeira análise genética com feijoeiro. O autor comenta que Mendel estudou a herança do hábito de crescimento, e da cor da vagem em progênies oriundas do cruzamento entre *Phaseolus vulgaris* e *P. nanus* com o objetivo de confirmar os resultados encontrados com ervilha. Infelizmente, seus estudos posteriores sobre o controle genético da coloração da flor e tegumento da semente foram obstruídos por ter usado um híbrido interespecífico de *P. nanus* e *P. coccineus*, pois sabe-se, atualmente, que este cruzamento produz segregação distorcida. Mais tarde, Shaw e Norton (1918) usaram cruzamentos interespecíficos e determinaram que a cor do tegumento da semente é controlada por múltiplos genes independentes. Poucos anos depois, Sax (1923) foi o primeiro a reportar uma ligação entre uma característica qualitativa (cor do tegumento da semente) e uma característica quantitativa (tamanho da semente), e utilizá-la como marcador genético para auxiliar na

seleção para tamanho da semente. Em seguida surgiram vários mapas de ligação com caracteres morfológicos, sendo identificados 48 locos gênicos em 13 grupos de ligação (Basset, 1991). No entanto, dois desses grupos de ligação, são bastante pequenos, cobrindo apenas em torno de 5 cM, sugerindo que o número de grupos de ligação está muito próximo do número básico de cromossomos do feijoeiro.

O aumento do potencial produtivo das cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*) tem sido baixo e gradual, apesar da ampla variação existente na maioria dos caracteres, inclusive para produtividade de grãos (Nienhuis e Singh, 1988). No Brasil, um dos principais motivos para este baixo incremento no potencial produtivo tem sido a exigência do mercado consumidor por cultivares com grãos tipo carioca. Esta exigência reduz muito as fontes de germoplasma a serem utilizadas, limitando a variabilidade genética disponível aos programas de melhoramento.

A utilização de materiais semelhantes ficou mais evidenciada após Singh (1988 e 1989) agrupar o germoplasma de feijão em doze conjuntos gênicos, e posteriormente (Singh, Gepts e Debouck, 1991) reagrupar em seis raças. Assim, ficou claro que os melhoristas têm, tradicionalmente, realizado as suas hibridações envolvendo materiais de um único conjunto gênico. Singh (1988) observou que a variabilidade para produtividade de grãos, seus componentes primários e outros caracteres agronômicos era maior entre os conjuntos gênicos do que dentro de cada um. Abreu (1997), avaliando várias características morfo-agronômicas do feijoeiro, observou maior variabilidade entre do que dentro dos genótipos de diferentes conjuntos gênicos. Duarte, Santos e Melo (1999) realizaram um estudo da divergência genética com genótipos de diferentes raças de feijoeiro, por meio de marcadores RAPD, e também observaram maior variabilidade entre do que dentro dos diferentes grupos gênicos. Assim, a

utilização dos cruzamentos de genitores de diferentes conjuntos gênicos aumenta a probabilidade de se encontrar populações com maior variabilidade genética, aumentando as chances de identificar combinações genotípicas com maior potencial produtivo e estabilidade de produção. Singh (1988) relata ainda que cruzamentos realizados entre cultivares de conjuntos gênicos de mesmo centro de origem, e com hábito de crescimento e tamanho de semente semelhantes, possuem maior frequência de recombinantes desejáveis, pois a utilização de genitores muito discrepantes pode levar à baixa adaptação da população segregante e, conseqüentemente, a dificuldades no processo de seleção. Teoricamente, os cruzamentos de cultivares de conjuntos gênicos diferentes, mas do mesmo centro de origem, devem contribuir para aumentar o ganho com a seleção, principalmente quando se dispõe de genitores adaptados. A identificação de alelos ou regiões cromossômicas de interesse, por meio de mapeamento pode contribuir para aumentar a eficiência do processo de melhoramento genético do feijoeiro.

A maioria das estratégias de mapeamento de QTLs está baseada no uso de populações segregantes com grande variabilidade, oriundas do cruzamento de duas linhagens puras, geneticamente divergentes e fenotipicamente extremas em relação às características quantitativas de interesse. Com o cruzamento dessas linhagens, homocigotas para alelos alternativos nos QTLs e polimórficas com relação a marcadores moleculares, é gerada uma população segregante que pode ser uma  $F_2$ , retrocruzamento, linhagens puras recombinantes ou linhagem dihaplóides. Um certo número de indivíduos desta população segregante é avaliado para as características quantitativas de interesse e genotipado por marcadores moleculares distribuídos em intervalos regulares ao longo do genoma (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

O feijoeiro é uma espécie diplóide ( $n=11$ ) com cromossomos relativamente pequenos (Zheng et al., 1991) e um genoma pequeno, estimado em

637 mbp ou 0,66 pg/1C (Arumuganatham e Earle, 1991). Segundo Vallejos, Sakiyama e Chase (1992), no feijoeiro, a razão média da distância física em relação a distância de mapa é de 530 kbp/cM. Como o feijoeiro possui aproximadamente 637 mbp estima-se que o tamanho total do mapa do feijoeiro seja em torno de 1200 cM.

Também foi estimado, via cinética de reassociação do DNA, que 60% do genoma do feijoeiro é composto de sequências de cópia simples (Talbot et al., 1984). Essas características facilitam a obtenção de marcadores moleculares distribuídos uniformemente por todos os cromossomos, o que aumenta a possibilidade de detecção dos QTLs que participam do controle genético dos caracteres quantitativos, pois pode-se conseguir mapas genéticos altamente saturados.

## **2.1 Tipos de marcadores moleculares**

Em muitos casos, os efeitos ambientais mascaram os efeitos genotípicos, de modo que o fenótipo fornece uma medida imprecisa do genótipo da planta. Para minimizar este problema, surgiram técnicas de identificação e manipulação de genes de interesse em programas de melhoramento, denominadas técnicas de marcadores moleculares. Os primeiros marcadores moleculares utilizados foram as isoenzimas, as quais têm a vantagem de fornecer respostas rápidas e de baixo custo, porém são de uso limitado devido ao pequeno número de locos disponível para análise. Posteriormente, surgiram os marcadores de DNA, que detectam diferenças na constituição genética entre indivíduos. Como a variação a nível de DNA é muito grande, estes métodos conseguem detectar um alto grau de polimorfismo.

Sakiyama (1993) relata que a palavra marcadores tem sido utilizada para designar fatores morfológicos, fisiológicos, bioquímicos ou genéticos passíveis de

serem identificados e que permitem o estudo comparativo de genótipos e de suas progênes. A identificação de marcadores morfológicos apropriados e o estudo comparativo de genótipos de ervilha e de suas progênes possibilitaram a Mendel lançar os fundamentos da genética. A aplicação de marcadores na investigação científica precede o conhecimento da própria genética. A utilização de marcadores moleculares no estudo de espécies vegetais tem sido crescente nas últimas décadas. Isoenzimas e proteínas têm fornecido importantes informações a respeito da estrutura do genoma, variabilidade genética entre e dentro de espécies, origem e dispersão de espécies cultivadas e mapeamento de genes de interesse agrônomo. Ultimamente, os marcadores de DNA têm sido amplamente explorados por apresentarem várias características desejáveis ao estudo dos marcadores. Eles apresentam herança Mendeliana simples e ausência de efeitos epistáticos. Além disso, podem ser obtidos em grande número e, por resultarem de estudos com o próprio DNA (genótipo) e não com seus produtos (fenótipos), apresentam resultados experimentais consistentes, independentemente das condições de ambiente ou do estágio de desenvolvimento das plantas amostradas.

Existem, atualmente, vários tipos de marcadores de DNA, que são geralmente conhecidos por suas siglas. Inicialmente, a utilização de enzimas de restrição permitiu a análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição de DNA ("Restriction Fragment Length Polymorphism" - RFLP) (Botstein et al., 1980). RFLP é uma técnica que se baseia no polimorfismo gerado por digestão do DNA genômico das plantas com enzimas de restrição. Após essa digestão, ocorre a separação dos fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, que, em seguida, são transferidos para uma membrana de nylon e hibridizados com uma sonda marcada.

O desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia utilizando uma DNA polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) (Mullis e Faloona,



1987; Saiki et al., 1988) levou à descrição de outras classes de marcadores moleculares, como o polimorfismo de DNA amplificado ao acaso ("Random Amplified Polymorphic DNA" - RAPD) (Williams et al., 1990).

Outros marcadores que estão sendo utilizados com os mais variados objetivos são os baseados em: locos hipervariáveis de minisatélites (sequências de 15 a 100 pares de bases repetidas) (Jeffreys, Wilson e Thein, 1985); na amplificação de microsátélites (sequências de 2 a 5 pares de bases repetidas) (Beckmann e Soller, 1990); e também no polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados ("Amplified Fragment length Polymorphism" - AFLP) (Zabeau, 1993). O AFLP e os microsátélites estão entre as mais recentes aplicações do método de PCR.

Os marcadores RAPD são considerados os de maior potencialidade na utilização em melhoramento genético de plantas, principalmente devido a sua facilidade de utilização, rapidez, versatilidade e baixo custo (Ferreira e Grattapaglia, 1996). Assim, esse tipo de marcador possibilita gerar grande número de informações em curto tempo e por um custo acessível, possibilitando sua fácil utilização na maioria dos programas de melhoramento. Desta forma, será dada ênfase nesta classe de marcador molecular.

Sakiyama (1993) relata que a tecnologia de marcadores RAPD tem sido largamente utilizada em estudos com plantas e consiste, basicamente, na extração de DNA de indivíduos, na amplificação ou não amplificação de fragmentos destes DNAs pela técnica de PCR, na separação de fragmentos amplificados de comprimentos diferentes por eletroforese em gel de agarose e na visualização de bandas correspondentes a regiões (locos) amplificados do genoma por meio de coloração dos fragmentos de DNA com brometo de etídio, diretamente no gel. PCR é um método "in vitro" de síntese de ácido nucléico pelo qual, um segmento particular de DNA pode ser especificamente replicado. Este método envolve dois

"primers" de oligonucleotídeos que delimitam o fragmento de DNA a ser amplificado e ciclos repetidos de desnaturação de DNA a alta temperatura, anelamento dos "primers" e síntese de uma nova cadeia de DNA através da DNA polimerase. Estes "primers" hibridizam-se às duas fitas opostas e são orientados de tal forma que a síntese de DNA pela polimerase ocorre ao longo da região entre os "primers". Uma vez que os produtos sintetizados são também complementares aos "primers", sucessivos ciclos de amplificação dobram a quantidade do segmento de DNA sintetizado nos ciclos anteriores. Como resultado, há um acúmulo exponencial daquele fragmento da ordem de  $2^n$ , onde  $n$  é o número de ciclo de amplificação executado (Saiki, 1990).

Em geral, cada "primer" dá origem à amplificação de vários locos discretos no genoma, tornando o método um eficiente meio de se obter polimorfismo entre indivíduos. Os polimorfismos são identificados como fragmentos de DNA amplificados a partir de um indivíduo e não amplificados a partir do outro. Estes fragmentos apresentam herança mendeliana simples, sendo que quase todos os marcadores RAPD são dominantes. Sakiyama (1993) comenta que esses marcadores podem, raramente, se comportar como codominantes devido à amplificação de segmentos de DNA de comprimentos diferentes no mesmo loco. Em casos de homozigose para uma determinada região cromossômica, marcadores dominantes RAPD ligados em repulsão podem funcionar como marcadores codominantes. A confiabilidade com que os indivíduos heterozigotos podem ser identificados depende do grau com que os dois marcadores encontram-se ligados. Bandas de RAPD podem também ser transformadas em alelos codominantes combinando-se amplificação de DNA seguida de clivagem dos fragmentos de RAPD com enzimas de restrição e posterior análise em gel de agarose.

Comparados aos RFLPs, os marcadores RAPDs são mais eficientes para trabalhos de mapeamento em virtude da simplicidade do método. Entretanto, eles podem apresentar algumas desvantagens decorrentes de possível falta de confiabilidade e repetibilidade de resultados, dominância (não identificam o heterozigoto), baixo número de alelos identificados para cada loco (apenas dois), falta de homologia entre genomas de espécies relacionadas e falta de especificidade para regiões particulares do genoma (Ferreira e Grattapaglia, 1996). Além disso, esses autores relatam outros problemas como: 1- baixo poder de um "primer" específico em discriminar entre sítios de amplificação distintos; 2- competição entre diferentes sítios de amplificação por substrato e enzima, de maneira que a presença de certos segmentos pode interferir com a amplificação de outros, num processo equivalente à interação epistática entre marcadores, o que influencia o fenótipo final das bandas; 3- problemas relacionados com a padronização de condições de amplificação, sendo que variações laboratoriais podem interferir muito nos resultados finais.

Os marcadores baseados nas regiões amplificadas de sequências caracterizadas (Sequence Characterized Amplified Regions - SCAR) foram desenvolvidos com o objetivo de eliminar estas desvantagens.

Segundo Sakiyama (1993), SCAR é um fragmento de DNA genômico em um loco específico que é identificado por amplificação em PCR usando-se um par de "primers" de oligonucleotídeos específicos. Se um fragmento amplificado por meio do RAPD for de interesse, ele é clonado e as suas duas extremidades são sequenciadas. Estas informações são utilizadas para construção de dois "primers" específicos com aproximadamente 24 nucleotídeos, que resultam em uma amplificação reproduzível destes locos quando altas temperaturas de anelamento são utilizadas. A vantagem do marcador SCAR sobre o RAPD é que ele detecta somente um loco específico, portanto sua amplificação é menos sensível às

condições de reação e ele pode, potencialmente, ser transformado em marcador codominante. De forma semelhante ao SCAR, um par específico de "primers" pode ser construído de modo que somente um produto de amplificação seja produzido e que este seja correspondente ao alelo de interesse. A identificação das plantas que amplificam o alelo e das que não amplificam é feita pela simples leitura da concentração de DNA da amostra após 30 a 40 ciclos de PCR, eliminando a necessidade de executar a eletroforese.

## **2.2 Mapeamento utilizando marcadores moleculares**

A construção de mapas genéticos em plantas tem sido objeto de estudos desde as primeiras décadas deste século, e seu desenvolvimento tem sido paralelo ao desenvolvimento das técnicas de marcadores moleculares. Segundo Oliveira (1998), a limitação encontrada pelos geneticistas pioneiros em mapeamento foi o número restrito de marcadores morfológicos. Um segundo momento na história do mapeamento surgiu com a aplicação do polimorfismo de proteínas, mais especialmente as proteínas com atividade enzimática. Com o avanço das técnicas em biologia molecular, os mapas genéticos receberam os marcadores de DNA, que permitiram a análise de um número de marcadores muito maior do que o obtido com marcadores morfológicos e bioquímicos. Em função disso, os mapas genéticos se estenderam a várias espécies, além de acumular um grande número de marcadores nas espécies que já haviam sido mapeadas previamente.

Um importante conceito para o mapeamento genético é o significado de polimorfismo. Polimorfismo refere-se a presença de mais de uma forma alélica, seja ela detectada fenotipicamente, por meio de um marcador morfológico, ou genotipicamente, por meio de marcadores moleculares. Para que marcadores moleculares possam ser mapeados em um grupo de ligação, é preciso que as

populações apresentem polimorfismo. As formas de detecção do polimorfismo molecular são variáveis conforme o tipo de marcador utilizado.

A técnica de RFLP foi usada no mapeamento de diversas espécies como milho (Bur et al., 1988; Helentjaris, Weber e Wright, 1988), cana de açúcar (Silva et al., 1994) ervilha (Ellis et al., 1992), algodão (Reinisch et al., 1994), cacau (Lanaud et al., 1995) trigo (Devos, Millan e Gale, 1993), arroz (Causse et al., 1994) e feijão (Valejos et al., 1992; Nodari et al., 1993). Os microsatélites foram usados para mapeamento de milho (Kantety et al., 1995) e os marcadores AFLP têm sido muito utilizados para mapeamento de alta densidade em soja (Kein et al., 1997).

Para garantir o polimorfismo na população a ser utilizada no estudo, normalmente o mapeamento de espécies autógamas necessita de genitores os mais divergentes. A análise dos possíveis genitores com vários tipos de marcadores moleculares pode ser uma boa alternativa para se escolher aqueles com maior potencial de gerar populações altamente polimórficas, principalmente quando se tratar de cruzamentos intraespecíficos (Young, 1994).

O tamanho da amostra da população a ser trabalhada também é de fundamental importância na consistência das informações geradas no mapeamento. Desta forma, a resolução do mapa e a capacidade de se determinar a sequência dos marcadores está diretamente relacionada com o tamanho da amostra da população. No entanto, muitas vezes o tamanho da amostra fica limitada pela quantidade de sementes disponíveis ou pela quantidade de amostras de DNA que podem ser efetivamente processadas em um laboratório. Mas é certo que a amostra da população deve ter o maior tamanho possível dentro da capacidade de trabalho da equipe envolvida. As amostras com menos de 50 indivíduos muito provavelmente terão uma baixa resolução de mapeamento, principalmente na detecção de QTLs de pequeno efeito (Young, 1994).

Estudos de mapeamento são normalmente desenvolvidos em populações  $F_2$  segregantes ou provenientes de retrocruzamentos, com uma progênie de pelo menos 100 indivíduos (Oliveira, 1998). Essas populações são as mais simples e rápidas de serem obtidas para a maioria das espécies de plantas, embora, em alguns casos, a esterilidade dos híbridos  $F_1$  seja um fator limitante para algumas combinações de genitores, principalmente em cruzamentos interespecíficos.

Uma grande contribuição para as metodologias de mapeamento foi o uso de linhagens endogâmicas recombinantes (Burr et al., 1988). Young (1994) considera este tipo de população como a melhor opção para construção de mapas moleculares. O autor comenta que o maior problema das populações de plantas  $F_2$  e retrocruzamentos é a sua condição temporária, pois as sementes oriundas desses indivíduos constituem uma nova população. Essa limitação poderia ser superada com a utilização de cultura de tecidos ou formação de mistura (bulk) de plantas  $F_3$  que representassem as plantas  $F_2$ , que proporcionassem uma constante fonte de material vegetal para isolamento de DNA. Todavia, isso dificulta ou impossibilita a mensuração de caracteres como parte do mapeamento de QTLs em vários locais ou por vários anos com populações  $F_2$  ou de retrocruzamentos. Por essas razões, trabalhar com populações permanentes para o mapeamento genético é a situação ideal, e a utilização das linhagens recombinantes seria a melhor estratégia (Young, 1994).

Linhagens recombinantes são produzidas pela autofecundação, por cinco ou seis gerações, de plantas de uma geração  $F_2$  derivada do cruzamento de duas linhagens endogâmicas contrastantes. Esse processo leva ao desenvolvimento de linhagens que contêm diferentes blocos de ligações em relação aos genitores originais. A diferença entre os blocos de ligação em cada linhagem recombinante é a base para a análise de ligação (Young, 1994). O mapeamento é feito pela caracterização de cada linhagem pela sua composição alélica em um dado número

de locos. Esta caracterização permite estabelecer um padrão de distribuição de linhagens para cada loco e a ligação entre dois locos é detectada quando estes apresentam padrões similares (Burr et al., 1988).

Segundo Burr et al. (1988), as vantagens das linhagens recombinantes sobre as populações segregantes de plantas  $F_2$  são as seguintes: 1- esta população pode ser considerada permanente, pois a segregação já está praticamente terminada, portanto pode ser usada indefinidamente para o mapeamento; 2- toda a informação gerada é cumulativa, fazendo com que novos dados possam ser inseridos no mapa existente; 3- as linhagens recombinantes podem ser avaliadas em vários ambientes, possibilitando uma avaliação mais precisa; 4- maior possibilidade de recombinação devido as várias gerações de autofecundação que as famílias são submetidas, possibilitando a identificação de marcadores fortemente ligado aos QTLs.

Atualmente, já estão disponíveis vários mapas genéticos contendo marcadores moleculares em diversas espécies autógamas. A maior parte destes mapas é relativos a marcadores do tipo RFLP, em virtude dessa técnica já estar sendo utilizada a mais tempo.

Como acontece na maioria das espécies, o primeiro mapa molecular de arroz foi construído com marcadores morfológicos, em seguida adicionados algumas izoenzimas e logo após veio a inclusão de algumas séries de trissômicos primários. Em 1988, foi relatado o primeiro mapa de ligação com marcadores RFLP, contendo 135 marcadores. Desde então, um grande número de novos locos de marcadores RFLP têm sido mapeados em arroz. Os mapas moleculares em arroz dispõem de cerca de 1000 locos, espalhados em 1222 cM. Nesses mapas são utilizadas tanto sondas genômicas como sondas de cDNA. Um problema frequente na construção desse mapas é a subestimação da taxa de recombinação, em virtude do uso de cruzamentos interespecíficos, que deve corresponder a

apenas 70 % do genoma do material adaptado. Assim estima-se que esse mapa na verdade cubra em torno de 1750 cM no germoplasma cultivado (Tanksley, 1994a).

Alguns estudos mostraram que em soja existe um baixo nível de polimorfismo quanto a sítios de restrição (Apuya et al., 1988). Isso fez com que Kein et al. (1990) realizassem um cruzamento interespecífico para diminuir esse problema, e a partir de uma população F<sub>2</sub> obtida de um cruzamento envolvendo *Glycine max* e *G. soja* foi possível identificar 26 grupos de ligação, totalizando cerca de 1200 cM. Shoemaker (1994) apresentou um mapa integrado, contendo, além de locos RFLP, locos izoenzimáticos e marcadores genéticos clássicos, com 24 grupos de ligação, cobrindo cerca de 2900 cM.

Em alface, Michelmore, Kesseli e Ryder (1994) relataram a existência de 42 sistemas enzimáticos, com cerca de 70 locos, mas somente 22 apresentaram polimorfismo. Quanto aos marcadores RFLP, o uso de 1900 clones aleatórios de cDNA propiciou a detecção de 143 locos, enquanto 400 clones genômicos identificaram mais 9, totalizando 152 locos. Os autores utilizaram ainda 200 “primers” aleatórios de marcadores RAPD no mapeamento de alface e obtiveram uma média de 8 bandas (potenciais marcadores) por “primer”. No entanto, devido à alta sensibilidade dos marcadores RAPD às condições de reação, a análise com marcadores RAPD resultou em uma menor relação de locos polimórficos efetivamente aproveitados no mapa/marcador analisado, quando comparado com os marcadores RFLP. Mesmo assim, mais de 250 locos de marcadores RAPD já foram mapeados e em torno de 130 já foram efetivamente integrados no mapa genético de alface. O mapa genético de alface compreende 319 locos, sendo 152 de marcadores RFLP, 130 marcadores RAPD, 7 izoenzimas, 19 locos de resistência a doenças e 11 marcadores morfológicos, cobrindo aproximadamente 1200 cM (Kesseli, Paran e Michelmore, 1994).



Dentre as espécies autógamas, o tomate é provavelmente o que tem o mapeamento molecular mais desenvolvido, principalmente com a utilização de cruzamentos interespecíficos. Tanksley (1994b) apresentou um mapa com mais de 1000 locos marcadores, cobrindo um total de 1276 cM.

Os mapas moleculares em trigo estão bastante saturados, principalmente com marcadores RFLP, contendo, no mínimo, uma marca a cada 20 cM, cobrindo aproximadamente 3000 cM, sendo que este valor parece estar abaixo da estimativa do tamanho total do genoma do trigo que para alguns autores não é inferior a 3500 cM (Hart, 1994).

Em amendoim, Halward, Stalker e Kochert (1994) apontam que o mapa de RFLP disponível cobre um total de 1400 cM (aproximadamente 80% do genoma da espécie), com uma distância média de 20 cM entre marcas, espalhadas em 12 grupos de ligação. Futuramente, com a maior saturação do mapa, espera-se que esse número de grupos de ligação diminua para 10, que corresponde ao número básico de cromossomos do genoma dessa espécie ( $2n = 4x = 40$ ).

O mapa molecular de cevada se desenvolveu rapidamente durante poucos anos. Existem aproximadamente 600 marcadores RFLP mapeados nos sete cromossomos e esse número cresce constantemente. Os estudos atuais e futuros com mapeamento de cevada podem facilitar o desenvolvimento de trabalhos nas áreas de genética e melhoramento de cevada (Kleinhofs e Kilian, 1994).

No caso do feijoeiro, inicialmente foi desenvolvido um mapa de ligação rudimentar com a maioria dos marcadores sendo morfológicos e alguns poucos marcadores izoenzimáticos (Basset, 1991). Análises eletroforéticas da maior proteína de reserva das sementes do feijoeiro (faseolina) e algumas isoenzimas identificaram dois grandes grupos: o Mesoamericano e o Andino (Gepts et al., 1986). Estudos com marcadores RFLP mostraram que algumas sondas podem ser usadas para diferenciar esses dois grupos de feijoeiros, pois apesar de detectarem

baixos níveis de polimorfismo dentro de cada grupo, essas sondas conseguiram detectar polimorfismo entre os grupos (Chase, Ortega e Vallejos, 1991).

Após a construção desse primeiro mapa, um novo mapa de ligação baseado principalmente em marcadores RFLP foi construído usando famílias de retrocruzamento de um material de origem mesoamericana (XR-235-1-1) com outro material andino (Calima) (Vallejos, Sakiyama e Chase, 1992). Esse mapa molecular envolveu 227 locos de marcadores RFLP, dois locos de proteínas das clorofilas a/b, um loco de pigmentação, nove izoenzimas e nove proteínas de sementes. Também foram usados nesse mapa dois “primers” de marcadores RAPD (OPA-01 e OPA-10). O marcador OPA-01 foi mapeado no cromossomo D e o marcador OPA-10 no cromossomo F, portanto não estavam ligados. Em resumo, esse grupo de ligação do feijoeiro incluiu 250 marcadores, compreendendo 980 cM, que representam aproximadamente 82% do genoma do feijoeiro (Vallejos, Sakiyama e Chase, 1992).

Nodari et al. (1993) apresentaram um mapa genético do feijoeiro construído a partir da geração  $F_2$  derivada do cruzamento entre uma cultivar brasileira (Jalo) e uma linhagem desenvolvida no CIAT (BAT 93). Esses genitores foram escolhidos por apresentarem diferenças em relação a origem evolutiva, tipos de faseolina e para várias características agrônômicas. Foram analisadas a segregação de 152 marcadores, incluindo 115 locos de RFLP, 7 izoenzimáticos, 8 RAPD e outros marcadores morfológicos e de resistência a doenças. Identificaram-se 143 marcadores para 15 grupos de ligação, sendo que 9 marcadores não se ligaram a nenhum grupo de ligação. O intervalo médio entre marcadores foi de 6,5 cM, e somente um intervalo entre os marcadores mapeados foi maior que 30 cM, sendo que esse mapa cobriu uma região de 827 cM, que representa, aproximadamente, 69% do genoma do feijoeiro.

Vallejos (1994) comenta que o feijoeiro pode ser um bom modelo para estudo de QTLs que afetam a produtividade. Segundo Burr et al. (1988), a aplicação de marcadores moleculares utilizando linhagens recombinantes, por meio do cruzamento entre linhagens contrastantes, poderá ajudar na identificação dos fatores genéticos que afetam a produtividade e as respostas desses fatores a diferentes ambientes.

Em feijoeiro, os marcadores RAPD tem sido utilizados principalmente para marcação de alelos de resistência a doenças importantes, como por exemplo resistência a algumas raças de antracnose (Adam-Blondon et al., 1994; Young e Kelly, 1997 e Alzate-Marim et al., 1997; Castanheira et al. 1999), ferrugem (Haley et al., 1993; Park et al., 1997), mancha angular (Carvalho et al., 1997), podridão cinzenta do caule ou macrofomina (Olaya, Abawi e Weeden, 1996; Miklas et al., 1998), crestamento bacteriano (Miklas et al., 1996), vírus-do-mosaico-comum (Haley, Afanador e Kelly, 1994; Jonson et al., 1997) e vírus-do-mosaico-dourado (Urrea et al., 1996; Miklas et al., 1996).

### **2.3 Mapeamento molecular de poligenes (QTLs)**

A idéia de usar um gene marcador para sistematicamente caracterizar e mapear poligenes individuais que controlam caracteres quantitativos foi proposta por Thoday (1961). Esta metodologia baseava-se na hipótese de que se a segregação de um gene marcador pode ser usada para detectar e estimar o efeito de um poligene ligado, e se genes marcadores estiverem espalhados através do genoma de uma espécie, será possível mapear e caracterizar todos os poligenes que afetam um caráter. Atualmente, sabe-se que esta proposta, na prática, é difícil de se concretizar e está repleta de problemas. Para a maioria das espécies, somente poucos caracteres monogênicos foram mapeados e identificados como possíveis marcadores. Mesmo nas espécies em que se encontra um maior número

desses marcadores, eles não foram muito utilizados por não serem adequados para o estudo de caracteres quantitativos. Frequentemente, os genes marcadores tem um grande efeito no caráter quantitativo ligado ao poligene, provocando uma sub ou superestimativa do efeito do poligene. Por exemplo, em plantas, um marcador monogênico comum é o nanismo, que com certeza causa um grande efeito em quase todas as características das plantas. Outro problema com genes marcadores disponíveis é que pode ocorrer dominância, epistasia e ausência de polimorfismo na população natural (Tanksley, 1993).

A descoberta que as formas alélicas das enzimas (aloenzimas ou isoenzimas) podem ser separadas em gel de eletroforese e detectadas com corante de atividade histoquímica iniciou a fase dos marcadores moleculares na pesquisa genética (Tanksley, 1993). Genes que codificam enzimas foram investigados através de polimorfismos em populações naturais e mapeados geneticamente usando técnicas de eletroforese, independente de alguma mudança fenotípica. Na década de 80, marcadores isoenzimáticos foram empregados de forma generalizada e o mapeamento dos poligenes nestes estudos foi consideravelmente mais bem sucedido do que os estudos envolvendo os marcadores morfológicos (Edwards, Stuber e Wendel, 1987). As estratégias para uso de marcadores de isoenzimas para mapeamento de poligenes foram muito similares às propostas por Thoday (1961). A diferença no sucesso foi devida à natureza dos marcadores.

Outras vantagens na utilização de marcadores moleculares no mapeamento genético vieram com a introdução de marcadores genéticos baseados na molécula de DNA. Assim como as isoenzimas, a variação alélica para marcadores baseados no DNA normalmente tem efeito fenotípico não detectável. No entanto, a variação genética obtida pela análise direta do DNA pode gerar polimorfismo superior ao conseguido com as isoenzimas.

Com o advento dos marcadores moleculares, tornou-se possível mapear e caracterizar os poligenes de caracteres quantitativos. As propriedades que diferenciam os marcadores moleculares dos marcadores morfológicos e que têm permitido o rápido avanço do mapeamento dos poligenes são neutralidade fenotípica, polimorfismo, abundância, codominância e ausência de epistasia (Tanksley, 1993).

Populações  $F_2/F_3$  ou originadas de retrocruzamentos têm sido usadas mais comumente para detecção de ligação entre marcadores moleculares e genes que controlam caracteres quantitativos (Stuber, Edwards e Wendel, 1987). Em espécies onde a endogamia severa é tolerada, as populações de linhagens têm sido obtidas por autofecundação sucessivas (Burr e Burr, 1991). As grandes vantagens são que as linhas homozigóticas podem ser multiplicadas e testadas com maior precisão para os caracteres quantitativos e a multiplicação de genótipos permite estudos de interação QTLs x ambientes e facilita o intercâmbio de material entre pesquisadores (Lanza, Guimarães e Schuster, 2000).

Um aspecto importante na detecção de QTLs por meio de marcadores genéticos é a necessidade de que a população sob estudo esteja em desequilíbrio de ligação, caso contrário os alelos dos locos marcadores e dos poligenes ocorrem em combinações equivalentes à distribuição independente, e os poligenes não são detectados. Tanksley (1993) comenta que em virtude disso é necessária a geração de populações especiais, como retrocruzamentos,  $F_2$ ,  $F_3$ , linhagens recombinantes, entre outras. O problema é que nos casos das autofecundações sucessivas (linhagens recombinantes), existe um menor desequilíbrio de ligação devido à maior oportunidade de recombinação meiótica (Burr e Burr, 1991). No entanto, Bearzoti (1998) comenta que em espécies autógamas o desequilíbrio de ligação dissipa-se com uma taxa lenta, tendo um limite diferente de zero. Este aspecto pode constituir uma vantagem no tocante à utilização de populações compostas

de linhagens recombinantes, bem como à utilização de marcadores moleculares no melhoramento de plantas autógamas.

Existem vários procedimentos estatísticos para determinar se um poligene está ligado a um loco marcador. Um desses procedimentos consiste em dividir a população em diferentes classes genotípicas baseado nos genótipos do marcador e então usar a correlação estatística para determinar se os indivíduos de um genótipo diferem significativamente comparados com os indivíduos com outros genótipos com respeito ao caráter medido. Se os fenótipos diferirem significativamente então se conclui que os genes que afetam o caráter estão ligados ao loco marcador usado para dividir a população. O procedimento é então repetido para os outros locos marcadores distribuídos por todo o genoma para detectar todos os QTLs possíveis. Normalmente, não é possível determinar se o efeito detectado com um marcador é devido a um ou mais genes ligados que afetam um caráter. Por esta razão, o termo loco de caráter quantitativo (QTL) foi usado para descrever a região do cromossomo (usualmente definida por ligação ao gene marcador) que tem um efeito significativo em um caracter quantitativo. Determinar se um QTL é devido a um ou mais genes é um dos mais difíceis aspectos da genética quantitativa (Tanksley, 1993).

Entre as estratégias para se detectar os poligenes sob delineamentos genéticos com cruzamentos controlados gerando desequilíbrio de ligação, a técnica mais simples é a análise por ponto. Essa pode ser definida como uma simples aproximação para detectar um QTL através da análise de dados usando um marcador de cada vez. Esta aproximação é frequentemente referida como uma análise por ponto e não requer um completo mapa de ligação do marcador molecular. Por esta razão é que a análise por ponto foi a primeira a ser utilizada para marcadores moleculares em estudos de genética quantitativa (Edwards, Stuber e Wendel, 1987). As desvantagens da análise por ponto são (Tanksley,

1993): (a) o QTL pode estar muito distante do gene marcador e portanto menos provável será a detecção estatística deste QTL devido a permuta entre o marcador e o QTL, (b) a magnitude do efeito de algum QTL detectado poderia ser subestimada, devido, também, à recombinação entre o loco marcador e o QTL. Estes problemas são minimizados quando um grande número de marcadores moleculares segregantes é usado cobrindo todo o genoma (usualmente com intervalos menores que 15 cM). Nestas condições, algum QTL poderia estar fortemente ligado a um marcador molecular.

Com a grande disponibilidade de mapas moleculares de ligação cobrindo todo o genoma, está sendo possível superar alguns problemas existentes na análise por ponto. Com a utilização dos mapas de ligação, Lander e Botstein (1989) propuseram um método chamado de análise por intervalo. Em vez de analisar a população com um marcador por vez, grupos de marcadores ligados são analisados simultaneamente com respeito aos seus efeitos nos caracteres quantitativos. Usando marcadores ligados para análise, é possível compensar a recombinação entre os marcadores e o QTL, aumentando a probabilidade estatística de detectar o QTL e também proporcionando uma precisa estimativa do efeito do QTL no caráter.

A máxima vantagem da análise por intervalo sobre a análise por ponto ocorre quando marcadores ligados estão razoavelmente separados (mais de 20 cM de distância). Nestas condições, provavelmente existirão algumas permutas entre os marcadores e o QTL, que podem ser compensadas pela análise por intervalo. Quando a densidade de marcadores é alta ( $< 15$  cM), as análises por ponto ou intervalo dão resultados praticamente idênticos. Quando os locos marcadores são muito distantes ( $> 35$  cM), constantemente a análise por intervalo se mostra ineficiente para detectar QTL no intervalo entre dois locos marcadores (Sutber et. al., 1992). É importante salientar que qualquer que seja a abordagem estatística,

o mapeamento de intervalos clássico sofre um problema de resolução quando dois QTLs estão ligados próximos um ao outro no mesmo cromossomo (Ferreira e Grattapaglia, 1996). No mapeamento por intervalo clássico, outros QTLs ligados ao intervalo em questão interferem no processo de estimação, podendo detectar falsos QTLs. Jansen (1993) e Zeng (1993), independentemente, propuseram que se usasse um modelo de regressão múltipla para eliminar esses efeitos, criando assim a metodologia de mapeamento por intervalo composto, que tem esse nome por utilizar em seus procedimentos uma composição das técnicas de regressão com o método da máxima verossimilhança.

O enfoque do mapeamento por intervalo composto impede que QTLs adjacentes, com algum marcador entre eles, interfiram nos valores estimados em cada intervalo. Já quando existem dois QTLs adjacentes, sem marcadores entre eles, a eliminação dessa interferência não é possível. No entanto, em mapas saturados não é comum a ocorrência de QTLs adjacentes sem a presença de marcadores entre eles.

Além desses métodos de mapeamento já comentados, existe uma nova metodologia denominada de mapeamento por intervalos múltiplos (Kao, Zeng e Teasdale, 1999). Essa metodologia incorpora parâmetros de epistasia ao modelo. É um método múltiplo, pois simultaneamente busca estimativas de número, posições, efeitos e interações entre diferentes QTLs. As vantagens dessa metodologia são maior eficiência e precisão na identificação de QTLs; ajuda a entender e identificar padrões epistáticos; os efeitos dos QTLs são estimados sem viés, na presença de epistasia, ao contrário dos outros métodos; pode aumentar a eficiência da seleção assistida por marcadores, pois capitaliza os efeitos epistáticos entre os QTLs.

A capacidade de detectar um QTL é uma função da magnitude do seu efeito sobre a característica, do tamanho da população segregante avaliada, da



frequência de recombinação entre marcador e QTL, bem como da herdabilidade da característica. Evidentemente, quanto maior o efeito, o tamanho da população e a herdabilidade, e mais próximo o marcador do QTL, mais fácil será a sua detecção (Ferreira e Grattapaglia, 1996, Lanza, Guimarães e Schuster, 2000).

Ainda que os delineamentos genéticos sejam relativamente simples, existem complexas metodologias estatísticas propostas ao longo de várias décadas para se detectar a ligação entre marcadores e QTLs. Segundo Ferreira (1995), os métodos mais comuns na literatura são: (a) diferença de valores fenotípicos médios das classes de marcadores de uma população  $F_2$  ou gerações derivadas  $F_{2.3}$  ou  $F_{2.4}$  (análise de variância); (b) estimativas de máxima verossimilhança; e (c) regressão linear e não linear múltipla. O autor, por meio da simulação computacional, concluiu que a análise de regressão linear múltipla utilizando o processo de seleção de marcadores (Backward) foi o método mais eficiente para estimação dos efeitos genotípicos associados aos marcadores e mapeamento dos QTLs.

Apesar ter ocorrido um avanço tecnológico na velocidade e exatidão das análises dos marcadores moleculares, essas ainda podem ser consideradas demoradas e caras, principalmente quando se utiliza uma grande amostra da população. Quando a análise de marcadores moleculares é cara e demorada, é possível usar uma modificação aproximada para detectar o QTL. A aproximação proposta por Lander e Botstein (1989) começa com uma grande amostra da população segregante ( $F_2$  ou retrocruzamento). Faz-se a medição de um caráter quantitativo de interesse em cada indivíduo da população. Realiza-se a análise do marcador somente para indivíduos extremos da distribuição (indivíduos com os menores e maiores valores para o caráter). Se a frequência alélica de algum marcador diferir significativamente entre as duas subpopulações extremas,

conclui-se que um QTL que está controlando um caráter de interesse está localizado perto do marcador.

A vantagem da análise da distribuição de extremos está na economia de tempo e recursos na análise dos marcadores moleculares. As desvantagens da análise da distribuição de extremos, segundo Tanksley (1993), são: (a) mais indivíduos segregantes devem ser analisados para fenótipos quantitativos para coletar indivíduos suficientes nos extremos da distribuição. (b) embora a análise da distribuição de extremos seja eficiente para a detecção de ligação entre o loco marcador e o QTL, ela é pouco eficiente na determinação de efeitos individuais dos QTLs; (c) normalmente é impraticável o uso da distribuição de extremos para mapear mais de um caráter quantitativo quando os indivíduos com fenótipos extremos para um caráter não representam os extremos do outro caráter.

#### **2.4 Marcadores moleculares em genética quantitativa**

A genética quantitativa tem produzido várias aproximações estatísticas para estimar o número de genes segregantes, em uma população, que afetam uma característica. Estas estimativas são baseadas em parâmetros da distribuição fenotípica em populações segregantes e normalmente dependem de várias pressuposições, como efeito igual, distribuição independente dos genes, ação gênica similar (interação alélica) e mínimo efeito da epistasia. Na prática, uma ou mais destas pressuposições são normalmente violadas, tornando as estimativas imprecisas.

Através dos métodos de detecção da ligação entre QTL e marcador molecular, pode-se também mensurar os efeitos dos QTLs que controlam o caráter em estudo, investigando, assim, a arquitetura das características quantitativas (número, posição, ação gênica, magnitude de efeito e interações entre QTLs).

Segundo Tanksley (1993), as estimativas do número de poligenes usando marcadores moleculares são confiáveis, embora com algumas limitações. Esta aproximação simplesmente soma o número de QTLs detectados num estudo e usa este valor como uma estimativa do número de poligenes segregantes que afetam um caráter nesta população. As limitações desta aproximação são: (a) somente genes com grande efeito fenotípico são detectados. Os genes de efeitos menores podem ser detectados se a população segregante for grande. Portanto, os marcadores moleculares quase sempre subestimam o número de genes que afetam um caráter. (b) Usando populações de tamanho padrão (< 500 indivíduos) dois ou mais poligenes distantes aproximadamente 20 cM normalmente aparecem como um único QTL. Desta forma, este fato também contribui para subestimar o número de genes.

A vantagem do marcador molecular para estimar o número de poligenes segregantes na população está nos resultados quantificáveis e testáveis. Eles são quantificáveis porque as variâncias genética e fenotípica acumuladas atribuídas ao QTL detectado podem ser estimados. Por exemplo, se cinco QTLs são detectados e juntos explicam 70% da variância genética, os outros QTLs (provavelmente de menor efeito) devem explicar os 30% da variância remanescente. Os resultados são testáveis porque o experimento pode ser repetido (mesmo em diferentes ambientes) para observar se o número de QTLs é o mesmo. Também podem-se criar novas populações para estudar algum QTL em mais detalhes, para determinar se este QTL é composto por mais que um gene (Tanksley, 1993).

Atualmente, com a grande disponibilidade de informação molecular disponível, é fácil constatar que os diferentes poligenes apresentam uma magnitude de efeitos desiguais para a maioria dos caracteres. Todavia, no passado, esta pressuposição foi difícil de ser testada. Em 10 anos, foram

acumulados dados de estudos com marcadores estabelecendo definitivamente que poligenes possuem efeitos bastantes diferentes e que a pressuposição de poligenes com efeitos iguais (requeridos por alguns modelos estatísticos) não é válida. O mais surpreendente foi ter encontrado alguns casos com uma grande proporção da variação quantitativa explicada pela segregação de poucos QTLs maiores. A proporção cumulativa explicada pelos vários QTLs detectados experimentalmente, tem variado de 30 até 70%, dependendo de uma série de fatores, tais como o cruzamento analisado (Beavis et al., 1991), a característica avaliada (Edwards et al., 1992), o delineamento experimental e a resolução do mapa em termos de número de marcadores (Edwards, Stuber e Wendel, 1987). Não foi incomum encontrar QTL que explicava mais de 20% da variação fenotípica em uma população e valores tão altos quanto 42% têm sido reportados para um único QTL (Doebley e Stec, 1991). Vale ressaltar que a variância fenotípica inclui a variância ambiental, de forma que a variância genética atribuída a este QTL deve ser maior.

QTLs com efeitos maiores têm sido identificados para a maioria dos caracteres estudados, mas a maioria é de pequeno efeito. Este resultado é lógico se considerarmos que a maioria dos genes segregantes numa população provavelmente tem algum pequeno efeito em outros caracteres. Este pequeno efeito de um QTL pode ainda ser detectado pelos marcadores dependendo de alguns fatores: (a) distância entre o marcador e o QTL, pois quanto mais próximos estiverem menor será a recombinação, e portanto mais poderoso é este marcador. (b) Tamanho da população segregante. Quanto maior a população, maior a probabilidade de detecção de QTL com menor efeito fenotípico. (c) Herdabilidade do caráter. Quanto maior o efeito do ambiente em um caráter, isto é, menor a herdabilidade, menor a probabilidade de um QTL de grande efeito ser detectado. (d) Nível de probabilidade de erro usado para declarar um efeito do

QTL como significativo. Quanto mais alta a precisão exigida, menores as chances de identificar QTLs de efeito menor. Em milho, usando uma população  $F_2$  com 1700 indivíduos e um nível de probabilidade de erro de 5%, detectou-se um QTL que contribuiu com apenas 0,3% da variância fenotípica (Edwards, Stuber e Wendel, 1987). Em experimentos com populações pequenas e alto nível de probabilidade de erro, não se detectam, normalmente, QTLs que expliquem menos de 3% da variância fenotípica (Tanksley, 1993).

Em espécies diplóides, os alelos de um loco podem interagir de várias maneiras para produzir o fenótipo de indivíduo, sendo definida como interação alélica. Na genética clássica, os alelos são considerados, principalmente, como dominantes ou recessivos. Todavia, em populações naturais, os alelos são raramente totalmente dominantes ou recessivos. Na natureza, as interações alélicas para genes específicos variam da dominância completa para a recessividade total até a sobredominância (Tanksley, 1993). A genética quantitativa tem proposto vários parâmetros para descrever tais ações gênicas contínuas. O grau médio de dominância ( $d/a$ ) é a forma mais comum para descrever o grau com que os genótipos heterozigotos assemelham-se aos pais homozigotos.

De Vicente e Tanksley (1993) estimaram a ação gênica de 74 QTLs individuais identificados num estudo de mapeamento em tomate. Observou-se uma contínua distribuição da ação gênica, semelhante ao encontrado em outros estudos de mapeamento (Edwards, Stuber e Wendel, 1987; Stuber et al., 1992).

A fecundação cruzada é um modo de reprodução que promove a heterozigose, e frequentemente está associada à heterose ou vigor híbrido. Já a autofecundação promove a homozigose, e está associada com a depressão por endogamia.

A base genética da heterose tem sido debatida por muitos anos e ainda não foi resolvida. No entanto, a maioria dos geneticistas acredita que a heterose seja devida à dominância, apesar de existir muita controvérsia sobre a participação da sobredominância na sua manifestação. A sobredominância se refere à situação em que os indivíduos heterozigotos são superiores aos homozigotos em um determinado loco, implicando em interação sinérgica entre os produtos gênicos sintetizados pelos dois alelos. Estudos recentes de mapeamento de QTLs têm encontrado alguns genes que controlam a heterose que estão esclarecendo alguns destes questionamentos (Tanksley, 1993).

Um desses estudos de mapeamento de locos para heterose foi realizado por Stuber et al. (1992). Famílias de milho, derivadas de um híbrido F<sub>1</sub> altamente heterótico, foram avaliadas para produção de grãos e vários outros caracteres. Os resultados indicaram que a maioria dos QTLs detectados para produção apresentaram interação alélica de sobredominância, mostrando que a sobredominância é um importante fator na heterose desta espécie. A limitação deste e, virtualmente, de todos os estudos envolvendo o mapeamento de QTLs em gerações iniciais é que um QTL demonstrando sobredominância pode, na verdade, ser composto por dois ou mais locos com alelos dominantes e recessivos, resultando em uma pseudo-sobredominância. Reforçando essa hipótese, Tanksley (1993) comenta que apesar de existirem casos de QTLs com sobredominância, a grande maioria dos QTLs identificados apresentava interação alélica do tipo dominante.

Para caracteres poligênicos, existe um grande número de interações epistáticas envolvendo dois, três ou mais locos. Nos estudos de genética quantitativa, a variância genética atribuída à epistasia tem sido frequentemente referida como interação genótipo por genótipo. No passado, raramente era possível determinar se tais interações ocorriam entre poligenes específicos ou

medir exatamente a natureza específica desta interação. Tanksley (1993) relata que disponibilidade de mapas e de QTLs individualmente caracterizados via técnicas de mapeamento molecular aumentou as possibilidades de detectar e caracterizar as interações entre QTLs específicos. A significância dessa interação sugere que o efeito devido a vários QTLs não é simplesmente a soma de seus efeitos independentes.

Teoricamente, todas as possíveis interações entre QTLs podem ser medidas através da análise de variância ou estatísticas correlatas. Na prática, Tanksley (1993) comenta que existem vários problemas (alguns muito sérios) com esta aproximação: 1- As amostras das populações segregantes são normalmente pequenas para estimativa da interação dos vários locos. Para medir a interação entre dois locos, todos os genótipos possíveis para estes locos devem estar presentes na população com frequência suficiente para realizar as comparações estatísticas. 2- O número potencial de interações multilocos é muito grande, requerendo muitos testes estatísticos. 3- O efeito das interações poderia ser subestimado devido à recombinação entre o QTL e o marcador molecular, nos quais as análises foram baseadas. Este problema pode ser minimizado pelo uso de alta densidade de marcadores moleculares fortemente ligados aos QTLs, facilitando sua análise e detecção.


A despeito das limitações das estimativas dos efeitos epistáticos entre locos específicos, um interessante modelo está surgindo dos estudos com marcadores moleculares de caracteres quantitativos. Os resultados obtidos em alguns trabalhos (Edwards, Stuber e Wendel, 1987; Stuber et al., 1992) sugerem que fortes interações epistáticas são exceções e não regra para poligenes. No entanto, Vienne et al. (1994), estudando a expressão gênica de 42 polipeptídeos, observaram que as interações epistáticas estavam envolvidas no controle genético de 14% das proteínas estudadas.

O fenótipo de um indivíduo não é condicionado apenas pelo genótipo, mas também pela interação genótipo com ambiente. Isto sugere que um QTL importante em um ambiente pode não ser tão importante em determinar o fenótipo em outro ambiente. Quando os genótipos são avaliados em mais de um ambiente, existe a possibilidade de identificar e estimar o efeito da interação genótipos por ambientes, sendo considerados como diferentes ambientes, principalmente os vários locais, anos e épocas de cultivos em que os genótipos são avaliados. Em feijoeiro, existem vários trabalhos (Ramalho, Santos e Pereira-Filho, 1988; Takeda, Santos e Ramalho, 1991; Melo, Santos e Ramalho, 1997) que relatam a existência de forte interação de genótipos por ambientes para as principais características utilizadas no melhoramento dessa espécie.

Dois estudos envolvendo mapeamento de QTLs, usando a mesma população em diferentes ambientes, proporcionaram o teste da interação genótipos por ambientes de alguns QTLs. Em milho, sete caracteres agronômicos, incluindo produção de grãos, foram medidos na mesma população, em seis diferentes ambientes, nos Estados Unidos (Stuber et al., 1992). QTLs detectados em um ambiente foram, frequentemente, detectados em outros ambientes, sugerindo uma pequena interação QTLs por ambientes. Um estudo relatado em tomate avaliou uma população segregante em três diferentes ambientes (Paterson et al., 1991). Observou-se que 48% dos QTLs foram detectados em pelo menos dois ambientes e os outros 52% foram detectados em apenas um ambiente. Os QTLs que mostraram maiores efeitos em um ambiente foram também os mais prováveis de se detectar em outro ambiente. Os locais mais similares, com relação ao clima e práticas agrícolas, foram os que mostraram mais QTLs em comum, condizente com o menor efeito da interação genótipos por ambientes.

QTLs para produção de grãos e conteúdo de matéria seca foram identificados em uma população segregante ( $F_2$ ) derivada do cruzamento de duas





linhas elites de milho. A maioria dos QTLs encontrados foi consistente em diferentes locais, indicando que a expressão dos genes que controlam estes caracteres foi independente do ambiente. Observou-se, ainda, que quatro QTLs para produção de grãos explicaram mais de 35% da variação fenotípica, sendo que só o QTL de maior efeito explicou cerca de 24,5% da variação fenotípica (Ajmone-Marsan et al., 1995).

Pode ser muito prematuro tirar alguma conclusão a respeito da interação QTLs por ambientes, mas os três estudos anteriores sugerem que uma grande proporção dos QTLs que afetam um caráter quantitativo em um ambiente pode estar ativa em outro ambiente, e isto é especialmente verdade para os QTLs com maior efeito (Tanksley, 1993). No entanto, Paterniani (1990) mostra que as variações ambientais no Brasil são mais drásticas do que nos Estados Unidos, principalmente quanto às épocas de cultivo, que normalmente apresentam variações climáticas muito intensas, o que sugere um maior efeito da interação genótipos por ambientes. Dessa forma, espera-se menor estabilidade dos QTLs identificados em nossas condições de cultivo.

## **2.5 Utilização de marcadores moleculares no melhoramento de plantas**

Ferreira e Grattapaglia (1996) sugerem que, de uma forma geral, as diversas aplicações de marcadores moleculares em melhoramento genético podem ser distribuídas em aplicações cujos resultados apresentam expectativas de curto, médio e longo prazo. As aplicações de curto prazo envolvem, basicamente, a identificação e discriminação de genótipos (teste de paternidade, proteção de cultivares, pureza genética, monitoramento de fecundação cruzada e avaliação de germoplasma).

Nas aplicações de médio-longo prazo, os marcadores permitem quantificar a variabilidade genética existente na sequência de DNA e

correlacioná-la com a expressão fenotípica em procedimentos de mapeamento genético. Nas aplicações práticas, esta informação molecular gerada na fase analítica (construção de mapas genéticos de ligação, mapeamento genético de QTLs, investigação da arquitetura de características quantitativas) é integrada às metodologias de seleção e recombinação de genótipos como uma ferramenta para promover o avanço genético. É importante salientar que a literatura de marcadores moleculares dispõe de um grande número de estudos de natureza analítica, porém raros são os exemplos de utilização da tecnologia na síntese de materiais melhorados. No entanto, estudos de simulação computacional indicam que a seleção assistida por marcadores moleculares poderá contribuir de forma expressiva para aumentar a eficiência do melhoramento genético de plantas. Esta eficiência, de maneira geral, aumenta com o decréscimo da herdabilidade (Ferreira, 1995). Seleção e recombinação genética auxiliada por marcadores moleculares têm sido frequentemente defendidas na literatura, desde que as técnicas moleculares possibilitaram uma análise genética mais detalhada. Enquanto que para características de herança simples, esta possibilidade tem sido explorada, a prática efetiva da seleção auxiliada por marcadores para características quantitativas ainda constitui uma área em que poucos testes foram efetuados, mesmo em culturas como tomate e milho, nas quais já existe um grande número de estudos de mapeamento de QTLs (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

Um dos primeiros trabalhos sobre a seleção assistida por marcadores foi realizado por Stuber, Goodman e Moll (1982) com a utilização de 8 locos izoenzimáticos em uma população melhorada de milho. Verificou-se que a seleção baseada nesses locos possibilitou o aumento tanto na produtividade de grãos como no número de espigas. No entanto, não houve como saber se as

alterações nessas características foram devidas a ligações com poligenes ou à participação dessas aloenzimas em suas rotas metabólicas.

Nienhuis et. al. (1987) estudaram associação de locos de RFLP com um QTL que confere resistência a insetos, em espécies selvagens de tomate, devido à presença da 2-tridecanona (2 TD). Analisou-se uma população  $F_2$  com 900 indivíduos provenientes do cruzamento de *Lycopersicon esculentum* com *L. var. glabratum* (espécie selvagem), e encontrou-se associação entre pelo menos 3 locos de RFLP e altos teores de 2 TD. Os resultados sugerem que a seleção dos locos de RFLP resultaria numa resposta correlacionada que aumentaria a frequência dos alelos favoráveis associados com a expressão de 2 TD.

Diers et al. (1992) estudaram a associação entre 243 sondas e QTLs para conteúdo de óleo e teor de proteína em soja. A análise foi efetuada em 60 famílias  $F_2$  derivadas do cruzamento de *Glycine max* com *G. soja*. As linhagens foram divididas em 3 classes de acordo com o padrão de bandas das sondas (homozigotas para bandas de *G. max*, homozigotas para bandas de *G. soja* e heterozigotas). Foram encontradas 8 sondas associadas com o teor protéico, sendo que todos os alelos para altos teores foram provenientes de *G. max*, e 9 sondas associadas com o conteúdo de óleo total, com todos os alelos para maior conteúdo de óleo provenientes de *G. soja*.

Edwards et al. (1992) estudaram a associação de 98 sondas e 11 isoenzimas com 18 QTLs (tais como os responsáveis pelo controle genético do peso de grãos, altura da planta, altura da espiga, etc.), utilizando 187 plantas  $F_2$  do cruzamento das linhagens de milho CO 159 x Tx 303. Observou-se que algumas regiões genômicas influenciaram o crescimento da planta nos estágios iniciais de desenvolvimento, outras em estágios mais avançados e outras em ambos. De modo semelhante, os QTLs para produção de grãos também mostraram-se complexos, com alguns locos afetando um caráter simples

relacionado com a produção, como número de fileiras de grãos na espiga, e outros afetando vários caracteres relacionados com a produção de grãos simultaneamente. Dezoito regiões cromossômicas foram relacionadas com a altura de plantas e doze regiões com a produção de grãos. Stuber (1994), utilizando a mesma população de milho do estudo anterior, concluiu que a seleção assistida por marcadores (baseada em 15 locos isoenzimáticos que representavam, no máximo 40%, do genoma) foi tão efetiva quanto a seleção fenotípica, que representam todo o genoma. O autor comenta que isso é um indício de que a utilização de mapas mais saturados, que representem maior parte do genoma, possa trazer resultados ainda melhores. Apesar desses resultados indicarem o grande poder de seleção dos marcadores moleculares, Lande e Tompson (1990) demonstraram, de maneira teórica, que o máximo ganho com a seleção é obtido quando se utiliza a informação molecular associada com a fenotípica, principalmente com a utilização de índices de seleção que considerem os dois tipos de informações.

Reiter (1989) utilizou 93 sondas distribuídas nos 10 cromossomos do milho para estudar a tolerância à deficiência de fósforo. Cinco sondas foram associadas com o caráter, sendo que uma destas, localizada no braço longo do cromossomo 6, explicou 25% da variação fenotípica total. Um modelo de regressão múltipla com 3 dos 5 locos explicou 46% da variação fenotípica total.

Stromberg, Dudley e Rugener (1994) compararam o uso de marcadores moleculares RFLP associados à informação fenotípica no desenvolvimento de um híbrido de milho com o uso exclusivo da informação fenotípica. A seleção assistida por marcadores foi realizada por meio de um índice de seleção que levava em consideração os 8 locos de RFLP e o valor fenotípico de cada família. A seleção assistida por marcadores mostrou-se 3,5 % superior quando realizada em um local e 3 % inferior quando realizada em outro local, sendo que, na média

dos dois locais, a eficiência da seleção assistida por marcadores foi semelhante à seleção fenotípica.

Edwards e Johnson (1994) relataram a utilização de marcadores moleculares no melhoramento de milho doce. Foi realizada uma avaliação das famílias F<sub>4</sub> com relação a 61 locos de RFLP distribuídos ao longo do genoma, com avaliação de desempenho dessas famílias com relação a várias características. A partir dessa avaliação, foram feitos contrastes com o objetivo de detectar a ligação dos QTLs aos locos marcadores. Os resultados mostraram ganhos significativos para a maioria das características quando se utilizou a seleção assistida por marcadores.

Backes et. al. (1995) avaliaram vários caracteres em cevada em campo experimental, por 3 anos em dois locais. De um total de 431 sondas de RFLP utilizadas, 50 foram polimórficas e usadas para construir o mapa de ligação. Os QTLs identificados explicaram de 5 a 52% da variância genética. Ocorreu segregação transgressiva para todos os caracteres estudados.

Taram, Michaels e Pauls (2000), usando os marcadores RFLP, SSR, AFLP e RAPD, identificaram 29 QTLs associados com caracteres agronômicos no feijoeiro comum. Foram identificados QTLs para hábito de crescimento, dias para o florescimento, dias para maturação, acamamento de plantas e produtividade de grãos, mostrando a possibilidade de identificar marcadores moleculares úteis ao processo de melhoramento do feijoeiro. Esses marcadores, se utilizados em um programa de seleção assistida por marcadores, podem contribuir para o aumento da eficiência de seleção, e conseqüentemente possibilitar um incremento nos ganhos com a seleção, aumentando a eficiência do programa de melhoramento.

A seleção fenotípica das espécies domesticadas tem sido praticada consciente ou inconscientemente por milênios, porém os avanços da genética

molecular prometem aumentar a eficiência das técnicas de melhoramento até então utilizadas. Por isso, existem muitas razões para que a genética molecular nunca substitua os atuais processos de melhoramento, mas deve estar integrada a esses para que se possa obter o máximo de ganho, de forma econômica e racional (Lande e Thompson, 1990).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Material genético**

Foram utilizadas 196 famílias do cruzamento entre os genitores Carioca (conjunto gênico 3) e Flor de Mayo (conjunto gênico 6). A cultivar Carioca apresenta sementes pequenas, de coloração bege com estrias marrons, hábito de crescimento indeterminado do tipo III e faseolina tipo S, e a Flor de Mayo apresenta sementes médias, de coloração bege com estrias rosas, hábito de crescimento indeterminado tipo IV e faseolina S (Singh, 1988).

Os cruzamentos entre os genitores foram realizados de forma semelhante à descrita por Ramalho, Santos e Zimmermann (1993). A partir da geração  $F_1$  foram obtidas as gerações  $F_2$  até  $F_5$ , sendo conduzidas através do método da população. Na geração  $F_5$  foram coletadas sementes de 196 plantas individuais, tomadas ao acaso, originando 196 famílias  $F_{5,6}$ . Estas famílias foram multiplicadas por um ciclo, originando as famílias  $F_{5,7}$ .

#### **3.2 Ambientes de avaliação das famílias e procedimentos experimentais**

As famílias foram avaliadas em duas épocas tradicionais de cultivo do feijoeiro (seca e inverno) nos anos de 1996, 1997 e 1998 em dois locais: fazenda experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), em Patos de Minas, MG, e na área experimental do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG. Lavras situa-se a 918 metros de altitude,  $21^{\circ} 14' S$  de latitude e  $45^{\circ} 00' W$  de longitude, e Patos de Minas situa-se a 856 metros de altitude,  $18^{\circ} 35' S$  de latitude e  $46^{\circ} 31' W$  de longitude.

Para a avaliação fenotípica das famílias, foram conduzidos sete experimentos (2 no inverno em Lavras, 1 no inverno em Patos de Minas, 2 na seca em Lavras e 2 na seca em Patos de Minas). Em todos os experimentos foi

utilizado o delineamento experimental em látice quadrado (14 x 14) parcialmente balanceado, com duas repetições. Cada parcela foi constituída por duas linhas de 2 metros de comprimento com espaçamento de 50 cm entre as linhas e 15 sementes por metro linear. Os tratos culturais foram os normais para a cultura, com irrigação sempre que necessário.

### 3.3 Características avaliadas

Foram avaliados dados relativos às seguintes características:

- **Florescimento** - número de dias da sementeira até o florescimento (50% das plantas com pelo menos uma flor aberta)
- **Peso de 100 sementes** - obtido por meio da pesagem de uma amostra aleatória de 100 grãos sadios de cada parcela, e expressa em gramas
- **Produtividade de grãos** - obtida por meio da pesagem dos grãos de cada parcela, após secagem (em torno de 13 % de umidade) e limpeza, expressa em kg/ha.
- **Reação à patógenos** - foram avaliadas as reações das famílias ao oídio (*Erysiphe polygoni*) e a mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*). A reação aos patógenos foi avaliada por meio da nota média atribuída por 4 avaliadores, na época de incidência e severidade máxima das doenças. Para as duas doenças, as notas variaram de 1 a 9, segundo a seguinte escala de notas apresentada na Tabela 1.



TABELA 1 - Escala de notas utilizadas na avaliação da reação ao oídio (*Erysiphe polygoni*.) e a mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*).

Notas	Área foliar infectada (%)
1	0
2	1
3	1 a 5
4	5 a 10
5	10 a 20
6	20 a 40
7	40 a 60
8	60 a 80
9	80 a 100

Fonte: Rezende, Ramalho e Corte (1999).

### 3.4 Análise estatística dos Experimentos

Inicialmente foram realizadas análises de variâncias para cada experimento individualmente, para cada característica avaliada, considerando os efeitos das famílias como sendo aleatório. A análise foi realizada de acordo com o seguinte modelo estatístico (Cochran e Cox, 1966):

$$Y_{ijk} = m + t_i + r_j + b_{k(j)} + e_{ijk}$$

em que:

$Y_{ijk}$ : observação do tratamento  $i$  no bloco  $k$  da repetição  $j$ ;

$m$ : média geral do experimento;

$t_i$ : efeito do tratamento  $i$  ( $i= 1, 2, \dots, 196$ );

$r_j$ : efeito da repetição  $j$  ( $j= 1, 2$ );

$b_{k(j)}$ : efeito do bloco  $k$  dentro da repetição  $j$  ( $k=1, 2, \dots, 14$ );

$\bar{e}_{ijk}$ : erro experimental efetivo associado à observação  $Y_{ijk}$ , suposto NID ( $0, \sigma^2$ )

Posteriormente, foi realizada uma análise conjunta de variância, utilizando as médias ajustadas das análises individuais, envolvendo as duas épocas e os dois locais, sendo o efeito de épocas e locais considerados como fixos. O modelo estatístico utilizado na análise conjunta de variância foi o seguinte:

$$Y_{ijkgz} = m + r_{j(gz)} + b_{k(jgz)} + t_i + d_g + (td)_{ig} + f_z + (tf)_{iz} + (df)_{gz} + (tdf)_{igz} + e_{ijkgz}$$

em que:

$Y_{ijkgz}$ : valor do tratamento  $i$ , na repetição  $j$ , no bloco  $k$ , na época  $g$  e no local  $z$ ;

$m$ : média geral;

$r_{j(gz)}$ : efeito da repetição  $j$ , dentro da época  $g$  e dentro do local  $z$ ;

$b_{k(jgz)}$ : efeito bloco  $k$ , dentro da repetição  $j$ , dentro da época  $g$ , dentro do local  $z$ ;

$t_i$ : efeito do tratamento  $i$ ;

$d_g$ : efeito da época  $g$ ;

$(td)_{ig}$ : efeito da interação do tratamento  $i$  com a época  $g$ ;

$f_z$ : efeito do local  $z$ ;

$(tf)_{iz}$ : efeito da interação do tratamento  $i$  com o local  $z$ ;

$(df)_{gz}$ : efeito da interação da época  $g$  com o local  $z$ ;

$(tdf)_{igz}$ : efeito da interação do tratamento  $i$ , com a época  $g$  e com o local  $z$ ;

$e_{ijkgz}$ : erro efetivo médio associado ao tratamento  $i$ , na repetição  $j$ , no bloco  $k$ , na época  $g$  e no local  $z$ , suposto NID  $(0, \sigma_m^2)$

O esquema das análises individual e conjunta de variância, bem como as suas respectivas esperanças do quadrado médio, foram obtidas de acordo com o apresentado por Vencovsky e Barriga (1992). A partir dessas esperanças dos quadrados médios, foram estimadas, tanto para as análises individuais como para

as conjuntas, as variâncias genéticas e fenotípicas e alguns parâmetros genéticos (herdabilidade no sentido amplo, coeficiente de variação genética e o coeficiente b) entre as famílias, segundo Vencovsky e Barriga (1992).

Para a estimativa da herdabilidade das características avaliadas nos experimentos, foram estimados os limites inferior e superior dos intervalos de confiança, com coeficiente de confiança  $1-\alpha = 0,95$  (Knapp, Stroup e Ross, 1985):

$$LI = \left\{ 1 - \left[ \left( \frac{Q_{trat}}{Q_{erro}} \right) \cdot F_{1-\alpha/2; g_{erro}, g_{trat}} \right]^{-1} \right\}$$

$$LS = \left\{ 1 - \left[ \left( \frac{Q_{trat}}{Q_{erro}} \right) \cdot F_{\alpha/2; g_{erro}, g_{trat}} \right]^{-1} \right\}$$

em que:

$Q_{trat}$ : Quadrado médio do efeito de tratamentos;

$Q_{erro}$ : quadrado médio do erro experimental;

$F_{1-\alpha/2; g_{erro}, g_{trat}}$ : valor da distribuição de F para os graus de liberdade do erro e de tratamentos, tal que a probabilidade de exceder este valor é de  $1 - \alpha/2$ .

$F_{\alpha/2; g_{erro}, g_{trat}}$ : valor da distribuição de F para os graus de liberdade do erro e de tratamentos, tal que a probabilidade de exceder este valor é de  $\alpha/2$ .

### 3.5 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com o procedimento usado por Nienhuis et al. (1995), com algumas modificações. Foram usados cerca de dois gramas de folhas jovens oriundas de 15 plantas, amostradas aleatoriamente

em cada família na geração F<sub>5,6</sub>. Essas folhas foram trituradas em 10 ml de tampão de extração a 65°C em um almofariz. O tampão de extração contém 2% CTAB, 100 mM TRIS (pH 8,0), 20 mM EDTA (pH 8,0), 1,4M NaCl e 1% PVP (polivinilpirrolidone). O material triturado foi colocado em tubos de centrifuga juntamente com 20µl de β-mercaptoetanol, e incubado por 30 minutos em banho-maria a 65°C. Após o banho-maria foi realizada a primeira extração de DNA com 10 ml da mistura clorofórmio:álcool isoamil (24:1). Durante essa extração, as fases orgânica e aquosa foram separadas por centrifugação e foi coletado o sobrenadante. Em seguida, os ácidos nucleicos foram precipitados após colocar 30 ml da mistura álcool 95%: acetato de amônio (6:1). Essa mistura foi colocada no freezer por pelo menos uma hora. Após a precipitação dos ácidos nucleicos, eles foram transferidos para tubos de microcentrifuga “Eppendorf”. Em seguida, o ácido nucleico foi reidratado em tampão TE (1mM TRIS e 0.1 mM EDTA). Foi realizada uma segunda extração com clorofórmio:álcool isoamil (24:1) e o sobrenadante foi precipitado pela adição de pelo menos três volumes de uma mistura de acetato de sódio: etanol 95% (1:20). Após a precipitação o DNA foi reidratado em tampão TE e quantificado, usando-se o fluorímetro Hoeffer Scientific TKO100. A qualidade do DNA extraído foi analisada eletroforeticamente em gel de agarose a 1,0%.

### 3.6 Obtenção dos marcadores RAPD

A reação de RAPD foi preparada em volume de 10 µl, de acordo com o procedimento utilizado por Nienhuis et al. (1995), com modificações. As reações foram realizadas em tubos capilares de vidro em um termociclador refrigerado a ar (Idaho Technology, Idaho Falls, Idaho). O termociclador foi programado para 40 ciclos, seguindo as seguintes condições: nos dois primeiros ciclos, 60 segundos para desnaturação a 91°C, 7 segundos para anelamento do “primer” a 42°C e

70 segundos para elongação a 72°C. Os 38 ciclos subsequentes diferiram dos dois primeiros apenas em relação ao tempo de desnaturação, reduzindo-se para 1 segundo. Após a amplificação, os produtos da reação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta Fotodyne e fotografados com filme polaróide 667.

Foram utilizados “primers” decanucleotídeos adquiridos junto à “Operon Technologies” (Califórnia, EUA). Foi realizada uma seleção prévia dos “primers” a serem utilizados no trabalho por meio da genotipagem dos genitores do cruzamento analisado com os marcadores RAPD obtidos. Foram selecionados os mais promissores e as bandas polimórficas (marcadores) foram classificadas como intensa, média ou fraca, baseado na resolução e grau de amplificação. Só bandas classificadas como intensas ou médias foram incluídas na análise.

### **3.7 Teste de distorção mendeliana dos marcadores RAPD**

Para detectar se os marcadores obtidos apresentavam padrão de segregação mendeliana, foi realizado um teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), testando-se a hipótese que os marcadores apresentavam uma segregação 17/32 (53,1%) das famílias avaliadas com a presença da banda e 15/32 (46,9%) com ausência. Essa hipótese testada é referente a proporção esperada na geração F<sub>2</sub> (abertura do bulk) de plantas com o marcador (M-) e sem o marcador (mm). Portanto, nesse trabalho, como foram avaliadas 196 famílias, tinha-se uma frequência esperada de 104,1 famílias com a presença do marcador e 91,9 famílias com ausência, quando o marcador era obtido em todas as famílias avaliadas. De uma forma geral, utilizou-se a seguinte expressão para o teste do qui-quadrado:

$$\chi^2 = \{[(n_1 - ne_1)^2/ne_1] + [(n_2 - ne_2)^2/ne_2]\}.$$

onde  $n_1$  e  $ne_1$  são os números observado e esperado de famílias com a presença do marcador e  $n_2$  e  $ne_2$  são os números observado e esperado de famílias com ausência do marcador, respectivamente.

Quando o teste do qui-quadrado apresentava-se significativo indicava que o marcador não seguia um padrão de segregação mendelina, portanto não sendo confiável para utilização no mapeamento. Desta forma, esse marcador foi retirado das análises posteriores de mapeamento.

Quando são realizados vários (n) testes independentes, a probabilidade de erro tipo I do experimento como um todo é dado por:

$$\alpha = 1 - (1 - \alpha_T)^n.$$

Assim, em cada teste deve-se tomar, para um dado  $\alpha$ :

$$\alpha_T = 1 - (1 - \alpha)^{1/n} \cong \alpha/n \text{ (correção de Bonferroni).}$$

Neste trabalho, como utilizou-se um  $\alpha = 5\%$  com  $n = 92$  marcadores, realizou-se o teste de qui-quadrado com  $\alpha_T = 0,054\%$  que tem um valor de  $\chi^2 = 11,9602$

### **3.8 Identificação de Marcadores ligados a QTLs com análise de regressão linear múltipla**

Foi realizada uma análise de regressão múltipla envolvendo todos os marcadores que apresentaram segregação mendeliana para cada experimento individualmente, e também com as médias de cada época e local de cultivo separadamente, além da análise envolvendo as médias de todos os ambientes onde cada característica foi avaliada.

A análise de regressão linear múltipla dos marcadores foi realizada conforme procedimentos descritos por Edwards, Stuber e Wendel (1987), que

consideram os marcadores moleculares como variáveis independentes e as características fenóticas como variáveis dependentes. Os marcadores de maior importância foram obtidos através de valores significativos do F parcial ( $P < 0,05$ ) e a porcentagem de variação explicada por eles foi estimada pelo coeficiente de determinação parcial (Draper e Smith, 1981).

O processo de seleção de variáveis regressoras Stepwise (Draper e Smith, 1981) foi aplicado para obter uma estimativa ótima dos valores genotípicos dos QTLs, dos seus erros padrão e da porcentagem da variação genética explicada em cada situação.

No processo de Stepwise, inicialmente coloca-se, no modelo de regressão, somente o marcador com maior valor de F parcial que tenha sido significativo. Em seguida, testa-se o marcador, dentre os candidatos a entrar no modelo, que tem o valor mais alto de F parcial, na presença do primeiro marcador. Dentre os marcadores do modelo recém formado, aqueles que apresentarem teste F não significativo são retirados do modelo e os que apresentarem teste F significativo são mantidos. Esses testes são efetuados um por um, a cada passo. O processo continuará até que todos os marcadores candidatos a entrar no modelo sejam testados e até que todos os marcadores do modelo tenham F parcial significativo.

### 3.9 Análise estatística para detecção dos QTLs

Antes da realização das análises estatísticas, foi realizada a construção de um mapa genético de ligação entre os marcadores RAPD polimórficos e com segregação mendeliana através do programa MAPMAKER (Lander et al., 1987), versão 3.0, utilizando um *lod score* (*log of odds-ratio*) de 4,8 e distância máxima de 50 cM, que forneceu um valor de  $\alpha$  de aproximadamente 1%. Um *lod score* indica, essencialmente, o quanto mais provável é a ligação entre dois locos do que a não existência de ligação entre eles (Lander e Botstein, 1989). Dessa forma,

com o *lod score* de 4,8 pode-se dizer que os marcadores mapeados em um mesmo grupo de ligação tem 63095,74 ( $10^{4,8}$ ) vezes mais chances de estarem ligados do que de serem independentes. A função-mapa de Haldane (1919) foi empregada para calcular as distâncias genéticas em centimorgans (cM).

Após a construção do mapa molecular dos marcadores RAPD, realizou-se o mapeamento dos QTLs, para todas as características analisadas nos experimentos, utilizando o programa QTL Cartographer para Windows (versão 1.01). O mapeamento foi realizado para cada experimento individualmente, e também com as médias de cada época e local de cultivo separadamente, além da análise envolvendo as médias de todos os ambientes onde cada característica foi avaliada.

Utilizou-se a metodologia de mapeamento por intervalo composto (CIM) (Jansen, 1993; Zeng, 1994). O mapeamento por intervalo composto é uma combinação do mapeamento por intervalo e uma regressão linear múltipla, que utiliza os marcadores como variáveis regressoras. O processo de Stepwise foi utilizado para seleção das variáveis regressoras na regressão múltipla, dentro do mapeamento por intervalo composto, utilizando-se um valor de *lod scores* de 2,6, para assumir um QTL como participante do controle genético do caráter analisado.

O modelo estatístico para o mapeamento por intervalo composto em um segmento entre os marcadores  $i$  e  $i+1$  é o seguinte:

$$y_j = b_0 + b_1 X_{ij} + \sum_{k \neq i, i+1} b_k X_{kj} + \varepsilon_j$$

em que:

$y_j$ : valor da característica analisada para a família  $j$ ;

$b_0$ : intercepto do modelo;

$b_i$ : efeito genético de um QTL localizado entre os marcadores  $i$  e  $i+1$ ;



$X_{ij}$ : variável dummy que pode assumir valores de 0 e 1 conforme a combinação dos genótipos dos marcadores  $i$  e  $i+1$ ; cada classe dos genótipos marcadores tem uma determinada probabilidade de ocorrência, que é função da distância entre marcador  $i$  com o QTL e entre os marcadores  $i$  e  $i+1$ .

$b_k$ : coeficiente de regressão parcial do valor da característica no marcador  $k$ ;

$X_{kj}$ : variável dummy para o marcador  $k$  na família  $j$ ;

$\varepsilon_{ij}$ : erro do modelo;

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Avaliações fenotípicas

Inicialmente, foram realizadas as análises de variâncias de cada experimento, para os quais foram obtidos os erros efetivos e as médias ajustadas. Em seguida, foram realizadas as análises conjuntas, sendo que, em todas as análises realizadas, as famílias mostraram-se geneticamente heterogêneas com base no número de dias para o florescimento (Tabelas 2 e 3), peso de 100 sementes (Tabelas 4 e 5), reação ao oídio (*Erysiphe polygoni*) e à mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) (Tabelas 6 e 7) e na produtividade de grãos (Tabelas 8 e 9). Em todas as análises de variâncias foram estimados os valores do coeficiente de variação experimental, coeficiente de variação genético, coeficiente *b*, herdabilidade no sentido amplo e seus limites inferior e superior.

A precisão experimental é um dos pontos primordiais para que se possa detectar as diferenças no potencial genético das famílias. A medida de precisão mais utilizada é o coeficiente de variação experimental (C<sub>Ve</sub>), que possibilita fazer inferência sobre o nível de precisão experimental atingida.

A relação (*b*) entre coeficiente de variação genética (C<sub>Vg</sub>) e coeficiente de variação experimental possibilita fazer inferências sobre as chances de sucesso do melhoramento de plantas na população em estudo. Quanto maior essa relação, maiores as possibilidades de se conseguir selecionar genótipos com desempenho superior.

A herdabilidade no sentido amplo ( $h_a^2$ ) mede a proporção da variação total que é devida a fatores genéticos, ou seja, mede a influência dos fatores ambientais na característica analisada. Quanto maior o valor da herdabilidade, maior será a possibilidade de se conseguir ganhos com a seleção. Vale ressaltar que apesar de não ter sido calculada especificamente a herdabilidade no sentido

restrito, as herdabilidades calculadas neste trabalho podem ser consideradas como no sentido restrito, pois foram utilizadas famílias em gerações avançadas de endogamia ( $F_{5:7}$  a  $F_{5:10}$ ) nas quais a proporção da variância de dominância é insignificante com relação a variância genética total. Assim, toda a variância genética entre essas famílias pode ser considerada como variância aditiva, o que torna a herdabilidade calculada como sendo no sentido restrito, informando o quanto da variação total pode ser fixada com a seleção.

Os limites inferiores e superiores da herdabilidade informam o intervalo de confiança das estimativas de herdabilidade, ou seja, o menor e o maior valor que a herdabilidade estimada pode assumir com um coeficiente de confiança de 95%. Quando o valor do limite inferior é igual a zero, indica que o valor estimado da herdabilidade não difere estatisticamente de zero.

#### 4.1.1 Época de florescimento

A época de florescimento normalmente é utilizada como indicador do ciclo de uma cultivar, pois é um caráter que pode ser avaliado mais facilmente e com maior precisão quando comparado com a avaliação do ciclo da cultura. Além disso, ambos estão diretamente relacionados com as temperaturas ocorridas durante a fase de germinação, emergência e crescimento vegetativo, e portanto respondem de maneira muito semelhante às influências ambientais. Assim, quando estas fases coincidem com épocas de baixas temperaturas (época de inverno), ocorre um atraso no ciclo da cultura, alterando a época de florescimento.

Nesse trabalho, pode-se observar que a média da época para florescimento (Tabela 2) também variou em função, principalmente, da época de cultivo. Na época de inverno houve um aumento do ciclo do feijoeiro (em média, 58 dias para o florescimento), enquanto na época das secas, quando vigoram altas

temperaturas, houve a tendência de redução no número de dias para o florescimento (42 dias em média), refletindo, assim, em um encurtamento do seu ciclo.

O valor baixo para o coeficiente de variação experimental do florescimento deve-se à influência ambiental muito pequena sobre esse caráter, que foi semelhante às estimativas obtidas em outros experimentos (White e Singh, 1991; Teixeira, Ramalho e Abreu, 1995; Melo, Santos e Ramalho, 1997).

Somente o experimento 1 teve uma situação favorável ( $b > 1$ ) para seleção ( $b = 1,42$ ). Provavelmente, isso se deveu à grande semelhança dos genitores, que originou o cruzamento desse trabalho, em relação ao número de dias para florescimento. Como os genitores eram pouco divergentes em relação ao ciclo da cultura, existia uma pequena variabilidade genética na população analisada (Figura 1), o que pode ter levado a esses resultados.

Para herdabilidade no sentido amplo, observou-se a mesma tendência do parâmetro  $b$ , ou seja, somente no experimento 1 visualizou-se uma boa situação para seleção, pois obteve-se baixas valores de herdabilidade quando comparado com as estimativas obtidas em outros trabalhos (Teixeira, Ramalho e Abreu, 1995; Melo, Santos e Ramalho, 1997). Como a herdabilidade no sentido amplo mede a proporção da variação total que é devido a fatores genéticos, pode-se, mais uma vez, inferir que realmente existia baixa variabilidade genética para essa característica (Figura 1), visto que a precisão experimental foi elevada o que indica pequeno efeito ambiental na variação total entre as famílias. Desta forma, pode-se concluir que a baixa herdabilidade não foi devido a alta variação ambiental (variância fenotípica) e sim devido a baixa variabilidade genética.

Os resultados da análise conjunta (Tabela 3) confirmam os resultados das análises individuais, mostrando baixo valor do coeficiente  $b$  e da herdabilidade, quando comparados com outros trabalhos (Santos, Vencovsky e Ramalho, 1985;

Rezende, 2000), e indicando que existe pequena variabilidade na população analisada, devido basicamente à grande semelhança dos genitores para essa característica. Os resultados da Tabela 3 indicam a ocorrência de interação entre famílias e épocas de cultivo para época de florescimento, indicando que existe resposta diferencial das famílias à mudança da época de cultivo. A correlação entre as médias das famílias nas duas épocas de cultivo foi de 30,20%, indicando que a maior parte da interação para essa característica é do tipo complexa, pois Ramalho, Santos e Zimmermann (1993) relatam que quando a correlação entre o desempenho médio dos genótipos em dois ambientes é baixa, aumenta a importância da parte complexa da interação. Portanto, se a correlação é baixa, aumentam as chances do material superior em um ambiente, não o ser em outro, complicando o trabalho de seleção.

Para confirmar o grande efeito da interação famílias com épocas de cultivo foi calculada a herdabilidade considerando todos os fatores do modelo como aleatórios (Vencovsky e Barriga, 1992), obtendo-se, assim, a estimativa desse parâmetro totalmente livre do efeito da interação na estimativa da variância genética. Desta forma, consegue-se avaliar o impacto da interação famílias por ambientes no desempenho fenotípico das famílias. Para a época de florescimento a herdabilidade estimada nessa condição foi de 39,38%, confirmando assim o grande efeito da interação na expressão fenotípica do florescimento em feijoeiro. Assim sendo, existe a necessidade de se avaliar essa característica nas duas épocas, pois o desempenho das famílias é dependente da época de cultivo utilizada.

Na literatura existem relatos de que a época de florescimento é controlada por poucos genes, com dominância do alelo que condiciona a precocidade (Teixeira, Ramalho e Abreu, 1995), embora existam também relatos de controle poligênico, ora com a predominância de efeitos aditivos (White e Singh, 1991;

Melo, Santos e Ramalho, 1997), ora com a predominância dos efeitos de dominância (Evans e Davis, 1978). Desta forma, devem existir alguns genes de efeitos principais controlando o caráter associado a alguns modificadores, e dependendo dos genitores utilizados e temperaturas ocorridas, encontram-se resultados totalmente discrepantes. Neste estudo, nenhum genitor é precoce, portanto o alelo dominante para precocidade não ocorre na população avaliada, sendo as diferenças encontradas devidas à provável presença de genes modificadores. Assim, apesar da menor diversidade genética, existe a possibilidade de marcar QTLs responsáveis pelo número de dias para o florescimento, sem interferência dos genes de efeitos principais.

TABELA 2 - Resumo das análises de variância e estimativas do coeficiente de variação genético (CVg), relação entre coeficiente de variação genético e ambiental (b), herdabilidade no sentido amplo ( $h_a^2$ ) com seus limites inferiores (LI) e superiores (LS), para época de florescimento (dias) em quatro experimentos.

Fontes de variação	QM				
	GL	E1	E2	E4	E6
Trat. ajustado	195	17,19**	3,76**	13,14**	1,91**
Erro efetivo	169	3,43	1,28	7,16	0,94
Média		59,12	43,08	57,62	41,54
CVe (%)		3,13	2,63	4,64	2,33
CVg (%)		4,43	2,58	3,00	1,67
b		1,42	0,98	0,64	0,72
$h_a^2$ (%)		80,05	65,95	45,50	50,78
LI ( $h_a^2$ )		73,32	54,47	27,13	34,18
LS ( $h_a^2$ )		85,13	74,60	59,38	63,31

E1: experimento realizado em Lavras, geração F<sub>7</sub>, época de inverno, ano de 1996; E2: Lavras, F<sub>8</sub>, seca, 1997; E4: Lavras, F<sub>9</sub>, inverno, 1997; E6: Lavras, F<sub>10</sub>, seca, 1998.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

TABELA 3 - Resumo da análise conjunta de variância e estimativas do coeficiente de variação genético (CVg), relação entre coeficiente de variação genético e ambiental (b) e herdabilidade no sentido amplo ( $h_a^2$ ) com seus limites inferiores (LI) e superiores (LS), para época de florescimento.

Fontes de variação	Graus de Liberdade	QM
Épocas (E)	1	101168,06**
Famílias (F)	195	11,58**
E x F	195	7,02**
Erro médio	676	3,20
Média		50,34
CVe (%)		2,66
CVg (%)		2,03
b		0,76
$h_a^2$ (%)		72,36 (39,38) <sup>a</sup>
LI ( $h_a^2$ )		65,12
LS ( $h_a^2$ )		77,79

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. <sup>a</sup> Estimativa da herdabilidade considerando todos os fatores do modelo como aleatórios.

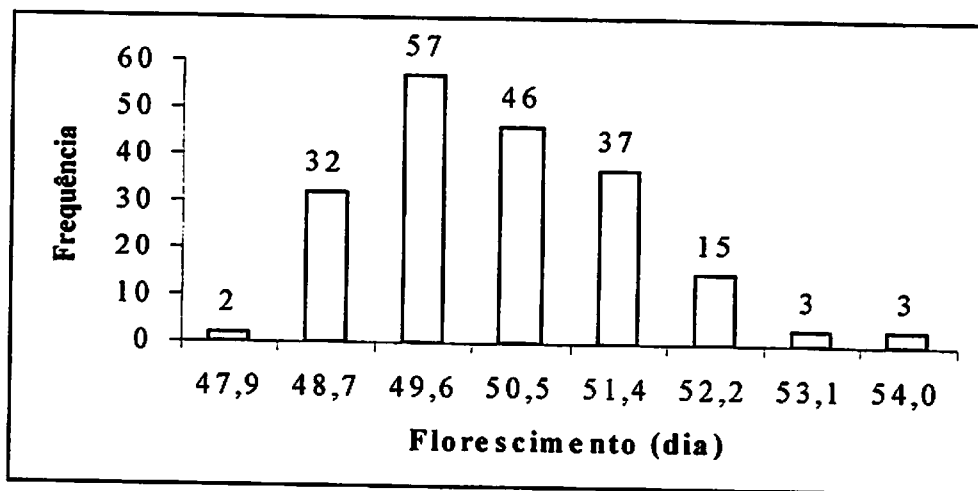


FIGURA 1 - Distribuição de frequência para o número de dias para o florescimento das famílias do cruzamento Carioca x Flor de Mayo, na média de todos os experimentos.

#### 4.1.2 Peso de 100 sementes

O peso de 100 sementes é uma característica que serve como indicador do tamanho da semente, sendo considerado um componente primário da produtividade de grãos. Ramalho, Santos e Zimmermann (1993) comentam que essa característica é controlada por poucos genes, o que leva a uma menor influência do ambiente e, conseqüentemente, à uma maior herdabilidade e maior facilidade de seleção. No entanto, os ganhos com a seleção indireta para produtividade são pouco expressivos, principalmente pelas baixas correlações entre produtividade de grãos e peso de 100 sementes (Ramalho, Santos e Zimmermann, 1993).

Também para essa característica, os genitores do cruzamento analisado são pouco divergentes, sendo ambos classificados como genótipos de sementes pequenas. Analisando o peso de 100 sementes das famílias avaliadas (Tabela 4), verifica-se que em todos os experimentos, e na análise conjunta (Tabela 5), a média das famílias esteve situada na classificação de semente pequena.

A precisão experimental pode ser considerada como relativamente alta, com exceção do experimento 3. No entanto, devido à baixa variabilidade genética (Figura 2) da população para essa característica, as estimativas do parâmetro  $b$  e da herdabilidade no sentido amplo foram reduzidas em alguns experimentos (1, 3 e 7). Mas mesmo com a pequena divergência entre os genitores, e conseqüentemente a baixa variabilidade da população, existiram situações (experimentos 2, 4 e 5) nas quais se observaram claras chances de sucesso com a seleção. Também pelo alto valor da estimativa da herdabilidade na análise conjunta ficou mais uma vez evidenciada a possibilidade de obter ganhos com a seleção.

A análise conjunta do peso de 100 sementes (Tabela 5) para épocas e locais de cultivo indicou existir interação significativa tanto para famílias x



épocas quanto para famílias x locais. A correlação entre as médias das famílias nas duas épocas de cultivo foi de 69,72, e nos dois locais de 68,90%, indicando que parte das interações para essa característica é do tipo complexa, mas que grande parte dessa interação é do tipo simples, ou seja, é devida às diferenças na magnitude de resposta e não no sentido da resposta das famílias à mudança de ambiente (Ramalho, Santos e Zimmermann, 1993). Portanto, quanto maior a correlação, maiores as chances do material superior em um ambiente o ser também em outro, facilitando o trabalho de seleção. No entanto, é importante que a avaliação das populações para essa característica seja realizada em vários locais e nas diferentes épocas de cultivo, pois algumas famílias podem apresentar comportamento específico para cada uma dessas situações.

Para confirmar o efeito da interação famílias por ambiente, no peso de 100 sementes, foi calculada a herdabilidade considerando todos os fatores do modelo como aleatórios (Vencovsky e Barriga, 1992). Dessa forma, obteve-se a estimativa da herdabilidade totalmente livre do efeito da interação no cálculo da variância genética. A estimativa de herdabilidade nessa condição foi de 74,29%, evidenciando assim o grande efeito da interação na expressão fenotípica do peso de 100 sementes em feijoeiro. Assim sendo, existe a necessidade de avaliar essa característica em várias épocas e locais, pois o desempenho das famílias é dependente da época e do local de cultivo utilizado.

Desta forma, em um trabalho de mapeamento de QTLs para essa característica deve-se, sempre que possível, procurar identificar tanto os QTLs responsáveis por essa interação, ou seja, aqueles que só se expressam em determinadas condições, quanto aqueles mais constantes, que se expressam na maioria dos ambientes.

**TABELA 4 - Resumo das análises de variância e estimativas do coeficiente de variação genético (CVg), relação entre coeficiente de variação genético e ambiental (b) e herdabilidade no sentido amplo ( $h_a^2$ ) com seus limites inferior (LI) e superior (LS), para peso de 100 sementes (g) em sete experimentos.**

Fontes de variação	QM							
	GL	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
Trat. ajustado	195	14,61**	12,44**	13,55**	19,49**	17,07**	12,73**	20,57**
Erro efetivo	169	5,79	1,41	6,24	2,56	2,54	2,60	6,79
Média		24,88	22,61	20,53	27,85	25,50	25,56	26,70
CVe (%)		9,67	5,24	12,16	5,74	6,25	6,30	9,76
CVg (%)		8,44	10,04	9,30	10,44	10,57	8,80	9,83
b		0,88	1,91	0,76	1,82	1,69	1,40	1,01
$h_a^2$ (%)		60,37	88,66	53,95	86,86	85,12	79,58	66,99
LI ( $h_a^2$ )		47,00	84,84	38,41	82,43	80,10	72,69	55,86
LS ( $h_a^2$ )		70,46	91,55	65,67	90,21	88,91	84,77	75,39

E1: experimento realizado em Lavras, geração F<sub>7</sub>, época de inverno, ano de 1996; E2: Lavras, F<sub>8</sub>, seca, 1997; E3: Patos de Minas, F<sub>8</sub>, seca, 1997; E4: Lavras, F<sub>9</sub>, inverno, 1997; E5: Patos de Minas, F<sub>9</sub>, inverno, 1997; E6: Lavras, F<sub>10</sub>, seca, 1998; E7: Patos de Minas, F<sub>10</sub>, seca, 1998.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

TABELA 5 - Resumo da análise conjunta de variância e estimativas do coeficiente de variação genético (CVg), relação entre coeficiente de variação genético e ambiental (b) e herdabilidade no sentido amplo ( $h_a^2$ ) com seus limites inferior (LI) e superior (LS) para peso de 100 sementes (g).

Fontes de variação	Graus de liberdade	QM
Locais (L)	1	646,20**
Épocas (E)	1	3339,3**
Famílias (F)	195	56,08**
F x L	195	10,80**
F x E	195	9,70**
F x L x E	195	6,08**
Erro médio	1183	3,99
Média		24,80
CVe (%)		8,05
CVg (%)		7,77
b		0,97
$h_a^2$ (%)		92,88 (74,29) <sup>a</sup>
LI ( $h_a^2$ )		91,11
LS ( $h_a^2$ )		94,21

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. <sup>a</sup> Estimativa da herdabilidade considerando todos os fatores do modelo como aleatórios.

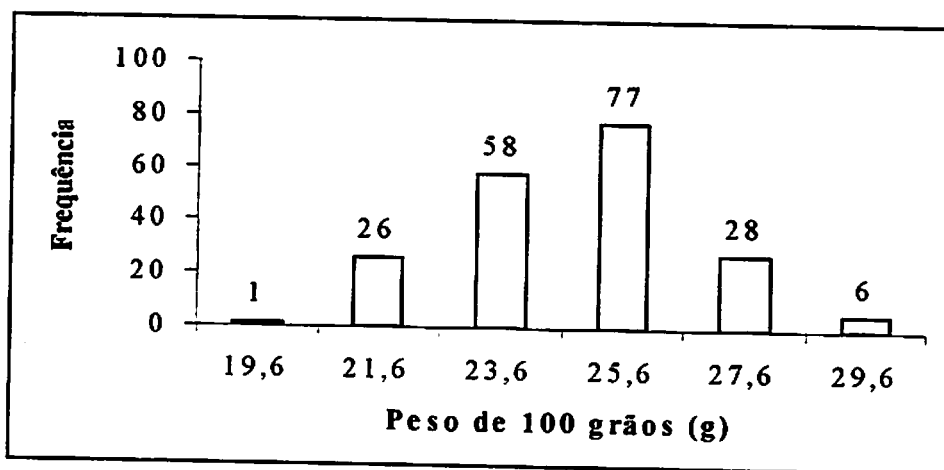


FIGURA 2 - Distribuição de frequência para o peso de 100 sementes das famílias do cruzamento Carioca x Flor de Mayo, na média de todos os experimentos.

#### 4.1.3 Reação ao Oídio e Mancha Angular

O oídio do feijoeiro é uma doença que apresenta distribuição mundial, sendo considerada, no entanto, de importância secundária. A expansão do cultivo no outono-inverno e a grande facilidade de dispersão dos esporos do fungo têm aumentado a sua importância. A doença ocorre com maior frequência durante e após o período de floração da cultura, sendo mais severa nos cultivares de hábito determinado e grãos grandes (Sartorato e Rava, 1994). As temperaturas moderadas (20 a 25°C) e a baixa umidade relativa do ar ou do solo constituem condições favoráveis à doença (Vale e Zambolim, 1997). Desta forma, essa doença só tem importância econômica nos cultivos realizados no inverno, e por isso foi avaliada somente nos experimentos (1, 4 e 5) conduzidos nessa época de cultivo.

Analisando as Tabelas 6 e 7 verifica-se que a avaliação da resistência ao oídio foi realizada com alta precisão, visto que a avaliação de doenças por meio de notas, normalmente, é bastante trabalhosa e sujeita a alta margem de erro. No entanto, nesse trabalho essa avaliação foi realizada por 4 avaliadores, e foi utilizado o resultado médio dessas avaliações nas análises estatísticas, o que pode ter contribuído para o aumento da precisão de avaliação. Vale ressaltar que Rezende (2000), trabalhando com avaliação da reação ao oídio em feijoeiro, e utilizando famílias oriundas de retrocruzamento e com escalas de notas, conseguiu precisão semelhante à desses experimentos.

Em nenhum dos experimentos em que se avaliou a reação ao oídio (Tabelas 6 e 7) foram obtidas médias baixas, ou seja, a maioria das famílias analisadas eram suscetíveis ao patógeno (Figura 3). No entanto, conseguiu-se identificar algumas famílias que tinham alta resistência (nota menor que 3), indicando existir variabilidade para seleção (Figura 3). O controle genético da reação ao oídio é bastante controverso, mas existe grande possibilidade que

existam alguns genes de maior efeito que conferem resistência vertical e outros vários genes de menor efeito que conferem uma resistência do tipo horizontal ou quantitativa. No caso dos genitores utilizados nesse estudo, somente o Carioca possui alelos de resistência vertical, sendo que o Flor de Mayo deve possuir alguns alelos de resistência horizontal, visto que esse genitor possui moderada suscetibilidade a esse patógeno, principalmente quando comparado com os cultivares do grupo manteiga. Por isso, foi encontrada maior variabilidade e resistência para essa doença (Figura 3) em comparação ao observado para mancha angular (Figura 4), que não possui alelos de resistência vertical nessa população estudada.

O primeiro trabalho visando elucidar o controle genético da resistência do *P. vulgaris* ao *E. polygoni* foi realizado por Dundas (1936), segundo o qual verificou-se que existia um alelo de resistência à raça de oídio utilizada. Em outro experimento, Dundas (1942) observou que determinados cultivares de feijoeiro carregam um alelo dominante que lhes confere resistência a 12 das 14 raças estudadas do patógeno. Constatou também a presença de um alelo dominante que governa a semi-resistência, e outro que governa a suscetibilidade num período de cinco a sete dias após a emergência.

Bett e Michaels (1995) relatam a ocorrência de dois genes complementares, sendo que num deles a resistência é devida ao alelo dominante, e no outro, ao recessivo, e ambos os genes devem estar presentes para a resistência se expressar.

Rezende, Ramalho e Corte (1999) avaliaram plantas  $F_2$  e famílias  $F_{2:3}$  provenientes do cruzamento da cultivar Jalo com a linhagem ESAL 686, e os resultados indicaram a existência de epistasia recessiva dupla no controle do caráter. No entanto, em trabalho posterior envolvendo o mesmo cruzamento anterior, mas com avaliações de outras gerações segregantes (retrocruzamento),

Rezende (2000) verificou que a segregação observada nessa oportunidade mostrou que, em realidade, estava envolvido apenas um gene no controle dessa característica.

Como se pode verificar, não existe um consenso quanto ao controle genético desse caráter, sendo necessárias maiores investigações para a sua elucidação. Vale ressaltar que as diferentes conclusões observadas nos trabalhos podem ser devidas aos diferentes genótipos de feijão utilizados, às diferentes raças de oídio, às condições ambientais em que foram realizados os estudos ou aos métodos de avaliação empregados.

Nesse trabalho, os altos valores encontrados para as estimativas dos coeficientes  $b$  e da herdabilidade (Tabelas 6 e 7) sugerem que o controle genético da reação ao oídio seja devido a poucos genes, em concordância com o que tem sido relatado por outros trabalhos (Rezende, Ramalho e Corte, 1999 e Rezende, 2000). Esses valores mostram a existência de variabilidade genética entre as famílias (Figura 3) suficiente para se acreditar no sucesso com a seleção de plantas ou famílias resistentes nessa população segregante.

No Brasil, a maioria das cultivares utilizadas é de origem mesoamericana que possuem elevada resistência ao oídio, grãos de tamanho médio a pequeno e hábito de crescimento indeterminado. Entretanto, a Jalo, como a maioria das cultivares do grupo Manteiga (sementes grandes) em cultivo no Brasil, é altamente suscetível ao oídio (Vieira, 1983; Rezende, Ramalho e Abreu, 1996).

A mancha angular do feijoeiro já foi considerada uma doença de pouca importância por ocorrer, principalmente, no final do ciclo da cultura e por acreditar-se que causava pequenas perdas na produtividade. Entretanto, nos últimos anos, passou a ser considerada uma das principais doenças do feijoeiro, sendo a ela atribuída perdas de até 70%, dependendo da suscetibilidade das cultivares, da patogenicidade dos isolados e das condições ambientais

(temperatura média em torno de 24°C, com períodos de alta umidade alternados com de baixa umidade), de acordo com Sartorato e Rava (1994). Desta forma, o cultivo da seca com irrigação (com foi o caso desse trabalho) é a época em que essa doença tem maior importância econômica, e portanto a reação das famílias à mancha angular foi avaliada somente nos experimentos (2, 3 e 6) realizados nessa época de cultivo.

Para mancha angular, a população analisada parece ser mais suscetível do que para o oídio, visto que as médias das notas para reação a mancha angular foram sensivelmente superiores às notas de reação a oídio (Tabelas 6 e 7). Também para mancha angular, parece que o controle genético é exercido por alguns genes de maior efeito que conferem resistência vertical (Ferreira et al., 1999), e outros vários genes de menor efeito que conferem uma resistência do tipo horizontal ou quantitativa. No caso dos genitores utilizados nesse estudo não existe referência da presença de nenhum gene que confira resistência vertical, portanto, para reação a mancha angular, a pequena tolerância observada nesse estudo se deve basicamente ao acúmulo de alguns alelos de resistência de pequeno efeito, tratando-se de uma resistência do tipo horizontal. Pela Figura 4, nota-se que, na média dos 3 experimentos de avaliação da mancha angular, nenhuma família se mostrou realmente resistente, no entanto houve, em alguns experimentos específicos, famílias com moderado nível de resistência (notas de 2,5 a 3).

Provavelmente, o número de genes quantitativos que controlam a reação da planta à mancha angular é superior ao que controla a reação ao oídio, pois as estimativas do coeficiente *b* e herdabilidade obtidas para mancha angular foram bastante inferiores às obtidas para oídio (Tabelas 6 e 7).

Isto leva a concluir que apesar da existência de pequena variabilidade genética (Figura 4) entre as famílias para reação a mancha angular, para se

conseguir aumentar as chances de sucesso com a seleção de plantas ou famílias resistentes nessa população segregante, seria importante a utilização da seleção assistida por marcadores para complementar a informação fenotípica gerada pelas avaliações em campo. Dessa forma, um programa de mapeamento dos QTLs que participam do controle genético da reação horizontal do feijoeiro à mancha angular seria de fundamental importância para possibilitar a utilização da seleção assistida por marcadores, e consequentemente aumentar as chances de se conseguir genótipos com alta resistência horizontal a essa doença. Lande e Thompson (1990) comentam que quanto menor a herdabilidade do caráter a ser selecionado, maior será a eficiência da seleção assistida por marcadores em relação à seleção somente com avaliação fenotípica, o que mais uma vez reforça os benefícios de se mapear QTLs de reação à mancha angular, e em seguida utilizá-los em um programa de seleção assistida por marcadores. Além disso, o grande número de raças desse patógeno propicia uma instabilidade da resistência vertical, aumentando assim a importância da resistência horizontal e consequentemente aumentando também a importância do mapeamento e QTLs para reação à mancha angular no feijoeiro.

A análise conjunta (Tabela 7) de reação ao oídio e à mancha angular, para locais de cultivo, mostrou existir interação significativa entre famílias x locais. A correlação entre as médias das famílias nos dois locais foi de 43,80% para oídio e 37,98% para mancha angular, indicando que a maior parte da interação para essas características é do tipo complexa (Ramalho, Santos e Zimmermann, 1993). Assim, com essa baixa correlação, aumentam as chances do material superior em um ambiente não o ser em outro, complicando o trabalho de seleção.

Para confirmar o grande efeito da interação famílias com locais de cultivo foi calculada a herdabilidade considerando todos os fatores do modelo como



aleatórios (Vencovsky e Barriga, 1992). Dessa forma, obteve-se a estimativa da herdabilidade totalmente livre do efeito da interação. Para reação ao oídio a herdabilidade estimada nessa condição foi de 59,94% e para reação à mancha angular foi de 68,18%, confirmando assim o grande efeito da interação na expressão fenotípica da reação à essas doenças, principalmente para o oído, que teve sua herdabilidade mais reduzida pelo efeito da interação de famílias com locais. Assim sendo, existe a necessidade de avaliar essa característica em vários locais, pois as famílias apresentam comportamento específico para cada local utilizado.

Essa interação pode ser devida principalmente às diferenças na quantidade e na qualidade dos isolados que atuaram em cada um dos locais, visto que essa avaliação foi realizada com incidência natural do patógeno de cada área. Desta forma, em um trabalho de mapeamento de QTLs para essas características, deve-se, sempre que possível, procurar identificar tanto os QTLs responsáveis por essa interação, ou seja, aqueles que só se expressam com determinadas quantidades de isolados específicos, quanto aqueles mais constantes, que são aqueles que se expressam na maioria dos patossistemas. Nota-se que em trabalhos dessa natureza seria importante quantificar e identificar os isolados presentes em cada área para conseguir resultados de mapeamento mais específicos para cada variante do patógeno.

TABELA 6 - Resumo das análises de variâncias e estimativas do coeficiente de variação genético (CVg), relação entre coeficiente de variação genético e ambiental (b) e herdabilidade no sentido amplo ( $h_a^2$ ) com seus limites inferior (LI) e superior (LS), para reação ao oídio (*Erysiphe polygoni*) e a mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*).

Fontes de variação	GL	QM					
		Oídio			Mancha Angular		
		E1	E4	E5	E2	E3	E6
Trat. ajustado	195	9,07**	2,57**	4,37**	1,75**	0,90**	0,92**
Erro efetivo	169	0,46	0,31	0,31	0,72	0,50	0,41
Média		4,83	3,83	5,43	5,11	5,81	5,37
CVe (%)		14,05	14,48	10,22	16,58	12,18	11,86
CVg (%)		42,93	27,75	26,24	13,97	7,70	9,31
b		3,05	1,92	2,57	0,84	0,63	0,78
$h_a^2$ (%)		94,93	87,94	92,91	58,86	44,44	55,43
LI ( $h_a^2$ )		93,22	83,87	90,51	44,98	25,70	40,40
LS ( $h_a^2$ )		96,22	91,01	94,71	69,33	58,59	66,78

E1: experimento realizado em Lavras, geração F<sub>7</sub>, época de inverno, ano de 1996; E2: Lavras, F<sub>8</sub>, seca, 1997; E3: Patos de Minas, F<sub>8</sub>, seca, 1997; E4: Lavras, F<sub>9</sub>, inverno, 1997; E5: Patos de Minas, F<sub>9</sub>, inverno, 1997; E6: Lavras, F<sub>10</sub>, seca, 1998.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

TABELA 7 - Resumo das análises conjunta de variância e estimativas do coeficiente de variação genético (CVg), relação entre coeficiente de variação genético e ambiental (b) e herdabilidade no sentido amplo ( $h_a^2$ ) com seus limites inferior (LI) e superior (LS), para reação reação ao oídio (*Erysiphe polygona*) e a mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*).

Fontes de variação	Graus de liberdade	QM	
		Oídio	Mancha Angular
Locais (L)	1	311,98**	85,22**
Famílias (F)	195	7,24**	2,20**
L x F	195	2,90**	0,70**
Erro médio	507	0,36	0,54
Média		4,70	5,43
CVe (%)		12,76	13,53
CVg (%)		22,78	9,69
b		1,78	0,72
$h_a^2$ (%)		95,03 (59,94) <sup>a</sup>	75,45 (68,18) <sup>a</sup>
LI ( $h_a^2$ )		93,68	68,79
LS ( $h_a^2$ )		96,04	80,46

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. <sup>a</sup> Estimativa da herdabilidade considerando todos os fatores do modelo como aleatórios.

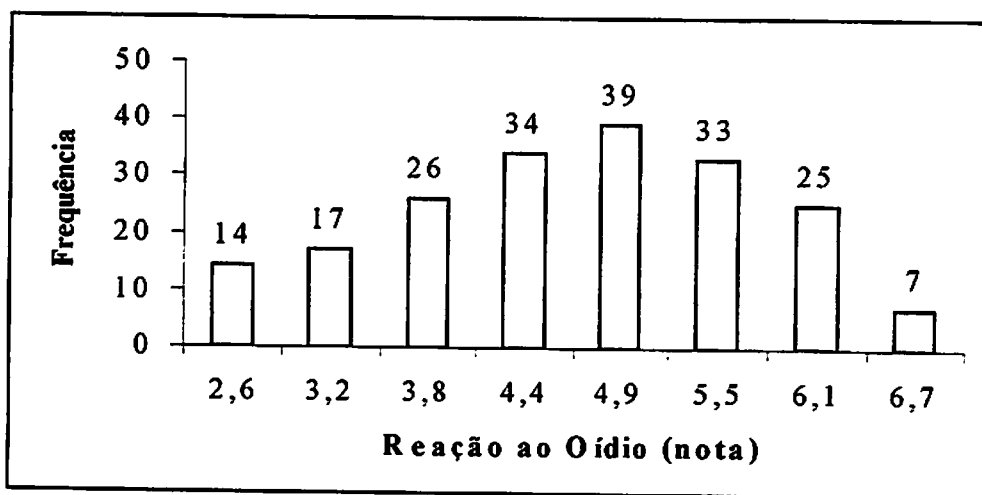


FIGURA 3 - Distribuição de frequência para reação ao oídio das famílias do cruzamento Carioca x Flor de Mayo, na média de todos os experimentos.

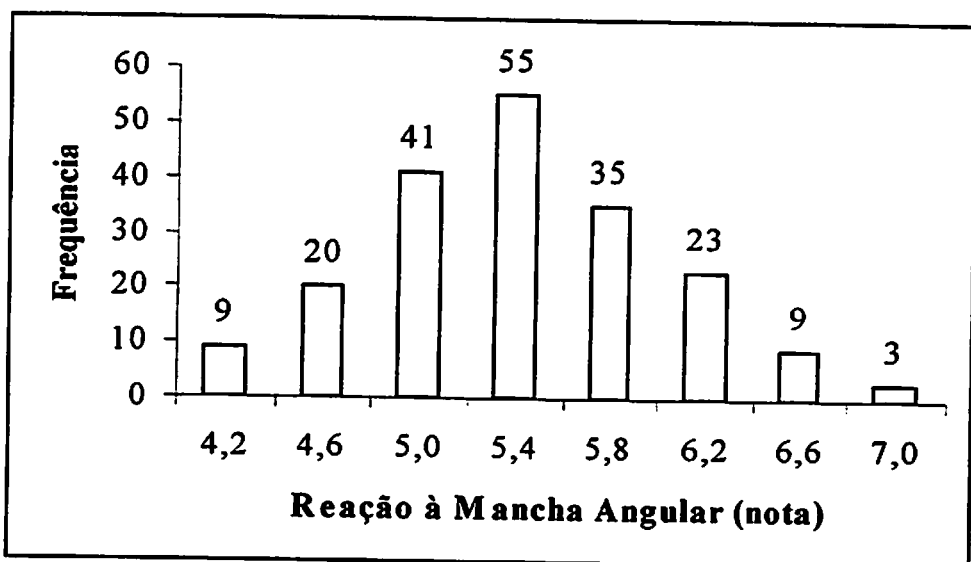


FIGURA 4 - Distribuição de frequência para reação a mancha angular do cruzamento Carioca x Flor de Mayo, na média de todos os experimentos.

#### 4.1.4 Produtividade de grãos

Em um programa de melhoramento do feijoeiro, a produtividade de grãos é uma das características mais importantes, embora seja a mais complexa, pois é dependente de vários outros caracteres e de inúmeros fatores ambientais. Neste estudo, em todos os experimentos, as famílias diferiram quanto à produtividade, mostrando ampla variabilidade (Tabelas 8 e 9; Figura 5).

A produtividade de grãos alcançou coeficientes de variação que podem ser considerados de médio para baixo, pois são semelhantes, e em alguns casos inferior, aos que têm sido obtidos em outros experimentos com feijão (Estefanel, Pignaro e Storck, 1987; Abreu *et al.*, 1994; Oliveira, 1995; Melo, Santos e Ramalho, 1997). As únicas exceções foram os experimentos 3 e 7, que tiveram uma precisão mais baixa, certamente devido a uma severa incidência do vírus do mosaico dourado.

As médias de produtividade foram relativamente altas, com exceção dos experimentos 3 e 7, mostrando que essa população, que foi oriunda de um cruzamento inter-racial, tem um grande potencial produtivo, tendo algumas famílias atingindo até a produtividade de 4000 kg/ha, em experimentos isolados. Houve tendência dos experimentos em Lavras terem maiores médias do que os de Patos de Minas e os de inverno, média maior dos que os da seca, indicando que Lavras, na época de inverno, é um ambiente mais favorável ao desenvolvimento do feijoeiro. Segundo Singh (1988), especificamente esses dois genitores utilizados nesse trabalho possuem elevado potencial de complementação alélica para alta produtividade, sendo essa a razão pela qual eles foram escolhidos para esse estudo. Abreu (1997), avaliando várias populações originadas por cruzamentos inter-raciais, identificou o cruzamento Carioca x Flor de Mayo como um dos mais promissores em termos de variabilidade para produtividade de grãos, confirmando o que foi relatado por Singh (1988).

Além das médias, as estimativas dos coeficientes *b* e das herdabilidades (Tabelas 8 e 9) também foram relativamente elevadas (com exceção dos experimentos 6 e 7), pois se trata de uma característica complexa, controlada por inúmeros genes, com grande influência do ambiente e, que portanto, normalmente, apresenta baixas estimativas desses parâmetros. As herdabilidades encontradas nesse estudo estão (com exceção dos experimentos 6 e 7) acima do normalmente relatado (Ramalho, Santos e Zimmermann, 1993) na cultura do feijoeiro, o que reforça o grande potencial das populações inter-raciais de feijoeiro, que aliam alta média com uma boa variabilidade (Figura 5), podendo-se antever ganho com a seleção para produtividade de grãos.

Vale ressaltar que apesar das grandes chances de conseguir material mais produtivo, essa população apresenta problemas bastante sérios, como hábito de crescimento indeterminado, o que leva a um porte prostrado, causando um intenso

acamamento, e com isso a maior umidade das vagens aumenta a incidência de doença e reduz a qualidade dos grãos. Além disso, existe outro sério problema, que é o tipo de grão. Apesar de um dos genitores ser a cultivar Carioca, que possui o tipo ideal de grão, o outro genitor possui grão com um padrão totalmente anti-comercial, o que levou a população segregante a ter uma variabilidade imensa de tipos de grãos, variando desde o tipo carioca (padrão) até o tipo azul escuro, passando por praticamente todos os variantes possíveis. Para tipo de grão, observou-se que existe muita variabilidade e pode-se selecionar material com grãos tipo carioca apesar de, nesse caso, certamente restringir a variabilidade da população. Mas no caso do porte prostrado, o problema parece mais sério, pois apesar dele não ter sido avaliado, as famílias utilizadas nesse estudo aparentemente não são ideais, e parece não existir variabilidade nessa população, sendo que novos cruzamentos com genitores de porte arbustivo seriam necessários para melhorar essa característica. No entanto, vale ressaltar que o melhoramento do porte é, na maioria dos casos, mais fácil do que a produtividade de grãos (Ramalho, Santos e Zimmermann, 1993; Collicchio, 1995).

A análise conjunta de produtividade de grãos (Tabela 9) para épocas e locais de cultivo mostrou existir interação significativa tanto para famílias x épocas quanto para famílias x locais. A correlação entre as médias das famílias nas duas épocas de cultivo foi de 1,05% e nos dois locais foi de 14,18%, indicando que a maior parte das interações para essa característica é do tipo complexa (Ramalho, Santos e Zimmermann, 1993) e com maior importância da interação dos genótipos com as épocas de cultivo, pois apresentaram menor estimativa de correlação e maior quadrado médio da interação (Tabela 9) quando comparados com locais. Portanto, essas baixas correlações aumentam em muito as chances do material superior em um ambiente não o ser em outro, complicando o trabalho de seleção.

Para confirmar o efeito da interação famílias por ambiente, na produtividade de grãos, foi calculada a herdabilidade considerando todos os fatores do modelo como aleatórios (Vencovsky e BARRIGA, 1992). Desta forma, obteve-se a estimativa desse parâmetro totalmente livre do efeito da interação no cálculo da variância genética. A estimativa de herdabilidade nessa condição foi de 0,0%, confirmando assim o intenso efeito da interação na expressão fenotípica da produtividade de grãos em feijoeiro. Assim sendo, existe a necessidade de se avaliar essa característica em várias épocas e locais, pois o desempenho das famílias é estritamente dependente da época e do local de cultivo utilizado.

Desta forma, em um trabalho de mapeamento de QTLs para essa característica, deve-se sempre procurar identificar tanto os QTLs responsáveis por essa interação, ou seja, aquelas que só se expressam em determinadas condições, quanto aqueles mais constantes, que se expressam na maioria dos ambientes.

**TABELA 8 - Resumo da análise de variância e estimativa do coeficiente de variação genético (CVg), relação entre coeficiente de variação genético e ambiental (b) e herdabilidade no sentido amplo ( $h_a^2$ ) com seus limites inferior (LI) e superior (LS), para produtividade de grãos (kg/ha) em sete experimentos.**

Fontes de variação	GL	QM						
		E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
Trat. ajustado	195	425105**	279128**	159180**	521166**	323030**	316480*	127546*
Erro efetivo.	169	235523	138765	83034	319665	195032	237986	94286
Média		2547	2636	1320	2694	2529	2507	1196
CVe (%)		19,05	14,30	21,83	20,99	17,46	19,46	25,66
CVg (%)		12,08	10,05	14,78	11,78	10,03	7,90	10,78
b		0,63	0,70	0,68	0,56	0,57	0,41	0,42
$h_a^2$ (%)		44,60	50,29	47,84	38,66	39,62	24,80	26,08
LI ( $h_a^2$ )		25,91	33,52	30,24	17,97	19,26	0,00	1,14
LS ( $h_a^2$ )		58,70	62,94	61,11	54,28	54,28	43,94	44,89

E1: experimento realizado em Lavras, geração F<sub>7</sub>, época de inverno, ano de 1996; E2: Lavras, F<sub>8</sub>, seca, 1997; E3: Patos de Minas, F<sub>8</sub>, seca, 1997; E4: Lavras, F<sub>9</sub>, inverno, 1997; E5: Patos de Minas, F<sub>9</sub>, inverno, 1997; E6: Lavras, F<sub>10</sub>, seca, 1998; E7: Patos de Minas, F<sub>10</sub>, seca, 1998.

\*, \*\* Significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.



TABELA 9 - Resumo da análise de variância conjunta e estimativa do coeficiente de variação genético (CVg), relação entre coeficiente de variação genético e ambiental (b) e herdabilidade no sentido amplo ( $h_a^2$ ) com seus limites inferior (LI) e superior (LS) para produtividade de grãos (kg/ha).

Fontes de variação	Graus de liberdade	QM
Locais (L)	1	561819395,00**
Épocas (E)	1	306233921,20**
Famílias (F)	195	424431,56**
F x L	195	298317,66**
F x E	195	438656,68**
F x L x E	195	273160,68**
Erro médio	1183	186327,28
Média		2204,14
CVe (%)		19,58
CVg (%)		5,92
b		0,30
$h_a^2$ (%)		56,10 (0,00) <sup>a</sup>
LI ( $h_a^2$ )		45,13
LS ( $h_a^2$ )		64,29

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. <sup>a</sup> Estimativa da herdabilidade considerando todos os fatores do modelo como aleatórios.

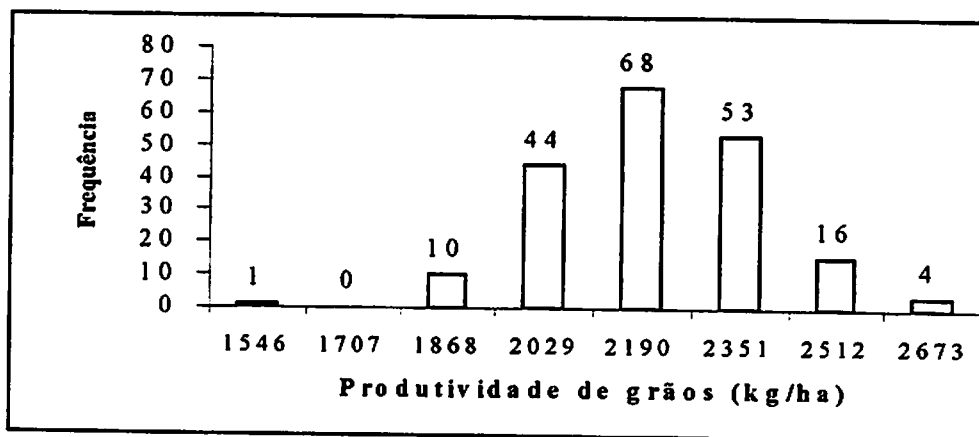


FIGURA 5 - Distribuição de frequência para produtividade de grãos das famílias do cruzamento Carioca x Flor de Mayo, na média de todos os experimentos.

## 4.2 Avaliação Molecular

Nesse trabalho foram utilizados 42 “primers” que geraram pelo menos uma banda polimórfica entre as famílias analisadas. Por sua vez, esses 42 “primers” produziram 92 produtos de amplificação (bandas) polimórficos, portanto com uma média de 2,19 bandas polimórficas/primer. O número de bandas polimórficas (Tabela 10) variou entre os primers, sendo o mínimo de uma e o máximo de cinco (OPN-07 e OPH-03).

Ao se realizar o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) com os 92 marcadores, verificou-se que 20 marcadores não apresentaram segregação mendeliana, e portanto tiveram que ser descartados. Dos 72 marcadores (bandas) restantes, nove foram descartados por apresentarem muitas observações perdidas, restando 63 para serem analisados (Tabela 11). Desta forma, foram eliminados um total de 29 marcadores, correspondentes à eliminação de oito “primers” (OP-A01, OP-AA06, OP-E14, OP-F04, OP-H13, OP-05, OP-S15 e OP-Z03). Assim, restaram 34 “primers” (Tabela 10), que forneceram 63 marcadores (Tabela 11) para a análise final. Assim, obteve-se uma média de 1,85 bandas polimórficas/primer, sendo que 18 “primers” apresentaram apenas uma banda polimórfica.

O polimorfismo encontrado nesse trabalho foi semelhante ao encontrado por Machado (1999) que estudou a divergência genética entre 11 cultivares/linhagens de feijoeiro com grãos tipo Carioca e um com grão preto. A autora justificou que o baixo nível de polimorfismo encontrado no estudo foi devido ao grande grau de parentesco entre os materiais avaliados. Outros trabalhos (Vasconcelos et al., 1996; Duarte, Santos e Melo, 1999) que utilizaram materiais menos aparentados obtiveram níveis de polimorfismo bastante superiores aos encontrados nesse estudo.

Apesar dos cultivares utilizados como genitores no cruzamento que originou a população em estudo serem de raças diferentes, o que acarreta um

aumento da variabilidade (polimorfismo) entre as famílias, observou-se a ocorrência de um baixo nível de polimorfismo (1,85 bandas/primer). Esse fato pode ser explicado pelo uso de famílias oriundas de um único cruzamento biparental, que mesmo sendo entre cultivares de duas raças diferentes, gera menor polimorfismo do que o estudo envolvendo várias cultivares divergentes.

Observando os dados da Tabela 11 verifica-se que o menor número de famílias genotipadas foi para o marcador OPAA-09, que foi utilizado em 188 famílias. Dos 63 marcadores obtidos, 26 (41,3%) não tiveram nenhuma informação perdida, ou seja, foram utilizados nas 196 famílias, 10 marcadores (15,9%) tiveram uma informação perdida e 7 (11,1%) tiveram duas. Desta forma, pode-se observar que, de uma forma geral, nesse estudo, os marcadores podem fornecer um alto nível de informação sobre as famílias avaliadas, pois 68,3% dos marcadores utilizados tiveram, no máximo, duas informações perdidas. Das 196 famílias, 150 (76,5%) foram genotipadas por todos os 63 marcadores, portanto tiveram todas as suas informações genéticas preservadas. Esse bom aproveitamento dos marcadores se deve a um rígido processo de seleção de primers e também ao descarte de alguns primers que tiveram muitas informações perdidas.

Os valores do teste de qui-quadrado foram muito variáveis (Tabela 11), sendo que o marcador que apresentou segregação mais próxima do esperado foi o OPS-13<sup>1</sup> ( $\chi^2 = 0,02$ ) e os que apresentaram as segregações mais distantes do esperado foram os marcadores OPB-07<sup>1</sup>, OPH-03<sup>4</sup>, OPN07<sup>4</sup> ( $\chi^2 = 11,80$ ).

TABELA 10 - Primers utilizados, respectivas sequências de bases e número de bandas polimórficas nas famílias avaliadas.

Iniciadores	Sequência (5'-3')	Nº de bandas polimórficas
OPAA-09	AGACGGCTCC	1
OPB-07	GGTGACGCGA	2
OPB-18	CCACAGCAGT	1
OPD-08	GTGTGCCCCA	1
OPE-15	ACGCACAACC	2
OPE-20	AACGGTGACC	2
OPF-10	GGAAGCTTGG	1
OPG-04	AGCGTGTCTG	1
OPG-16	AGCGTCCTCC	3
OPG-19	GTCAGGGCAA	1
OPH-02	TCGGACGTGA	1
OPH-03	AGACGTCCAC	5
OPI-03	CAGAAGCCCA	1
OPI-06	AAGGCGGCAG	1
OPI-07	CAGCGACAAG	1
OPJ-04	CCGAACACGG	1
OPM-06	CTGGGCAACT	3
OPN-02	ACCAGGGGCA	2
OPN-07	CAGCCCAGAG	5
OPN-10	ACA ACTGGGG	1
OPO-04	AAGTCCGCTC	1
OPO-06	CCACGGGAAG	1
OPO-10	TCAGAGCGCC	3
OPO-12	CAGTGCTGTG	1
OPO-13	GTCAGAGTCC	2
OPO-19	GGTGCACGTT	2
OPO-20	ACACACGCTG	4
OPR-02	CACAGCTGCC	2
OPR-12	ACAGGTGCGT	4
OPS-10	ACCGTTCAG	2
OPS-13	GTCGTTCTG	2
OPS-16	AGGGGGTTCC	1
OPS-19	GAGTCAGCAG	1
OPW-11	CTGATGCGTG	1

Como comentado anteriormente, ao se realizar o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) verificou-se que 20 marcadores não apresentaram segregação mendeliana e tiveram que ser descartados. Os possíveis motivos para um marcador não apresentar segregação mendeliana são: 1- erro tipo I, ou seja, considerar que um marcador não tem segregação mendeliana quando, na realidade, ele tem; 2- falso polimorfismo na ausência, ou seja, bandas que na verdade são monomórficas e apresentam polimorfismo devido a falhas nas reações, não por razões genéticas, dando assim um número de presença do marcador muito acima do esperado; 3- falso polimorfismo na presença (bandas fantasmas), ou seja, bandas que na verdade não são devidas ao material genético em análise e sim devidas a impurezas nos componentes da reação, levando ao aparecimento esporádico das bandas, dando assim um número de ausência da banda muito maior do que o esperado; 4- efeito da seleção natural sobre a característica a que o marcador está ligado. A seleção natural não atuará diretamente sobre o marcador RAPD, visto que esse não é responsável pela manifestação fenotípica, mas poderá atuar sobre um característica ligada a esse marcador, e assim modificar a segregação esperada com base no comportamento mendeliano. Nesse trabalho, esse efeito da seleção natural pode ter sido mais pronunciado, visto que a população foi conduzida em “bulk” por quatro gerações, o que favorece a atuação da seleção natural (Corte, 1999).

TABELA 11 - Origem parental e tamanho do marcador (pares de bases), número de famílias genotipadas (NFG), número observado de famílias com a presença do marcador (NOFM) e sem a presença do marcador (NOFSM), número esperado de famílias com a presença do marcador (NEFM) e sem a presença do marcador (NEFSM), e valor do teste de qui-quadrado ( $\chi_c^2$ ) para os marcadores utilizados nesse estudo. Lavras-MG, 2000.

Marcador*/ Origem**	Taman ho	NFG	NOF M	NOFSM	NEFM	NEFSM	$\chi_c^2$
OPAA-09/C	1059	188	114	74	100	88	4,29
OPB-07 <sup>1</sup> /C	676	196	128	68	104	92	11,8
OPB-07 <sup>2</sup> /F	631	196	111	85	104	92	1,00
OPB-18/C	1412	189	122	67	100	89	10,3
OPD-08/F	759	194	83	111	103	91	8,28
OPE-15 <sup>1</sup> /C	851	196	88	108	104	92	5,24
OPE-15 <sup>2</sup> /C	427	196	123	73	104	92	7,40
OPE-20 <sup>1</sup> /F	1585	196	101	95	104	92	0,18
OPE-20 <sup>2</sup> /F	891	196	108	88	104	92	0,33
OPF-10/C	1000	196	125	71	104	92	9,03
OPG-04/F	1259	196	128	68	104	92	11,8
OPG-16 <sup>1</sup> /C	851	193	125	68	102	91	11,0
OPG-16 <sup>2</sup> /C	676	191	117	74	101	90	5,38
OPG-16 <sup>3</sup> /F	602	192	95	97	102	90	1,02
OPG-19/F	851	189	91	98	100	89	1,72
OPH-02/F	1094	196	111	85	104	92	1,00
OPH-03 <sup>1</sup> /F	1318	196	115	81	104	92	2,48
OPH-03 <sup>2</sup> /F	1258	196	85	111	104	92	7,40
OPH-03 <sup>3</sup> /F	1112	196	81	115	104	92	10,8
OPH-03 <sup>4</sup> /F	759	196	128	68	104	92	11,8
OPH-03 <sup>5</sup> /C	562	196	127	69	104	92	10,8
OPI-03/C	955	196	126	70	104	92	9,91
OPI-06/F	480	194	82	112	103	91	9,13
OPI-07/F	631	195	126	69	103	92	10,8
OPJ-04/C	2344	195	93	102	103	92	2,06
OPM-06 <sup>1</sup> /C	1096	194	111	83	103	91	1,32
OPM-06 <sup>2</sup> /C	871	194	112	82	103	91	1,68
OPM-06 <sup>3</sup> /C	575	194	91	103	103	91	2,98
OPN-02 <sup>1</sup> /F	1445	195	125	70	103	92	9,96

....continua...

TABELA 11. Cont.

Marcador*/ Origem**	Tamanho	NFG	NOFM	NOFSM	NEFM	NEFSM	$\chi_c^2$
OPN-02 <sup>2</sup> /C	436	195	91	104	103	92	2,96
OPN-07 <sup>1</sup> /F	1698	196	83	113	104	92	9,03
OPN-07 <sup>2</sup> /C	1445	196	120	76	104	92	5,24
OPN-07 <sup>3</sup> /C	1072	196	115	81	104	92	2,48
OPN-07 <sup>4</sup> /C	741	196	80	116	104	92	11,8
OPN-07 <sup>5</sup> /F	661	196	109	87	104	92	0,51
OPN-10/C	851	192	96	96	102	90	0,75
OPO-04/C	1905	192	115	77	102	90	3,53
OPO-06/C	1778	195	87	108	103	92	5,27
OPO-10 <sup>1</sup> /C	2951	193	96	97	102	91	0,75
OPO-10 <sup>2</sup> /F	1479	195	117	78	103	92	4,03
OPO-10 <sup>3</sup> /F	525	196	117	79	104	92	3,46
OPO-12/C	1412	195	80	115	103	92	10,9
OPO-13 <sup>1</sup> /F	1698	196	96	100	104	92	1,31
OPO-13 <sup>2</sup> /C	1318	196	118	78	104	92	4,02
OPO-19 <sup>1</sup> /C	1636	195	97	98	103	92	0,74
OPO-19 <sup>2</sup> /C	1412	196	108	88	104	92	0,33
OPO-20 <sup>2</sup> /F	1698	190	91	99	101	89	2,11
OPO-20 <sup>3</sup> /C	1585	189	96	93	100	89	0,34
OPO-20 <sup>4</sup> /F	933	190	97	93	101	89	0,34
OPO-20 <sup>5</sup> /C	741	190	99	91	101	89	0,08
OPR-02 <sup>1</sup> /C	1230	192	118	74	102	90	5,35
OPR-02 <sup>2</sup> /C	832	192	79	113	102	90	11,1
OPR-12 <sup>1</sup> /C	3200	193	100	93	102	91	0,08
OPR-12 <sup>2</sup> /F	1072	194	121	73	103	91	6,71
OPR-12 <sup>3</sup> /C	1000	193	80	113	102	91	10,1
OPR-12 <sup>4</sup> /F	794	193	116	77	102	91	4,08
OPS-10 <sup>1</sup> /C	794	196	90	106	104	92	4,02
OPS-10 <sup>2</sup> /F	562	196	117	79	104	92	3,46
OPS-13 <sup>1</sup> /C	1950	195	104	91	103	92	0,02
OPS-13 <sup>2</sup> /F	1122	195	91	104	103	92	2,96
OPS-16/F	640	193	86	107	102	91	5,32
OPS -19/C	1122	194	101	93	103	91	0,08
OPW-11/F	676	191	86	105	101	90	4,73

\*refere-se ao tamanho do segmento de DNA utilizado como marcador (banda): quanto menor o expoente maior o tamanho do segmento. Valor do  $\chi_c^2 = 11,96$  ( $\alpha = 5\%$ , com correção de bonferroni). \*\* Origem parental do marcador: C - marcador originário do genitor Carioca e F originário do Flor de Mayo.

#### **4.2.1 Identificação de marcadores RAPD ligados a QTLs por meio de análise de regressão linear múltipla**

Inicialmente, foi realizada uma análise de regressão múltipla (com seleção pelo processo de Stepwise), considerando todos os 63 marcadores identificados nesse trabalho (Tabela 11), para cada experimento e para cada característica avaliada nesse trabalho. Em seguida, foram realizadas análises de regressões conjuntas por locais e/ou épocas e na média geral de acordo com os experimentos individuais de cada característica. Para cada uma dessas regressões, foram obtidas estimativas dos coeficientes de regressão de cada marcador (variável independente), o coeficiente de determinação parcial ( $R^2$  parcial) de cada marcador, que dá uma idéia da proporção da variância genética total explicada pelo marcador em questão, o erro padrão da estimativa de cada coeficiente (parâmetro) e o valor do teste de t que revela se esse coeficiente é estatisticamente diferente de zero.

##### **4.2.1.1 - Análise de regressão para época de florescimento**

A análise de regressão para florescimento (Tabela 12) no experimento realizado no inverno de 1996, em Lavras, identificou 6 marcadores RAPD ligados a QTLs que participam do controle genético dessa característica, sendo que 4 estão ligados a QTLs que tendem a reduzir (sinal negativo) o número de dias para o florescimento e 2 que tendem a aumentar (sinal positivo). Os marcadores que explicaram a maior proporção da variação genética (maior  $R^2$ ) foram o OPR-02<sup>1</sup> (com 7,04%, no sentido de aumentar) e o OPO-13<sup>2</sup> (com 9,23%, no sentido de reduzir). No conjunto, todos os marcadores explicaram 34,33% da variação genética, ou seja, foram responsáveis por mais de um terço da variação genética do florescimento. Para o segundo experimento de florescimento (Lavras, F<sub>8</sub>, seca, 1997), identificou-se apenas um marcador ligado a QTL (OPE-20<sup>2</sup>, com 3,80%



no sentido de reduzir), sendo que esse marcador não tinha sido identificado no primeiro experimento. No terceiro experimento (Lavras, F<sub>9</sub>, inverno, 1997), foram encontrados 3 marcadores ligados a QTLs que controlam o florescimento, sendo 2 no sentido de reduzir (OPE-20<sup>2</sup> e OPO-13<sup>2</sup>) a expressão do caráter e 1 no sentido de aumentar (OPN-07<sup>2</sup>), todos responsáveis por menos de 4 % da variação genética. Os dois marcadores que atuam no sentido de reduzir o fenótipo do caráter já tinham sido identificados anteriormente, mas o que atua no sentido de aumentar apareceu pela primeira vez nesse experimento. No quarto experimento para florescimento (Lavras, F<sub>10</sub>, seca, 1998) foi identificado apenas 1 marcador (OPO-13<sup>2</sup>) no sentido de reduzir a expressão dessa característica, explicando 4,92% da variação genética. Esse marcador já tinha sido identificado em outros 2 experimentos, mostrando estar ligado a um QTL mais estável.

Quando se observa a análise conjunta do florescimento somente nos experimentos realizados na época de inverno verifica-se que existem 6 marcadores ligados a QTLs, sendo 4 (OPE-20<sup>2</sup>, OPN-07<sup>2</sup>, OPD-08, OPO-13<sup>2</sup>) no sentido de reduzir e 2 (OPR-02<sup>1</sup>, OPG-16<sup>1</sup>) no sentido de aumentar a expressão desse caráter. Todos esses marcadores já haviam sido identificados em pelo menos um dos experimentos individuais. Mais uma vez, o marcador OPO-13<sup>2</sup> mostrou estar ligado a um QTL de grande estabilidade, pois foi o mais importante para explicar a variação do florescimento das famílias na época de inverno, sendo responsável por 10,42% da variação dessa característica nessa época de cultivo. No conjunto, todos os marcadores explicaram 28,37% da variação genética do florescimento na época de inverno. Na época da seca, não se conseguiu identificar nenhum marcador ligado a QTL, especificamente nessa condição.

Na análise conjunta (Tabela 12), a partir das médias de todos os experimentos, identificaram-se 5 marcadores ligados a QTLs, sendo quatro (OPE-20<sup>1</sup>, OPN-07<sup>2</sup>, OPN-07<sup>4</sup>, OPO-13<sup>2</sup>) no sentido de reduzir e um (OPR-02<sup>1</sup>)

no sentido de aumentar o número de dias para o florescimento. Mais uma vez se confirmou a maior importância do marcador OPO-13<sup>2</sup>, que explicou, na média de todos os experimentos, 12,91% da variação genética total das famílias para essa característica. Em conjunto, os marcadores conseguiram explicar 32,15% da variação genética, ou seja, quase um terço de toda essa variação. Vale ressaltar que a grande maioria dos marcadores ligados a QTLs identificados nesse trabalho foram de pequeno efeito e no sentido de reduzir o ciclo da cultura, sendo encontrados apenas 3 marcadores que atuam no sentido de aumentar a expressão desse caráter. O pequeno efeito dos marcadores se deve, principalmente, à ausência de alelos de efeito principal na população estudada. Dessa forma, a maioria dos marcadores encontrados foram responsáveis por parcelas relativamente pequenas da variação genética estimada.

TABELA 12 - Resumos das análises de regressões múltiplas para florescimento utilizando o processo de Stepwise para seleção dos marcadores.

Marcadores	Estimativas dos Parâmetros	R <sup>2</sup> parcial	Erro padrão	Teste de t*
<b>LAVRAS - F<sub>7</sub> - INVERNO - 1996</b>				
Intercepto	59,70		0,56	106,75
OPE-20 <sup>1</sup>	-0,84	0,0239	0,37	-2,28
OPN-07 <sup>4</sup>	-1,23	0,0492	0,38	-3,21
OPD-08	-1,10	0,034	0,38	-2,88
OPR-02 <sup>1</sup>	1,37	0,0704	0,39	3,53
OPO-13 <sup>2</sup>	-1,55	0,0923	0,38	-4,10
OPG-16 <sup>1</sup>	1,33	0,0735	0,40	3,34
<b>LAVRAS, F<sub>8</sub>, SECA, 1997</b>				
Intercepto	43,35		0,16	263,82
OPE-20 <sup>2</sup>	-0,53	0,038	0,22	-2,42
<b>LAVRAS, F<sub>9</sub>, INVERNO, 1997</b>				
Intercepto	58,11		0,50	116,57
OPE-20 <sup>2</sup>	-0,89	0,0271	0,43	-2,09
OPN-07 <sup>2</sup>	1,07	0,0294	0,42	2,56
OPO-13 <sup>2</sup>	-1,30	0,0361	0,44	-2,97
<b>LAVRAS, F<sub>10</sub>, SECA, 1998</b>				
Intercepto	41,72		0,12	346,42
OPO-13 <sup>2</sup>	-0,44	0,0492	0,16	-2,77
<b>MÉDIA - INVERNO</b>				
Intercepto	59,21		0,44	135,67
OPE-20 <sup>2</sup>	-0,72	0,0328	0,29	-2,48
OPN-07 <sup>4</sup>	-0,75	0,0532	0,28	-2,66
OPD-08	-0,61	0,0238	0,28	-2,18
OPR-02 <sup>1</sup>	0,68	0,0414	0,29	2,38
OPO-13 <sup>2</sup>	-1,42	0,1042	0,29	-4,84
OPG-16 <sup>1</sup>	0,74	0,0283	0,29	2,54
<b>MÉDIA - SECA - Nenhum marcador identificado</b>				
<b>MÉDIA - GERAL</b>				
Intercepto	51,19		0,29	179,27
OPE-20 <sup>1</sup>	-0,49	0,0298	0,19	-2,50
OPN-07 <sup>2</sup>	-0,48	0,0396	0,21	-2,33
OPN-07 <sup>4</sup>	-0,70	0,0572	0,20	-3,46
OPR-02 <sup>1</sup>	0,75	0,0658	0,20	3,73
OPO-13 <sup>2</sup>	-0,93	0,1291	0,20	-4,68

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de t.

#### **4.2.1.2 - Análise de regressão para peso de 100 sementes**

A análise de regressão para peso de 100 sementes (Tabela 13) no primeiro experimento (Lavras - F<sub>7</sub> - inverno - 1996) identificou sete marcadores ligados a QTLs que participam do controle genético desse caráter, sendo três no sentido de reduzir e quatro no sentido de aumentar sua expressão. O marcador OPM-06<sup>1</sup> foi o que explicou a maior parte da variação genética (12,54%) dessa característica nesse experimento, sendo que todos os marcadores em conjunto conseguiram explicar 32,89% dessa variação. Portanto, nesse experimento os marcadores RAPD conseguiram explicar praticamente um terço de toda a variação genética, mostrando que podem ser ferramentas importantes no processo de seleção.

No segundo experimento, foram encontrados apenas dois marcadores ligados a QTLs, os dois atuando no sentido de reduzir a expressão do caráter, sendo que nenhum explicou mais de 3% da variação genética e nenhum tinha sido identificado no experimento anterior.

No terceiro experimento, foram identificados quatro marcadores ligados, sendo três no sentido de reduzir e um no sentido de aumentar o peso das sementes. O marcador OPO-12 foi o que explicou a maior parte da variação genética (7,83%) nesse experimento. Vale salientar que nesse experimento, o marcador OPM-06<sup>1</sup> manifestou um efeito oposto ao identificado no primeiro experimento, passando de um efeito positivo para um negativo. Esses dois experimentos foram realizados em condições de locais e épocas de cultivo totalmente diferentes, o que deve ter acentuado em muito o efeito da interação das famílias com o ambiente, fazendo com que houvesse um inversão no sentido da resposta do QTL identificado por esse marcador.

No quarto experimento, foram encontrados três marcadores ligados (dois para reduzir e um aumentar o fenótipo), sendo que nenhum explicou mais de 4 %

da variação genética total. No quinto experimento, não se identificou nenhum marcador ligado a QTLs para peso de 100 sementes. No sexto experimento, foram identificados dois marcadores que atuavam no sentido de reduzir o fenótipo, mas que explicavam pequena parte da variação genética. No sétimo experimento, encontraram-se quatro marcadores ligados a QTLs de peso de 100 sementes, todos no sentido de reduzir, novamente explicando pequena parte da variação dessa característica.

A análise de regressão conjunta, considerando apenas os experimentos realizados em Lavras, identificou três marcadores ligados a QTLs que controlam o peso de 100 sementes, todos no sentido de reduzir a expressão do caráter, sendo que o marcador OPN-07<sup>3</sup> foi que explicou a maior parte da variação genética (7,26%) especificamente nesse local. Esse marcador já tinha sido identificado em outros 2 experimentos, sendo que, no primeiro experimento, realizado em Lavras, ele explicou 6,0 % da variação genética do peso de 100 sementes. Portanto, esse marcador pode ser útil para auxiliar nos processos seletivos realizados em Lavras, principalmente quando o objetivo for a redução do tamanho da semente de feijoeiro, e quando se utilizar algum genitor oriundo da população utilizada nesse trabalho.

A análise de regressão conjunta, considerando apenas os experimentos realizados em Patos de Minas, também identificou três marcadores ligados a QTLs que controlam o peso de 100 sementes, todos no sentido de reduzir o seu fenótipo, sendo que o marcador OPS-13<sup>2</sup> foi o que explicou a maior parte da variação genética desse caráter (4,33%) especificamente nesse local. Esse marcador já tinha sido identificado em outro experimento (7) realizado em Patos de Minas, onde explicou 3,57 % da variação genética do peso de 100 sementes. As análises conjuntas para Lavras e Patos de Minas não identificaram nenhum marcador em comum, mostrando a dificuldade de conseguir ganhos para os dois

locais simultaneamente, reforçando os resultados de interação significativa entre famílias e locais para peso de 100 sementes encontrado nas análises anteriores (Tabela 5).

A análise de regressão conjunta, considerando apenas os experimentos realizados na época de inverno, identificou dois marcadores ligados a QTLs que controlam o peso de 100 sementes, sendo um no sentido de reduzir e o outro no sentido de aumentar o fenótipo desse caráter, sendo que o marcador OPN-07<sup>3</sup> foi o que explicou a maior parte da variação genética (8,23%) especificamente nessa época. Esse marcador já tinha sido identificado em outros 2 experimentos, sendo que, no primeiro experimento, realizado no inverno, ele explicou 6,0% da variação genética do peso de 100 sementes. Esse marcador também foi identificado na análise conjunta dos experimentos em Lavras.

A análise de regressão conjunta, considerando apenas os experimentos realizados na época da seca, identificou apenas um marcador (OPN-02<sup>1</sup>) ligado a QTL que controla o peso de 100 sementes, no sentido de reduzir o fenótipo do caráter, explicando menos de 4% da variação genética entre famílias, especificamente nessa época. Esse marcador também foi identificado no experimento 6 e nas análises conjuntas dos experimentos realizados em Lavras e em Patos de Minas, mas em todos os casos foi responsável por menos de 4,5% da variação genética total do caráter.

A análise de regressão conjunta, considerando todos os experimentos, identificou três marcadores ligados a QTLs que controlam o peso de 100 sementes, todos no sentido de reduzir a expressão do caráter, e todos explicando menos de 4,5% da variação genética entre famílias. Os três marcadores em conjunto explicaram 9,79% dessa variação. O marcador (OPN-02<sup>1</sup>) novamente foi identificado como ligado a um QTL, indicando que realmente trata-se de uma ligação a QTL bastante estável, mas que possui pequeno efeito, ao contrário do

relatado por Tanksley (1993), que sugere que os QTLs de maiores efeitos são os mais estáveis. No entanto, o critério de estabilidade adotado por esse autor parece ser diferente do utilizado nesse trabalho, pois a autor considerou como estável, simplesmente, os QTLs que eram detectados nos diferentes ambientes e nesse estudo foram considerados estáveis os QTLs identificados em vários ambientes e que mantiveram seu efeito constante na maioria deles.

A interação observada de famílias com locais e com épocas de cultivo (Tabela 5), e também a pequena variabilidade (Figura 2) para esse caráter, explicam o pequeno número de marcadores estáveis e de grande efeito identificados nesse trabalho.

Considerando que o tamanho pequeno da semente é indesejável, a maioria dos QTLs identificados pelos marcadores não foi favorável para o melhoramento do peso de sementes, embora a seleção para ausência dos referidos marcadores possa auxiliar, apesar de com menor eficiência, na obtenção de genótipos com sementes maiores.

TABELA 13 - Resumos das análises de regressões múltiplas para peso de 100 sementes utilizando o processo de Stepwise para seleção dos marcadores.

Marcadores	Estimativas dos Parâmetros	R <sup>2</sup> parcial	Erro padrão	Teste de t*
1 - LAVRAS - F <sub>7</sub> - INVERNO - 1996				
Intercepto	24,88		0,63	39,80
OPE-20 <sup>1</sup>	0,85	0,0362	0,38	2,22
OPM-06 <sup>1</sup>	1,39	0,1254	0,39	3,55
OPN-07 <sup>3</sup>	-1,39	0,06	0,42	-3,33
OPR-02 <sup>1</sup>	0,92	0,0204	0,39	2,35
OPG-04	-1,25	0,0296	0,41	-3,06
OPN-02 <sup>2</sup>	-1,01	0,0337	0,40	-2,56
OPS-16	0,88	0,0236	0,39	2,24
2 - LAVRAS, F <sub>8</sub> , SECA, 1997				
Intercepto	23,56		0,35	66,90
OPE-15 <sup>1</sup>	-1,00	0,0279	0,42	-2,41
OPO-19 <sup>1</sup>	-0,85	0,0271	0,42	-2,05
3 - PATOS DE MINAS, F <sub>8</sub> , SECA, 1997				
Intercepto	21,90		0,43	50,48
OPE-20 <sup>2</sup>	-1,20	0,0312	0,46	-2,63
OPM-06 <sup>1</sup>	-0,89	0,0393	0,43	-2,09
OPO-12	-1,56	0,0783	0,51	-3,05
OPH-03 <sup>3</sup>	1,10	0,0272	0,50	2,19
4 - LAVRAS, F <sub>9</sub> , INVERNO, 1997				
Intercepto	58,11		0,50	116,57
OPE-20 <sup>2</sup>	-0,89	0,0271	0,43	-2,09
OPN-07 <sup>2</sup>	1,07	0,0294	0,42	2,56
OPO-13 <sup>2</sup>	-1,30	0,0361	0,44	-2,97
5 - PATOS DE MINAS, F <sub>9</sub> , INVERNO, 1997 - Nenhum marcador identificado				
6 - LAVRAS, F <sub>10</sub> , SECA, 1998				
Intercepto	27,12		0,47	57,10
OPI-07	-0,87	0,0254	0,44	-2,00
OPN-02 <sup>1</sup>	-1,12	0,042	0,43	-2,62

...continua...



TABELA 13, Cont.

7 - PATOS DE MINAS, F <sub>10</sub> , SECA, 1998				
Intercepto	29,58		0,69	42,79
OPN-07 <sup>3</sup>	-1,08	0,024	0,54	-1,99
OPD-08	-1,31	0,0408	0,53	-2,47
OPN-02 <sup>1</sup>	-1,24	0,0259	0,56	-2,23
OPS-13 <sup>2</sup>	-1,60	0,0357	0,54	-2,99
MÉDIA - LAVRAS				
Intercepto	33,79		0,25	133,02
OPE-20 <sup>2</sup>	-0,47	0,037	0,22	-2,17
OPN-07 <sup>3</sup>	-0,76	0,0726	0,22	-3,46
OPN-02 <sup>1</sup>	-0,49	0,0265	0,23	-2,12
MÉDIA - PATOS DE MINAS				
Intercepto	25,90		0,45	57,39
OPN-02 <sup>1</sup>	-0,69	0,028	0,41	-1,67
OPN-02 <sup>2</sup>	-1,23	0,0262	0,41	-2,97
OPS-13 <sup>2</sup>	-1,12	0,0433	0,42	-2,65
MÉDIA - INVERNO				
Intercepto	36,14		0,27	136,29
OPM-06 <sup>1</sup>	0,58	0,0317	0,25	2,29
OPN-07 <sup>3</sup>	-0,75	0,0823	0,25	-2,96
MÉDIA - SECA				
Intercepto	24,60		0,32	77,23
OPN-02 <sup>1</sup>	-0,95	0,0395	0,38	-2,47
MÉDIA - GERAL				
Intercepto	30,18		0,30	101,27
OPE-20 <sup>2</sup>	-0,51	0,0429	0,25	-2,01
OPN-07 <sup>3</sup>	-0,56	0,0298	0,26	-2,20
OPN-02 <sup>1</sup>	-0,64	0,0252	0,27	-2,34

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de t.

#### 4.2.1.3 - Análise de regressão para reação à mancha angular

A análise de regressão para reação a mancha angular (Tabela 14) no primeiro experimento (Lavras - F<sub>8</sub> - seca - 1997) identificou três marcadores ligados a QTLs que participam do controle genético desse caráter, sendo um no sentido de reduzir e dois no sentido de aumentar a ocorrência da doença. O

marcador OPE-20<sup>2</sup> foi o que explicou a maior parte da variação genética (5,62%) desse caráter nesse experimento, sendo que todos os marcadores em conjunto conseguiram explicar 14,41% dessa variação. No segundo experimento também foram identificados três marcadores ligados a QTLs, sendo um no sentido de reduzir e dois no sentido de aumentar a ocorrência da doença, todos explicaram menos de 3,5% da variação genética. No terceiro experimento identificaram-se quatro marcadores ligados, sendo um no sentido de reduzir e três no sentido de aumentar a ocorrência de mancha angular. O marcador OPR-12<sup>1</sup> foi o que explicou a maior parte da variação genética (7,11%), sendo que, em conjunto, todos os marcadores explicaram 16,04% da variação genética desse caráter. Vale ressaltar que nenhum dos marcadores identificados em um experimento se repetiu em outro, indicando forte interação QTLs por ambientes (locais), como verificado nos resultados anteriores (Tabela 7). Com relação a esse caráter, uma das causas da interação QTLs x locais pode ser a provável ocorrência de raças diferentes do patógeno ou mesmo às diferenças nas condições epidemiológicas manifestadas nos diferentes locais (Sartorato e Rava, 1994).

A análise de regressão conjunta, considerando todos os experimentos, identificou cinco marcadores ligados a QTLs que controlam a reação do feijoeiro à mancha angular, sendo um no sentido de reduzir e quatro no sentido de aumentar a severidade dessa doença, e todos explicando menos de 5% da variação genética entre famílias. Os cinco marcadores em conjunto explicaram 16,57% dessa variação. Vale ressaltar que o marcador OPH-03<sup>4</sup> não tinha sido identificado em nenhum experimento que avaliou essa característica, mas foi identificado na análise conjunta. Provavelmente, trata-se de um QTL estável, mas de pequeno efeito, o que fez com que ele fosse identificado somente na análise com as médias gerais, na qual teve seu efeito final amplificado. A interação observada de famílias com locais (Tabela 7), e também a pequena variabilidade

(Figura 3) para esse caráter, explicam o pequeno número de marcadores estáveis e de grande efeito identificados nesse trabalho. O grande número de QTLs com efeito positivo, ou seja, de aumentar a severidade da doença, muito provavelmente se deve ao baixo nível de resistência demonstrado pelas famílias avaliadas nesse estudo (Figura 3). Entretanto, é necessário destacar que os QTLs que reduziram a severidade da doença, entre eles o OPN-02<sup>2</sup>, podem contribuir para a obtenção de cultivares de feijoeiro mais resistentes à mancha angular.

TABELA 14- Resumos das análises de regressões para reação à Mancha Angular utilizando Stepwise para seleção dos marcadores.

Marcadores	Estimativas dos Parâmetros	R <sup>2</sup> parcial	Erro padrão	Teste de t*
<b>1 - LAVRAS, F<sub>8</sub>, SECA, 1997</b>				
Intercepto	4,76		0,17	28,64
OPE-20 <sup>2</sup>	0,76	0,0562	0,17	4,53
OPO-13 <sup>2</sup>	0,38	0,0334	0,16	2,39
OPN-02 <sup>2</sup>	-0,54	0,0545	0,16	-3,45
<b>2 - PATOS DE MINAS, F<sub>8</sub>, SECA, 1997</b>				
Intercepto	5,71		0,12	47,14
OPF-10	-0,25	0,0271	0,11	-2,22
OPR-02 <sup>1</sup>	0,22	0,0256	0,11	2,02
OPO-20 <sup>3</sup>	0,28	0,0342	0,11	2,62
<b>3 - LAVRAS, F<sub>10</sub>, SECA, 1998</b>				
Intercepto	4,99		0,13	37,74
OPN-07 <sup>5</sup>	0,31	0,027	0,11	2,71
OPR-12 <sup>1</sup>	0,46	0,0711	0,11	4,19
OPR-12 <sup>3</sup>	-0,41	0,0306	0,13	-3,11
OPS-13 <sup>1</sup>	0,31	0,0317	0,13	2,34
<b>MÉDIA - GERAL</b>				
Intercepto	4,86		0,16	31,29
OPE-20 <sup>2</sup>	0,46	0,0475	0,11	4,17
OPO-13 <sup>2</sup>	0,22	0,0333	0,11	2,05
OPN-02 <sup>2</sup>	-0,24	0,0253	0,11	-2,29
OPH-03 <sup>4</sup>	0,26	0,0301	0,12	2,28
OPR-12 <sup>1</sup>	0,32	0,0295	0,11	3,01

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de t.

#### 4.2.1.4 - Análise de regressão para reação ao oídio

A análise de regressão para reação ao oídio (Tabela 15) no primeiro experimento (Lavras - F<sub>7</sub> - inverno - 1996) identificou nove marcadores ligados a QTLs que participam do controle genético desse caráter, sendo cinco no sentido de reduzir e quatro no sentido de aumentar a ocorrência da doença. O marcador OPR-02<sup>2</sup> foi o que explicou a maior parte da variação genética (27,41%) nesse experimento, sendo que todos os marcadores em conjunto conseguiram explicar 63,86% dessa variação. Esse resultado mostra o grande potencial que os marcadores moleculares têm para se tornarem uma ferramenta importante no processo de seleção dentro de um programa de melhoramento. Somente um marcador explicou quase um terço de toda a variação genética estimada nesse caráter, e todos os marcadores em conjunto explicaram praticamente dois terços dessa variação. Vale ressaltar que, as estimativas do parâmetro b e da herdabilidade para reação ao oídio foram bastante elevadas para todos os experimentos individuais (Tabela 6) e também na análise conjunta (Tabela 7), o que deve ter contribuído para identificação marcadores que explicaram grande parte da variação genética dessa doença. Isso mostra que, em alguns casos, os marcadores realmente podem participar de forma bastante efetiva do processo de melhoramento.

No segundo experimento identificaram-se apenas dois marcadores ligados a QTLs, sendo os dois no sentido de reduzir a ocorrência da doença, explicando no máximo 5% da variação genética. No terceiro experimento identificaram-se três marcadores ligados, os três no sentido de reduzir a ocorrência de oídio, sendo que nenhum marcador explicou mais de 4,5% da variação genética. Vale ressaltar que apenas um dos marcadores (OPD-08) foi identificado em todos os três experimentos individuais. A identificação de vários QTLs específicos indica a ocorrência de forte interação QTLs por ambientes (locais), como verificado nos

resultados anteriores (Tabela 7). A cultivar Carioca, que vem se mostrando resistente ao oídio na maioria dos locais em que ela é cultivada, foi suscetível ao patógeno em Patos de Minas, sugerindo a ocorrência de diferentes raças patogênicas nesses locais, o que contribui para o aumento da interação QTLs x ambientes, visto que devem existir QTLs que conferem resistência específica à algumas raças que ocorrem em apenas um local.

A análise de regressão conjunta, considerando todos os experimentos, identificou oito marcadores ligados a QTLs para reação ao oídio, sendo três no sentido de reduzir e cinco no sentido de aumentar a severidade dessa doença, sendo que o marcador OPR-02<sup>2</sup> explicou 13,42% da variação genética entre famílias. Os oito marcadores em conjunto explicaram 38,56% dessa variação. Mesmo o marcador OPR-02<sup>2</sup> sendo identificado somente no primeiro experimento, manteve um alto grau de importância na análise conjunta, mostrando que pode ser muito importante para seleção na média de vários ambientes.

A interação observada de famílias com locais (Tabela 7), e também a restrita variabilidade (Figura 4) para esse caráter, explicam o pequeno número de marcadores estáveis nesse trabalho. O QTL ligado ao marcador OPR-02<sup>2</sup>, apesar do grande efeito, parece sofrer grande influência da interação com locais, sendo o mesmo o comportamento da maioria dos QTLs identificados, o que leva à redução da variação genética explicada quando se avalia o comportamento na média dos experimentos. No entanto, o marcador OPD-08 foi o único que se manifestou em todos os experimentos individuais e também na análise conjunta, indicando ser de maior estabilidade mesmo sendo de pequeno efeito, ou seja, mesmo explicando pequena parte da variação genética (em média 6,5%), ele é responsável por uma resistência mais estável. O grande número de QTLs com efeito positivo, ou seja, de aumentar a severidade da doença, muito provavelmente

se deve ao baixo nível de resistência demonstrado pelas famílias avaliadas nesse trabalho (Figura 5). Mas, nesse caso, mesmo não tendo a mesma eficiência, pode se selecionar para a ausência da banda (marcador) para tentar aumentar a resistência das cultivares.

No caso de QTLs que são responsáveis por reação a patógenos, tanto os de efeitos gerais quanto os específicos por ambientes são úteis em um programa de melhoramento, uma vez que a ocorrência de raças diferentes do patógeno nos diferentes ambientes são a principal causa da interação genótipos x ambientes, e por isso, muitas vezes se justifica a realização de seleção especificamente em um determinado local. Assim, pode-se utilizar as informações dos QTLs ligados a alelos de resistência que se expressam especificamente em um local, visando o desenvolvimento de cultivares para recomendação específica para uma região.

TABELA 15- Resumos das análises de regressões múltiplas para reação ao oídio utilizando o processo de Stepwise para seleção dos marcadores.

Marcadores	Estimativas dos Parâmetros	R <sup>2</sup> parcial	Erro padrão	Teste de t*
<b>LAVRAS - F<sub>7</sub>- INVERNO - 1996</b>				
Intercepto	5,53		0,40	13,74
OPD-08	-1,02	0,0638	0,23	-4,41
OPR-02 <sup>1</sup>	-1,13	0,1132	0,24	-4,65
OPR-02 <sup>2</sup>	1,86	0,2741	0,28	6,66
OPS-10 <sup>2</sup>	-1,05	0,0325	0,27	-3,95
OPO-19 <sup>2</sup>	-0,78	0,0214	0,26	-3,02
OPH-03 <sup>2</sup>	-1,07	0,0338	0,24	-4,54
OPH-03 <sup>5</sup>	0,56	0,0128	0,25	2,23
OPS-16	0,72	0,0288	0,23	3,12
OPG-16 <sup>1</sup>	0,85	0,0582	0,26	3,24
<b>LAVRAS, F<sub>9</sub>, INVERNO, 1997</b>				
Intercepto	4,33		0,17	25,36
OPM-06 <sup>1</sup>	-0,42	0,0311	0,19	-2,23
OPD-08	-0,58	0,0502	0,19	-3,13
<b>PATOS DE MINAS, F<sub>9</sub>, INVERNO, 1997</b>				
Intercepto	6,46		0,30	21,64
OPN-10	-0,70	0,0322	0,23	-2,98
OPD-08	-0,74	0,0416	0,24	-3,09
OPH-03 <sup>4</sup>	-0,54	0,0284	0,25	-2,15
<b>MÉDIA - GERAL</b>				
Intercepto	4,65		0,24	19,60
OPN-10	-0,40	0,0345	0,16	-2,55
OPD-08	-0,69	0,0768	0,16	-4,44
OPR-02 <sup>2</sup>	0,53	0,1342	0,18	2,91
OPS-10 <sup>2</sup>	-0,86	0,0302	0,22	-3,93
OPS-19	0,34	0,0215	0,15	2,23
OPO-10 <sup>1</sup>	0,44	0,0189	0,21	2,08
OPH-03 <sup>1</sup>	0,41	0,041	0,15	2,68
OPS-16	0,42	0,0285	0,16	2,69

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de t.

#### 4.2.1.5 - Análise de regressão para produtividade de grãos

A análise de regressão para produtividade de grãos (Tabela 16) no primeiro experimento (Lavras - F<sub>7</sub> - inverno - 1996) identificou cinco marcadores ligados a QTLs que participam do controle genético desse caráter, sendo três no sentido de reduzir e dois no sentido de aumentar sua expressão. O marcador OPG-16<sup>1</sup> foi o que explicou a maior parte da variação genética (10,05%) desse caráter nesse experimento, sendo que todos os marcadores em conjunto conseguiram explicar 22,06% da variação. Portanto, nesse experimento os marcadores RAPD conseguiram explicar mais de um quinto de toda a variação genética observada nesse caráter, mostrando que, mesmo para características mais complexas, podem ser ferramentas importantes no processo de seleção.

No segundo experimento, encontraram-se, novamente, cinco marcadores ligados a QTLs, quatro no sentido de reduzir e um aumentar a expressão do caráter, sendo que o marcador OPN-07<sup>1</sup> explicou a maior parte da variação genética (5,61%) e nenhum tinha sido identificado no experimento anterior. No terceiro experimento identificaram-se seis marcadores ligados, sendo quatro no sentido de reduzir e dois no sentido de aumentar a produtividade de grãos. O marcador OPN-07<sup>3</sup> foi o que explicou a maior parte da variação genética (4,75%) desse caráter nesse experimento. No quarto experimento, encontraram-se três marcadores ligados, um para reduzir e dois aumentar o fenótipo, sendo que o marcador OPO-20<sup>3</sup> foi o que explicou maior parte da variação genética total (9,92%).

No quinto experimento, identificaram-se quatro marcadores (1 no sentido de reduzir e 3 de aumentar), sendo o marcador OPN-07<sup>2</sup> o mais importante, explicando 6,11% da variação genética. No sexto experimento, identificaram-se três marcadores, sendo um que atuava no sentido de reduzir e dois de aumentar o caráter, mas que explicavam pequena parte da variação genética (abaixo de 4%).



No sétimo também encontram-se três marcadores ligados a QTLs de produtividade de grãos, e novamente explicando menos de 4% da variação dessa característica.

A análise de regressão conjunta, considerando apenas os experimentos realizados em Lavras, identificou três marcadores ligados a QTLs que controlam a produtividade de grãos, com dois no sentido de reduzir e um de aumentar a expressão do caráter, sendo que o marcador OPN-07<sup>3</sup> foi que explicou a maior parte da variação genética (5,23%) especificamente nesse local. Esse marcador já tinha sido identificado em outros dois experimentos, sendo que, no primeiro experimento, realizado em Lavras, ele explicou 3,55% da variação genética da produtividade de grãos. Portanto, esse marcador pode ser útil para auxiliar nos processos seletivos realizados em Lavras, selecionando para sua ausência, visto que sua presença está ligada com a redução da produtividade de grãos.

A análise de regressão conjunta, considerando apenas os experimentos realizados em Patos de Minas identificou seis marcadores ligados a QTLs que controlam a produtividade de grãos, com quatro no sentido de reduzir e dois de aumentar o fenótipo, sendo que o marcador OPH-03<sup>2</sup> foi que explicou a maior parte da variação genética desse caráter (6,04%) especificamente nesse local. Esse marcador já tinha sido identificado em outro experimento (3) realizado em Patos de Minas, onde ele explicou 2,43 % da variação genética da produtividade de grãos.

As análises conjuntas para Lavras e Patos de Minas não identificaram nenhum marcador em comum, mostrando a dificuldade de conseguir ganhos para os dois locais simultaneamente, reforçando os resultados de interação significativa entre famílias e locais, e também a baixa correlação entre médias das famílias nos dois locais para produtividade de grãos, encontrados nas análises anteriores (Tabela 9). No entanto, 22,27% da variação genética foi explicada

pelos marcadores identificados especificamente em Patos de Minas, enquanto, em Lavras, esse valor foi de apenas 11,62%.

A análise de regressão conjunta, considerando apenas os experimentos realizados na época de inverno, identificou seis marcadores ligados a QTLs que controlam a produtividade de grãos, com um no sentido de reduzir e cinco no sentido de aumentar o fenótipo, sendo que o marcador OPO-20<sup>3</sup> foi que explicou a maior parte da variação genética desse caráter (9,90%) especificamente nessa época. Esse marcador já tinha sido identificado em outro experimento (4), realizado no inverno, no qual explicou 9,92 % da variação genética da produtividade de grãos, portanto mostrando uma certa estabilidade não só na presença quanto na magnitude de seu efeito.

A análise de regressão conjunta, considerando apenas os experimentos realizados na época da seca, identificou quatro marcadores ligados a QTLs que controlam a produtividade de grãos, com três no sentido de reduzir e um de aumentar a expressão do caráter, sendo que o marcador OPJ-04 explicou a maior parte (4,98%) da variação genética entre famílias observada nessa época. Esse marcador também foi identificado nos experimentos 3 e 6, que foram realizados na época da seca, mas em todos os casos foi responsável por menos de 4,0% da variação genética total dessa característica. As análises conjuntas para as épocas de inverno e seca também não identificaram nenhum marcador em comum, mostrando a dificuldade de conseguir ganhos para as duas épocas simultaneamente. Isso é reforçado pelos resultados de interação significativa entre famílias e épocas de cultivo (Tabela 9), e também pela baixa correlação entre as médias das famílias nas duas épocas, encontrados para produtividade de grãos nas análises anteriores.

A análise de regressão conjunta, considerando todos os experimentos, identificou dois marcadores ligados a QTLs que controlam a produtividade de

grãos, todos no sentido de aumentar a expressão do caráter, sendo que o marcador OPN-07<sup>2</sup> explicou 4,84% da variação genética entre famílias para produtividade de grãos. Os dois marcadores em conjunto explicaram apenas 7,80% dessa variação. O marcador OPN-07<sup>2</sup> só tinha sido identificado no inverno em Patos de Minas e na análise conjunta de inverno, já o OPO-20<sup>3</sup> foi identificado apenas na geração F<sub>9</sub>, em Lavras, também no inverno.

Esses resultados mostram que realmente é muito difícil conseguir identificar um marcador estável para produtividade de grãos, visto que, por ser uma característica complexa, sofre grandes influências ambientais. A interação observada de famílias com locais e com épocas de cultivo (Tabela 9) e as baixas correlações entre esses ambientes, mais uma vez, ilustram a grande dificuldade de se encontrar QTLs estáveis para essa característica, pois com a mudança de ambientes, também deverá existir a mudança do grau de importância (efeito do alelo) dos inúmeros genes que atuam na definição da produtividade de grãos.

TABELA 16 - Resumos das análises de regressões múltiplas para produtividade de grãos utilizando o processo de Stepwise para seleção dos marcadores.

Marcadores	Estimativas dos Parâmetros	R <sup>2</sup> parcial	Erro padrão	Teste de t*
<b>1- LAVRAS - F<sub>7</sub>- INVERNO - 1996</b>				
Intercepto	2646,94		85,52	30,95
OPN-07 <sup>3</sup>	-211,59	0,0355	73,77	-2,87
OPD-08	174,74	0,0237	73,23	2,39
OPR-021	239,98	0,0356	73,00	3,29
OPR-02 <sup>2</sup>	-165,66	0,0253	76,55	-2,16
OPG-16 <sup>1</sup>	-210,44	0,1005	78,92	-2,67
<b>2 - LAVRAS, F<sub>8</sub>, SECA, 1997</b>				
Intercepto	2937,48		93,95	31,27
OPN-07 <sup>1</sup>	-264,26	0,0561	66,94	-3,95
OPG-19	-137,09	0,0236	67,33	-2,04
OPH-03 <sup>2</sup>	-218,80	0,0299	61,59	-3,55
OPH-03 <sup>4</sup>	-161,02	0,0316	64,05	-2,51
OPG-16 <sup>2</sup>	160,12	0,0383	59,07	2,71
<b>3 - PATOS DE MINAS, F<sub>8</sub>, SECA, 1997</b>				
Intercepto	1361,45		50,02	27,22
OPJ-04	-114,73	0,0263	44,65	-2,57
OPN-07 <sup>3</sup>	141,76	0,0475	48,07	2,95
OPAA-0 <sup>9</sup>	-132,49	0,0327	50,97	-2,60
OPN-02 <sup>2</sup>	-112,29	0,0321	46,25	-2,43
OPH-03 <sup>2</sup>	-87,53	0,0243	43,93	-1,99
OPS-13 <sup>1</sup>	188,18	0,0239	51,57	3,65
<b>4 - LAVRAS, F<sub>9</sub>, INVERNO, 1997</b>				
Intercepto	2523,22		82,52	30,58
OPG-19	213,59	0,0410	80,69	2,65
OPS-10 <sup>1</sup>	-173,68	0,0266	80,44	-2,16
OPO-20 <sup>3</sup>	345,33	0,0992	80,81	4,27
<b>5 - PATOS DE MINAS, F<sub>9</sub>, INVERNO, 1997</b>				
Intercepto	2389,16		69,18	34,54
OPE-20 <sup>2</sup>	134,81	0,0373	57,16	2,36
OPN-07 <sup>2</sup>	173,92	0,0611	59,59	2,92
OPD-08	120,76	0,0248	58,66	2,06
OPAA-09	-144,79	0,0281	59,22	-2,45

...continua...

TABELA 16, Cont.

6- LAVRAS, F <sub>10</sub> , SECA, 1998				
Intercepto	2451,21		63,16	38,81
OPF-10	123,51	0,0249	61,80	2,00
OPJ-04	-157,19	0,0374	59,97	-2,62
OPO-20 <sup>4</sup>	122,07	0,0281	59,94	2,04
7 - PATOS DE MINAS, F <sub>10</sub> , SECA, 1998				
Intercepto	1224,03		41,86	29,24
OPM-06 <sup>1</sup>	-95,20	0,0316	42,30	-2,25
OPO-10 <sup>3</sup>	123,57	0,0289	42,19	2,93
OPO-20 <sup>2</sup>	-107,98	0,0274	41,32	-2,61
MÉDIA - LAVRAS				
Intercepto	2655,38		44,93	59,10
OPN-07 <sup>3</sup>	-92,37	0,0523	38,37	-2,41
OPB-18	91,52	0,0332	39,32	2,33
OPG-16 <sup>1</sup>	-88,59	0,0307	39,32	-2,25
MÉDIA - PATOS DE MINAS				
Intercepto	1776,80		35,50	50,05
OPM-06 <sup>1</sup>	-68,56	0,0269	30,83	-2,22
OPAA-0 <sup>9</sup>	-123,19	0,0534	35,15	-3,51
OPH-03 <sup>2</sup>	-76,40	0,0604	30,35	-2,52
POR-12 <sup>4</sup>	84,00	0,0282	44,94	1,87
OPS-13 <sup>1</sup>	109,73	0,0256	47,45	2,31
OPO-20 <sup>2</sup>	-115,12	0,0282	35,72	-3,22
MÉDIA - INVERNO				
Intercepto	2369,04		58,11	40,77
OPN-07 <sup>2</sup>	108,36	0,0384	44,89	2,41
OPN-07 <sup>5</sup>	144,17	0,0455	45,29	3,18
OPD-08	102,75	0,0221	44,53	2,31
POR-02 <sup>2</sup>	-126,20	0,0244	48,75	-2,59
OPG-19	88,56	0,0221	43,09	2,06
OPO-20 <sup>3</sup>	91,68	0,0990	50,24	1,83
MÉDIA - SECA				
Intercepto	2046,79		43,25	47,33
OPJ-04	-119,14	0,0498	32,56	-3,66
OPI-06	89,19	0,0349	32,01	2,79
OPH-03 <sup>2</sup>	-101,15	0,0306	33,46	-3,02
OPH-03 <sup>4</sup>	-97,34	0,0422	36,10	-2,70

...continua...

TABELA 16, Cont.

	MÉDIA - GERAL			
Intercepto	2135,69		24,42	87,45
OPN-07 <sup>2</sup>	69,09	0,0484	27,13	2,55
OPO-20 <sup>3</sup>	57,22	0,0296	26,36	2,17

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de t.

#### 4.2.2 Mapa de Ligação dos Marcadores RAPD

O mapa de ligação dos marcadores RAPD utilizados nesse trabalho (Tabela 11) e construído pelo programa Mapmaker estão apresentados na Tabela 17. Foram encontrados sete grupos de ligação no genoma do feijoeiro com os marcadores utilizados nesse mapeamento. Como o feijoeiro é uma espécie que tem número básico de cromossomo igual a 11, esperava-se no mínimo 11 grupos de ligação. No entanto, como o número de marcadores utilizados nesse estudo foi relativamente pequeno, a baixa saturação de marcadores nesse mapa é a explicação mais provável para esse pequeno número de grupos de ligação. Provavelmente, a maior saturação desse mapa, nos trabalhos posteriores, propiciará a identificação de novos grupos de ligação.

O número de marcadores por grupo de ligação foi bastante variável, sendo que, em média, obteve-se 5,57, com um mínimo de dois e um máximo de onze marcadores por grupo de ligação. Em relação ao tamanho (cM) dos grupos de ligação obteve-se, em média, grupos com 112,24 cM, sendo o menor com 16 cM e o maior com 252 cM. Desta forma, em média, os marcadores foram mapeados com um intervalo de 20,15 cM dentro de cada grupo de ligação, sendo o menor intervalo de 4,2 cM (grupo de ligação 2, entre os marcadores OPO-20<sup>3</sup> e OPO-20<sup>2</sup>) e o maior intervalo de 63,1 cM (grupo de ligação 4, entre os marcadores OPN-02<sup>2</sup> e OPO-10<sup>3</sup>). Sutber et al. (1992) relataram que a máxima vantagem da análise por intervalo sobre a análise por ponto ocorre quando

marcadores ligados estão razoavelmente separados (mais de 15 e menos de 35 cM de distância). Nestas condições, provavelmente existirão algumas permutas entre os marcadores e o QTL, que podem ser compensadas pela análise por intervalo. Quando os locos marcadores são muito distantes (> 35 cM), constantemente a análise por intervalo também se mostra ineficiente para detectar QTL no intervalo entre dois locos marcadores.

No total, conseguiu-se mapear uma região que corresponde a aproximadamente 785,7 cM. Como o tamanho do genoma do feijoeiro é estimado em torno de 1200 cM (Vallejos, Sakiyama e Chase, 1992), estima-se que esse trabalho conseguiu mapear em torno de 66 % do genoma do feijoeiro. Como a saturação de marcadores no mapa foi baixa, pode-se considerar essa cobertura como bastante satisfatória, visto que em outros trabalhos (Nodari et al., 1993 e Vallejos, 1994) que utilizaram mapas muito mais saturados conseguiram no máximo 82 % de cobertura do genoma.

TABELA 17- Mapa de ligação molecular do feijoeiro utilizando marcadores RAPD e linhagens recombinantes oriundas de um cruzamento biparental, Lavras-MG, 2000.

Grupos de Ligação	Marcadores RAPD	Distância (cM)
1	OPF-10	0,0
	OPM-06 <sup>1</sup>	58,1
	OPH-03 <sup>3</sup>	89,8
	OPI-03	104,1
	OPE-20 <sup>2</sup>	133,2
2	OPI-06	0,0
	OPR-12 <sup>4</sup>	24,9
	OPO-10 <sup>1</sup>	38,2
	OPO-20 <sup>5</sup>	76,1
	OPO-20 <sup>3</sup>	88,3
	OPO-20 <sup>2</sup>	92,5
	OPO-20 <sup>4</sup>	102,9

...continua...

TABELA 17, Cont.

Grupos de Ligação	Marcadores RAPD	Distância (cM)
3	OPN-10	0,0
	OPM-06 <sup>3</sup>	16,0
4	OPG-16 <sup>2</sup>	0,0
	OPO-04	49,5
	OPE-15 <sup>1</sup>	70,3
	OPO-13 <sup>1</sup>	75,0
	OPG-16 <sup>3</sup>	81,4
	OPS-13 <sup>2</sup>	88,6
	OPN-02 <sup>2</sup>	116,0
	OPO-10 <sup>3</sup>	179,1
	OPG-19 <sup>1</sup>	213,1
	OPN-07 <sup>1</sup>	236,0
5	OP0-12	252,0
	OPN-07 <sup>5</sup>	0,0
	OPN-07 <sup>3</sup>	11,8
	OPG-16 <sup>1</sup>	56,1
	OPS-13 <sup>1</sup>	81,0
	OPS-10 <sup>2</sup>	92,5
	OPR-02 <sup>2</sup>	115,5
	OPR-12 <sup>3</sup>	131,8
OPO-19 <sup>2</sup>	159,3	
6	OPAA-0 <sup>9</sup>	204,3
	OPR-02 <sup>1</sup>	0,0
	OPB-18	29,7
7	OPS-16	48,3
	OPH-03 <sup>4</sup>	0,0
	OPR-12 <sup>1</sup>	29,0

#### 4.2.3 Mapeamento de QTLs utilizando a Metodologia do Intervalo Composto (CIM)

O mapeamento dos QTLs das características avaliadas em todos os experimentos desse trabalho foram realizados com a utilização do programa QTL Cartographer para Windows, de acordo com as especificações definidas



anteriormente. Primeiramente, foi realizado um mapeamento para cada característica, em cada experimento separadamente; em seguida foi realizado um outro mapeamento com as médias por locais e/ou épocas de cultivo, conforme a situação de avaliação de cada característica, e finalmente realizado um mapeamento com as médias gerais de cada caráter em todos os experimentos em que foram avaliados. Vale ressaltar que, no mapeamento utilizando a metodologia do intervalo composto, só foram utilizados os marcadores que foram mapeados nos grupos de ligação definidos pelo programa MAPMAKER, pois esse processo de mapeamento só considera os marcadores alocados em algum grupo de ligação. Os marcadores que não se ligaram a nenhum grupo são desconsiderados da análise. Dessa forma, como dos 63 marcadores obtidos nesse estudo (Tabela 11), somente 39 (Tabela 17) participaram do mapa molecular dos marcadores RAPD, somente esses 39 foram utilizados nesse processo de mapeamento. Como nas análises de regressão anteriores foram utilizados todos os 63 marcadores, visto que, para utilização dessa metodologia, não existe a necessidade de construção prévia de um mapa molecular dos marcadores, espera-se que a metodologia de mapeamento por intervalo composto identifique menos marcadores ligados a QTLs do que o processo de regressão.

Vale explicar que para todas as Figuras (6 a 26) desse mapeamento, as linhas verticais identificam os sete diferentes grupos de ligação dos marcadores, sendo a distância em cM do início e final dos grupos maiores (1, 2, 4 e 5) apresentada no eixo "x" e os lod scores para cada região de mapeamento no eixo "y". A distância do QTL para o início do grupo é fornecida pelo programa de análise e as distâncias para os marcadores adjacentes são obtidas por diferença, utilizando as informações de distâncias entre os marcadores contidas no mapa molecular (Figura 16). Além disso, abaixo do gráfico principal (maior) existe um outro gráfico (menor) que mostra a variação dos efeitos aditivos de cada QTL ao

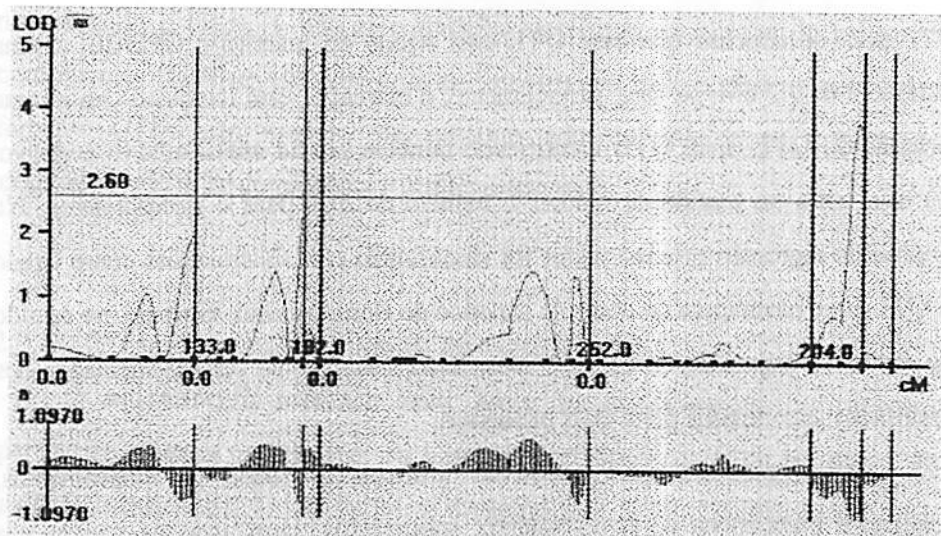


FIGURA 6 - Mapeamento e efeito aditivo de QTLs para época de florescimento em feijoeiro na época de inverno, Lavras, MG, 1996.

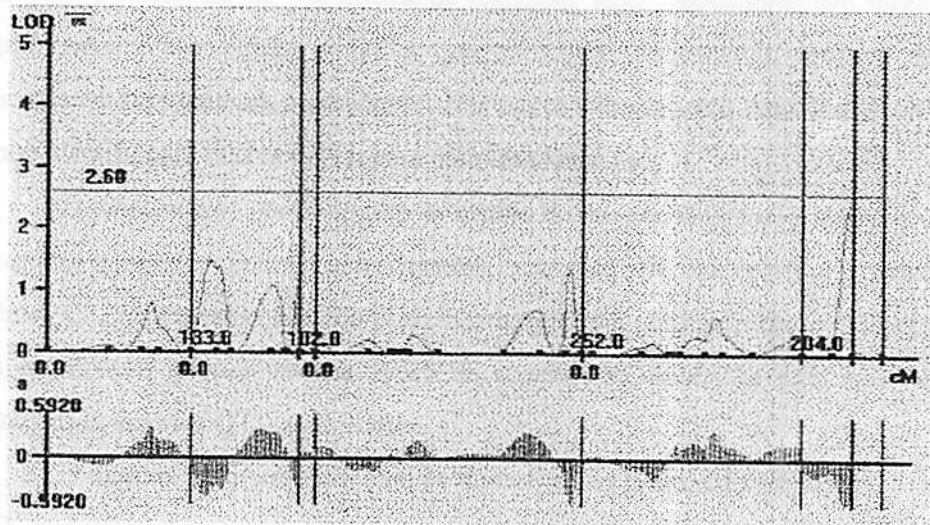


FIGURA 7 - Mapeamento e efeito aditivo de QTLs para época de florescimento em feijoeiro na média dos experimentos realizados no inverno, Lavras, MG, 1996/1997.

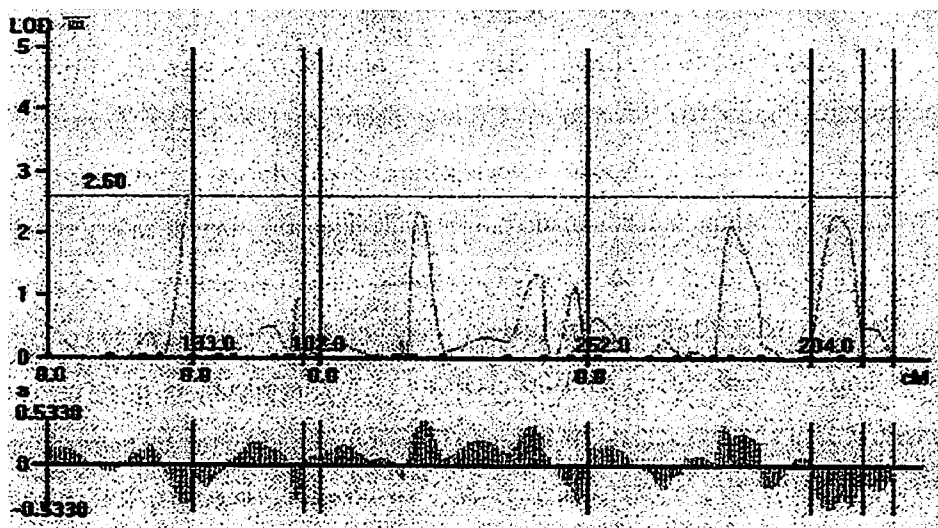


FIGURA 8 - Mapeamento e efeito aditivo de QTLs para época de florescimento em feijoeiro, na média de todos os experimentos, Lavras, MG, 1996 a 1998.

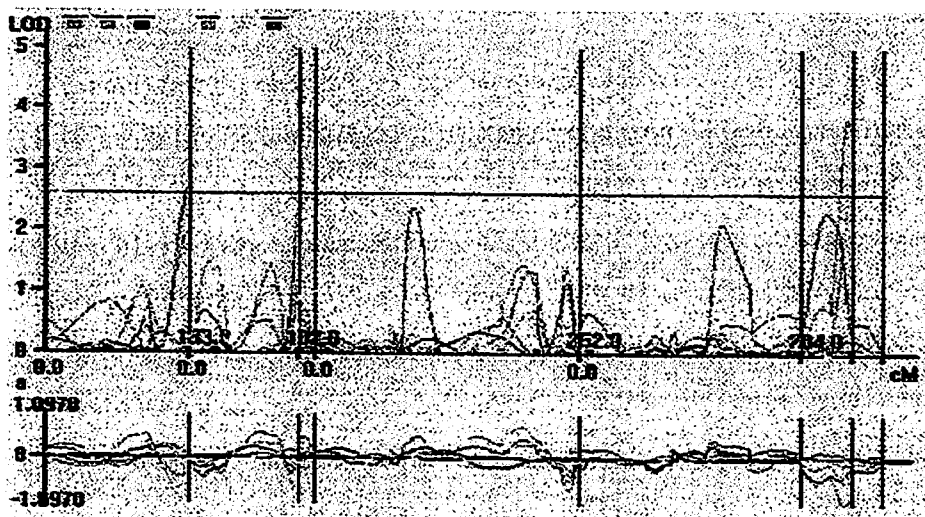


FIGURA 9 - Mapeamento e efeito aditivo de QTLs para época de florescimento em feijoeiro em vários experimentos, em diferentes épocas e anos.

#### 4.2.3.2 - Mapeamento para peso de 100 sementes

O mapeamento realizado para peso de 100 sementes no primeiro experimento (Figura 10) (Inverno em Lavras) identificou dois QTLs. O primeiro está situado no grupo de ligação 2, localizado a 1 cM do início do grupo (lod 4,1). O segundo também está situado no grupo de ligação 2, mas localizado a 68 cM do início do grupo (lod 5,6). Comparando com o mapa de ligação dos marcadores RAPD (Tabela 17), pode-se concluir que o primeiro QTL está situado entre os marcadores OPI-06 e OPR-12<sup>4</sup>, a uma distância de 1 cM do primeiro e 23,9 cM do segundo. O segundo QTL está situado entre os marcadores OPO-10<sup>1</sup> e OPO-20<sup>5</sup>, a uma distância de 29,8 cM do primeiro e 8,1 cM do segundo. O primeiro QTL identificado possui efeito aditivo negativo e o segundo positivo. Na análise de regressão, nenhum desses marcadores foi identificado como ligado a QTLs que participam do controle genético do peso de 100 sementes. No segundo experimento, não foram identificados QTLs para essa característica.

No terceiro experimento (época da seca em Patos de Minas) (Figura 11), foi identificado um QTL no grupo de ligação 1, localizado a 56 cM do início (lod 3,70). Comparando com o mapa de ligação dos marcadores RAPD (Tabela 17), pode-se concluir que esse QTL está ligado entre os marcadores OPF-10 e OPM-06<sup>1</sup>, a uma distância de 56 cM do primeiro e 2,1 do segundo. Esse QTL identificado possui efeito aditivo negativo, ou seja, atua no sentido de reduzir o tamanho da semente. Na análise de regressão, apenas o marcador OPM-06<sup>1</sup> foi identificado como ligado a QTLs que participam do controle genético desse caráter, sendo em um dos experimentos, responsável por mais de 12% da variação genética para o peso de 100 sementes, mostrando, assim, ser um marcador em potencial para ser utilizado no processo de seleção. Este resultado para esse marcador pode ser explicado pela menor distância em que ele se

encontra com relação ao QTL identificado (2,1 cM). Nos outros experimentos individuais, não se identificou mais nenhum QTL que participasse do controle genético dessa característica. No entanto, vale ressaltar que em um experimento realizado na época de inverno, em Patos de Minas (Figura 12), identificou-se um QTL, com lod 2,5, na mesma posição do QTL (grupo de ligação 1, localizado a 56 cM do início) detectado no terceiro experimento.

Os mapeamentos realizados com as médias dos experimentos em cada local separadamente (Lavras e em Patos de Minas) não identificou nenhum QTL para peso de 100 sementes que fosse específico para um desses ambientes. No entanto, com as médias da época de inverno (Figura 13) conseguiu-se identificar um QTL no grupo de ligação 2, localizado a 78 cM do início (lod 3,70). Comparando com o mapa de ligação dos marcadores RAPD (Tabela 17) pode-se concluir que esse QTL está ligado entre os marcadores OPO-20<sup>5</sup> e OPO-20<sup>3</sup> a uma distância de 1,9 cM do primeiro e 10,3 do segundo. Esse QTL identificado possui efeito aditivo positivo, ou seja, atua no sentido de aumentar tamanho da semente. Na análise de regressão, nenhum desses marcadores foi identificado como ligado a QTLs que participam do controle genético desse caráter.

Com o mapeamento utilizando as médias da época da seca (Figura 14), também se conseguiu identificar um QTL no grupo de ligação 1, localizado a 54 cM do início (lod 3,90). Comparando com o mapa de ligação dos marcadores RAPD (Tabela 17), pode-se concluir que esse QTL está ligado entre os marcadores OPF-10 e OPM-06<sup>1</sup> a uma distância de 54 cM do primeiro e 4,1 cM do segundo, praticamente como já havia sido detectado no terceiro experimento, mostrando que esse QTL realmente possui uma certa estabilidade.

No mapeamento utilizando as médias de todos os experimentos, não se identificou nenhum QTL com lod maior que 2,6, no entanto, mais uma vez o QTL do grupo de ligação 1 (Figura 15) comentado anteriormente mostrou um efeito

pronunciado (lod 2,4), indicando que existem grandes possibilidades de encontrar um QTL mais estável nessa região. Essa hipótese se reforça ainda mais quando se analisam os gráficos com todos os mapeamentos simultaneamente (Figura 16) e se observa o grande número de “picos” de lod score na região do grupo de ligação 1, próxima à região na qual se identificou um QTL muito estável nesse estudo.

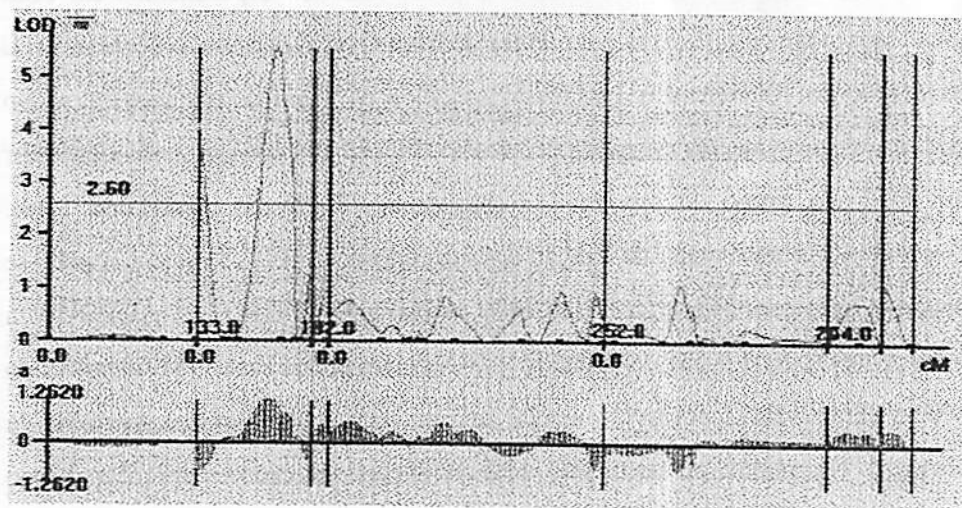


FIGURA 10 - Mapeamento e efeito aditivo de QTLs para peso de 100 sementes em feijoeiro na época de inverno, Lavras, MG, 1996.

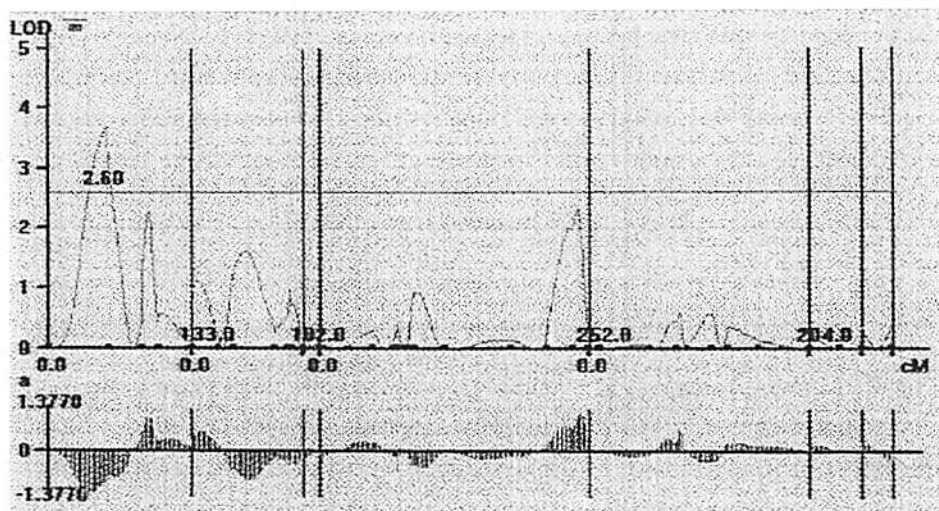


FIGURA 11 - Mapeamento e efeito aditivo de QTLs para peso de 100 sementes em feijoeiro na época da seca, Patos de Minas, MG, 1997.

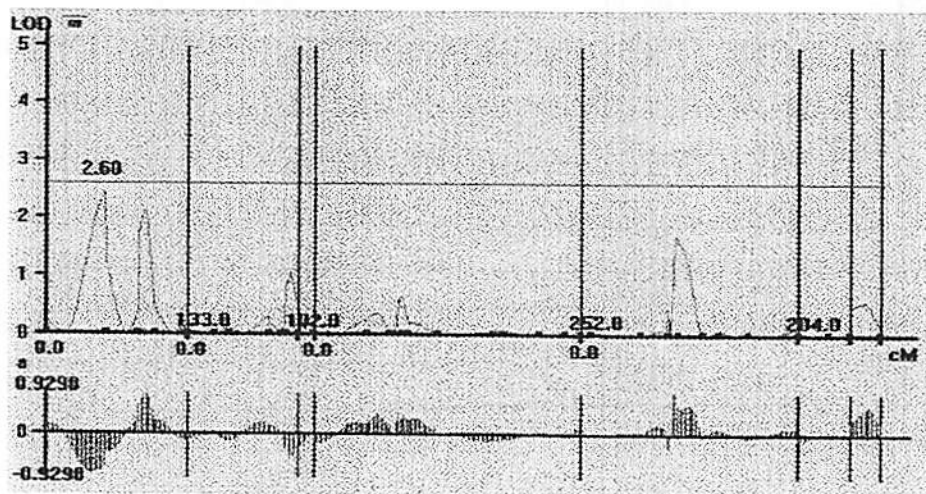


FIGURA 12 - Mapeamento e efeito aditivo de QTLs para peso de 100 sementes em feijoeiro na época de inverno, Patos de Minas, MG, 1997.

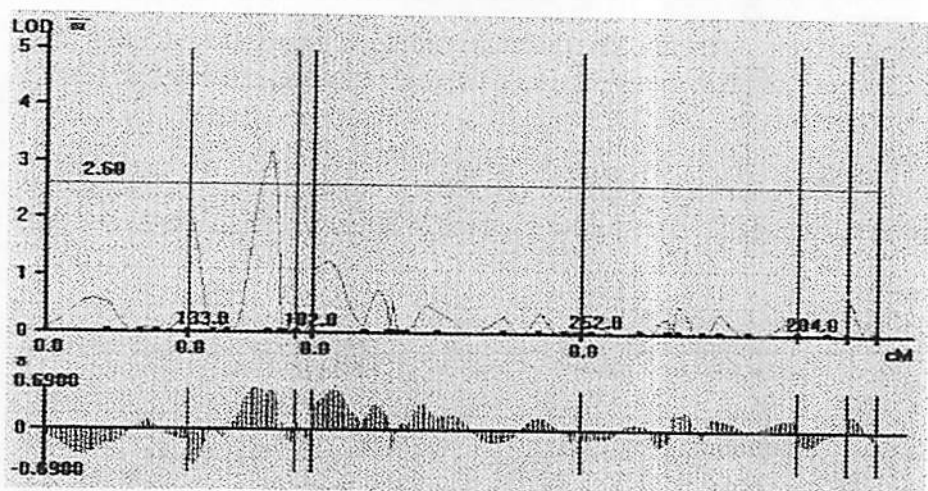


FIGURA 13 - Mapeamento e efeito aditivo de QTLs para peso de 100 sementes em feijoeiro na média dos experimentos realizados no inverno, Lavras e Patos de Minas, MG, 1996/1997.

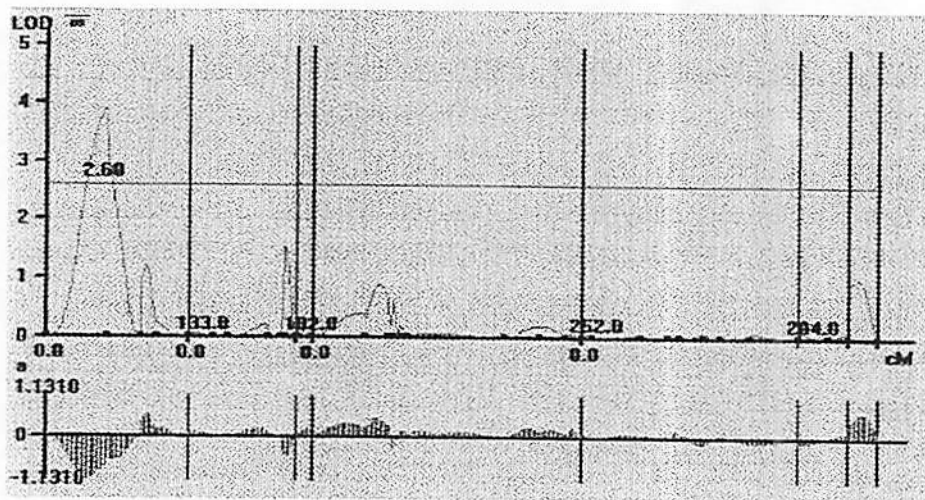


FIGURA 14 - Mapeamento e efeito aditivo de QTLs para peso de 100 sementes em feijoeiro na média dos experimentos realizados no época da seca, Lavras e Patos de Minas, MG, 1997/1998.



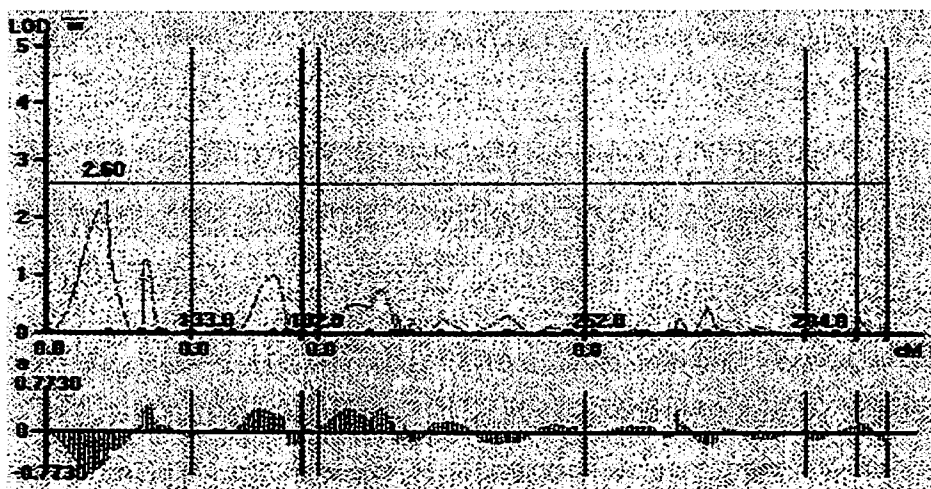


FIGURA 15 - Mapeamento e efeito aditivo de QTLs para peso de 100 sementes em feijoeiro na média de todos os experimentos. Lavras e Patos de Minas, 1996 a 1998.

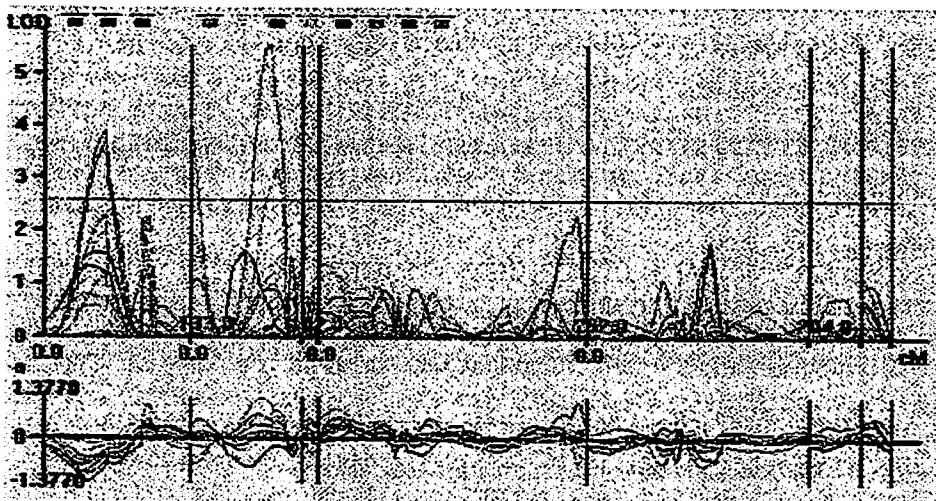


FIGURA 16 - Mapeamento e efeito aditivo de QTLs para peso de 100 sementes em feijoeiro em vários experimentos, em diferentes épocas e locais e anos.

#### 4.2.3.3 - Mapeamento para reação a mancha angular

O mapeamento para mancha angular somente identificou um QTL, e em somente um experimento (época da seca em Lavras) (Figura 17). Esse QTL está localizado no grupo de ligação 5, a 11 cM do início do grupo (lod 2,70). Comparando com o mapa de ligação dos marcadores RAPD (Tabela 17), pode-se concluir que esse QTL está localizado entre os marcadores OPN-07<sup>5</sup> e OPN-07<sup>3</sup>, a uma distância de 11 cM do primeiro e 0,8 cM do segundo marcador. Esse QTL identificado possui efeito aditivo negativo, ou seja, atua no sentido de reduzir a severidade da mancha angular. Na análise de regressão apenas o marcador OPN-07<sup>5</sup> foi identificado como ligado a um QTL que participava do controle genético da reação à mancha angular.

Nesse ponto, é importante chamar atenção para o fato de que, na análise de regressão, dois marcadores que estão próximos ao QTL podem, um deles, ser considerado não significativo, enquanto que, se estivesse sendo avaliado individualmente, seria considerado significativo. Isso se deve ao fato de que no processo de regressão parcial ocorre a eliminação da ambiguidade de informação. Dessa forma, os processos de seleção de variáveis regressoras não permitem que dois marcadores com a mesma informação pertençam, simultaneamente, ao modelo final, sendo aquele mais redundante e menos informativo (mais distante) normalmente eliminado. No entanto, nesse caso nota-se que o marcador mais próximo do QTL detectado (OPN-07<sup>3</sup>) não foi o identificado na regressão. Uma provável resposta para essa questão seria o fato de existir um “suposto” QTL à direita desse marcador, e do QTL identificado, com efeito contrário (positivo) (Figura 17). Nesse caso, como esse marcador está entre os dois QTLs de efeitos opostos, poderia estar ocorrendo uma anulação do efeito desse marcador quando utilizada a regressão, pois a resultante final do efeito desse QTL para esse marcador seria muito reduzida. Stuber, Edwards e Wendel (1987) demonstraram

que o efeito de um marcador é função da frequência de recombinação e dos efeitos dos QTLs, e isso explica porque o marcador OPN-07<sup>3</sup> não foi identificado na regressão, pois como ele está localizado entre QTLs de efeitos opostos, sofreu maior influência da anulação do efeito desse QTL do que o outro marcador (OPN-07<sup>5</sup>), que estava localizado à esquerda do QTL detectado. Assim, esse marcador que estava mais distante conseguiu ser detectado pela regressão ao invés do marcador mais próximo (OPN-07<sup>3</sup>), pois a resultante dos efeitos opostos dos QTLs vizinhos foi maior para o primeiro marcador.

Outra explicação para esse resultado seria a baixa saturação do mapa molecular utilizado nesse mapeamento, que pode fornecer, em alguns casos, localização menos precisa dos marcadores em relação a mapas mais saturados. Dessa forma, precisa-se obter mais informações moleculares para se conseguir maior saturação dos mapas, para não só cobrir maior porção do genoma do feijoeiro, como também confirmar as informações já conseguidas nesse trabalho.

Na Figura 18, observam-se os gráficos sobrepostos de todos os mapeamentos realizados para reação a mancha angular, mostrando as regiões em que existiram as maiores possibilidades de identificação dos QTLs nas diferentes situações. Realmente, o mapeamento para essa característica mostrou a dificuldade de identificar QTLs em uma população que apresenta baixa variabilidade. Como foi comentado anteriormente, a população em estudo apresenta baixa variabilidade para reação à mancha angular, sendo a grande maioria de suas famílias considerada como suscetível. Desta forma, não se conseguiu identificar de forma mais consistente QTLs que participavam do controle genético dessa característica.

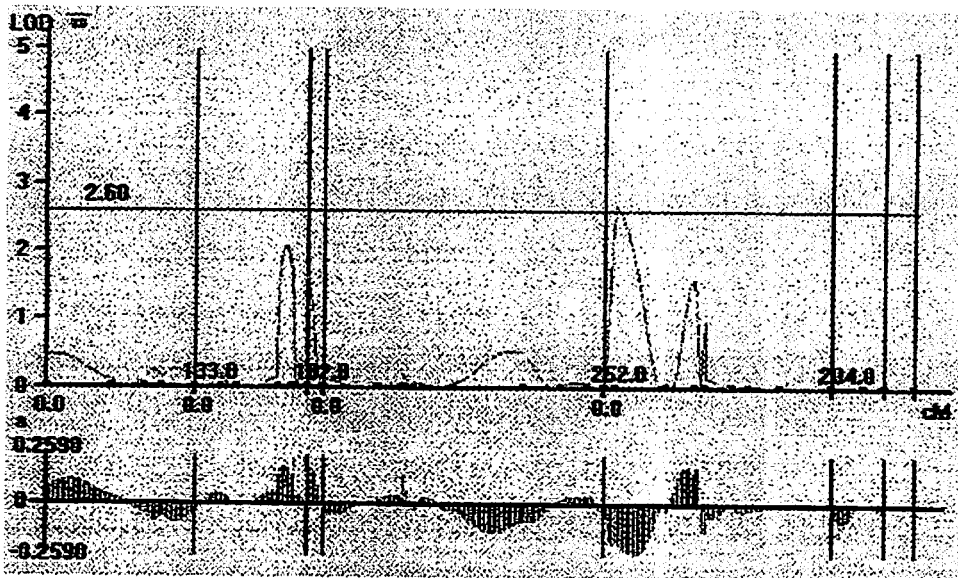


FIGURA 17 - Mapeamento e efeito aditivo de QTLs reação a mancha angular em feijoeiro na época da seca, Lavras, MG, 1998.

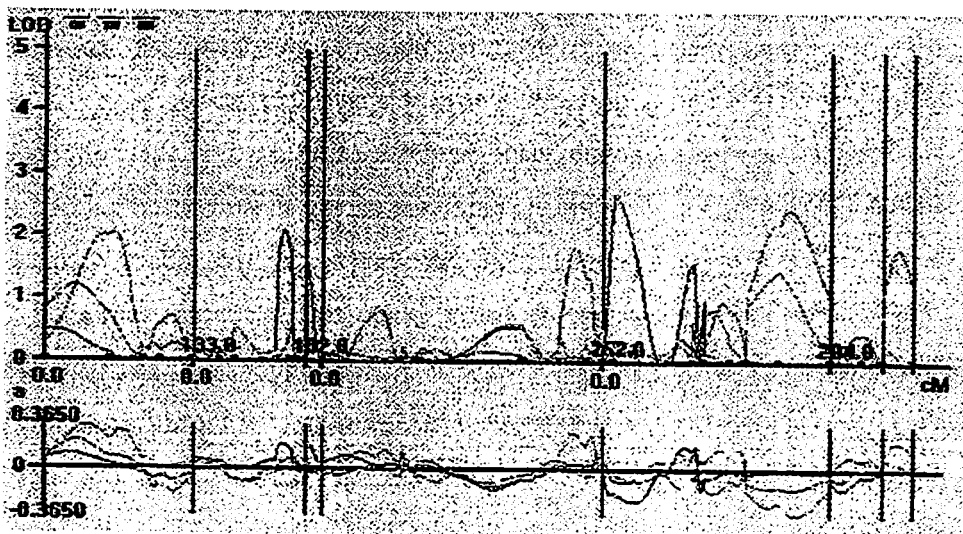


FIGURA 18 - Mapeamento e efeito aditivo de QTLs para reação a mancha angular em feijoeiro em vários experimentos, em diferentes locais e anos.

#### 4.2.3.4 - Mapeamento para reação ao oídio

O mapeamento realizado para reação ao oídio no primeiro experimento (Figura 19) (Inverno em Lavras) identificou quatro QTLs. O primeiro está situado no grupo de ligação 2, localizado a 99 cM do início do grupo (lod 5,90). O segundo situado no grupo de ligação 3, localizado a 3 cM do início do grupo (lod 5,7). O terceiro está situado no grupo de ligação 4, localizado a 234 cM do início do grupo (lod 2,90), e o quarto no grupo de ligação 6 a 46 cM do início do grupo (lod 5.6). Comparando com o mapa de ligação dos marcadores RAPD (Tabela 17) pode-se concluir que o primeiro QTL está situado entre os marcadores OPO-20<sup>2</sup> e OPO-20<sup>4</sup>, a uma distância de 6,5 cM do primeiro e 3,9 cM do segundo. O segundo QTL está situado entre os marcadores OPN-10 e OPM-06<sup>3</sup>, a uma distância de 3 cM do primeiro e 13 cM do segundo. O terceiro QTL está situado entre os marcadores OPG-19<sup>1</sup> e OPN-07<sup>1</sup>, a uma distância de 20,9 cM do primeiro e 2 cM do segundo. O quarto QTL está situado entre os marcadores OPB-18 e OPS-16, a uma distância de 16,3 cM do primeiro e 2,3 cM do segundo. O primeiro e terceiro QTLs identificados possuem efeitos aditivos negativos e o segundo e quarto positivos. Na análise de regressão somente os marcadores OPS-16 e OPN-10 foram identificados como ligados a QTLs que participam do controle genético da reação ao oídio em algum experimento.

No segundo experimento não foi identificado nenhum QTL para essa característica. No terceiro experimento (inverno em Patos de Minas) foi identificado um QTL (Figura 20) no grupo de ligação 4, localizado a 149 cM do início (lod 3,70). Comparando com o mapa de ligação dos marcadores RAPD (Tabela 17), pode-se concluir que esse QTL está ligado entre os marcadores OPN-02<sup>2</sup> e OPO-10<sup>3</sup> a uma distância de 33 cM do primeiro e 30,1 cM do segundo. Esse QTL identificado possui efeito aditivo negativo, ou seja, atua no sentido de reduzir a severidade do oídio, mas como está muito distante dos dois,

marcadores não teve efeito final muito pronunciado. Na análise de regressão, esses marcadores não foram identificados como ligados a QTLs que participam do controle genético da reação ao oídio.

O mapeamento realizado com as médias gerais (Figura 21) identificou, novamente, o segundo QTL do primeiro experimento (localizado a 3 cM do início do grupo 3) e quase identificou (lod 2,5) o terceiro QTL, também do experimento 1 (localizado a 234 cM do início do grupo 4). Na Figura 22 observam-se os gráficos de todos os mapeamentos, realizados para reação ao oídio, mostrando essas regiões de identificação dos QTLs sobrepostas, indicando existir, nesses pontos, maiores possibilidades de identificação dos QTLs.

Vale lembrar que no caso de QTLs que são responsáveis por reação à patógenos, tanto os de efeitos gerais quanto os específicos por ambientes são úteis em um programa de melhoramento, uma vez que a ocorrência de raças diferentes do patógeno nos diferentes ambientes são a principal causa da interação genótipos x ambientes, e por isso muitas vezes se justifica a realização de seleção especificamente em um determinado local. Assim, pode-se utilizar as informações dos QTLs ligados a alelos de resistência que se expressam especificamente em um local, visando o desenvolvimento de cultivares para recomendação específica para uma região.

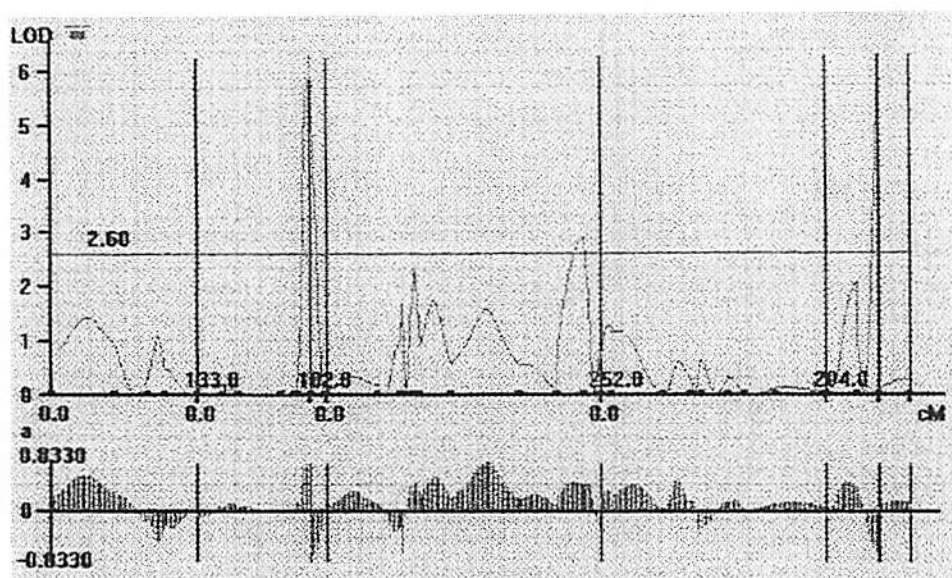


FIGURA 19 - Mapeamento e efeito aditivo de QTLs reação ao oídio em feijoeiro na época de inverno, Lavras, MG, 1996.

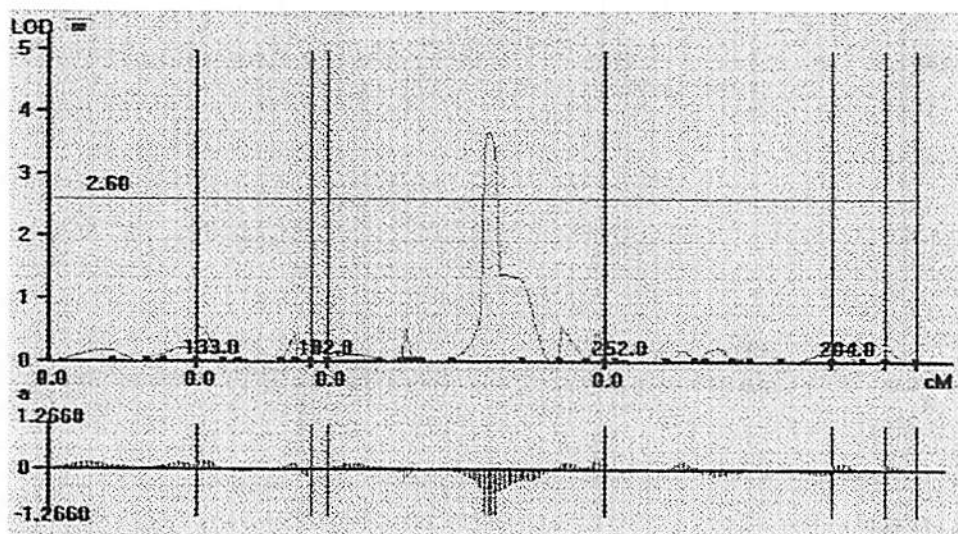


FIGURA 20 - Mapeamento e efeito aditivo de QTLs reação ao oídio em feijoeiro na época de inverno, Patos de Minas, MG, 1997.

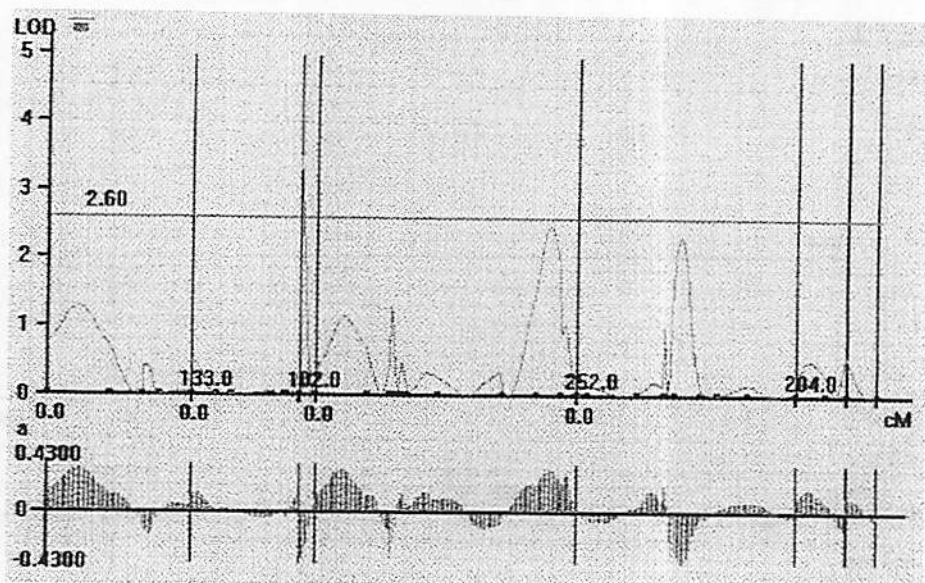


FIGURA 21 - Mapeamento e efeito aditivo de QTLs reação ao oídio em feijoeiro na média de todos os experimentos, Lavras e Patos de Minas, MG, 1996/1997.

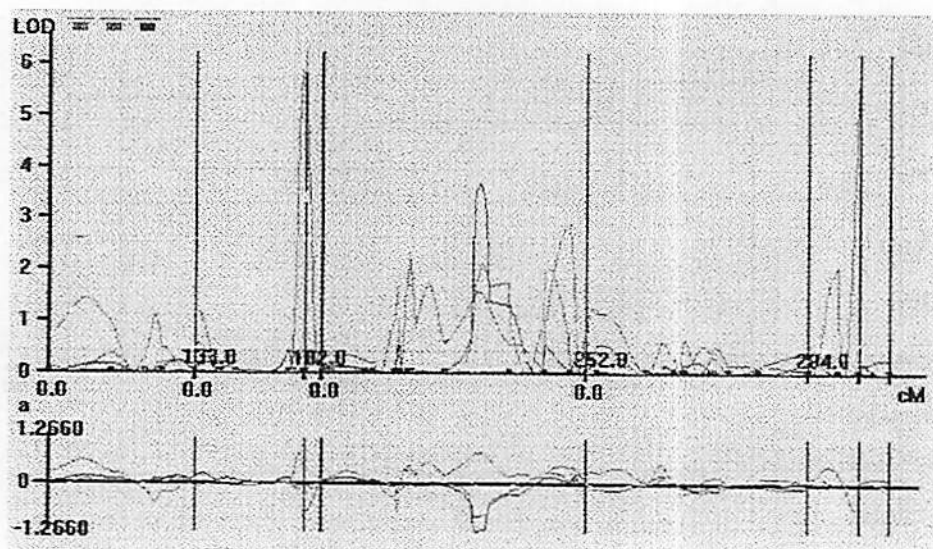


FIGURA 22 - Mapeamento e efeito aditivo de QTLs para reação ao oídio em feijoeiro em vários experimentos, em diferentes locais e anos.



#### 4.2.3.5 - Mapeamento para produtividade de grãos

O mapeamento realizado para produtividade de grãos no primeiro experimento (Figura 23) (inverno em Lavras) identificou dois QTLs. O primeiro está situado no grupo de ligação 2, localizado a 98 cM do início do grupo (lod 3,2). O segundo, situado no grupo de ligação 6, localizado a 48 cM do início do grupo (lod 2,6). Comparando com o mapa de ligação dos marcadores RAPD (Tabela 17) pode-se concluir que o primeiro QTL está situado entre os marcadores OPO-20<sup>2</sup> e OPO-20<sup>4</sup>, a uma distância de 5,5 cM do primeiro e 4,9 cM do segundo. O segundo QTL está situado entre os marcadores OPB-18 e OPS-16, a uma distância de 18,3 cM do primeiro e 0,3 cM do segundo. O primeiro QTL identificado possui efeito aditivo negativo e o segundo positivo. Na análise de regressão, apenas o marcador OPS-16 não foi identificado como ligado a QTLs que participam do controle genético da produtividade de grãos.

No segundo e terceiro experimentos não foi identificado nenhum QTL para essa característica. No quarto experimento (época de inverno em Lavras) foram identificados dois QTLs (Figura 24). O primeiro está situado no grupo de ligação 4, localizado a 61 cM do início do grupo (lod 2,5). O segundo, situado no grupo de ligação 5, localizado a 159 cM do início do grupo (lod 3,6). Comparando com o mapa de ligação dos marcadores RAPD (Tabela 17) pode-se concluir que o primeiro QTL está situado entre os marcadores OPO-04<sup>1</sup> e OPE-15<sup>1</sup>, a uma distância de 11,5 cM do primeiro e 9,3 cM do segundo. O segundo QTL está situado entre os marcadores OPR-12<sup>3</sup> e OPO-19<sup>2</sup>, a uma distância de 27,2 cM do primeiro e 0,3 cM do segundo. O primeiro QTL identificado possui efeito aditivo positivo e o segundo negativo. Na análise de regressão, nenhum desses marcadores foi identificado como ligado a QTLs que participam do controle genético da produtividade de grãos.

Nos outros experimentos individuais, e nas análises utilizando as médias dos locais, não foi identificado nenhum QTL para essa característica, evidenciando, mais uma vez, o forte efeito de interação com locais, o que dificulta muito a detecção de QTLs na média dos ambientes e também reduz muito a repetibilidade da informação gerada por algum QTL identificado em um local específico, principalmente para uma característica tão complexa como produtividade de grãos.

O mapeamento realizado com as médias dos experimentos da época de inverno identificou dois QTLs (Figura 25). O primeiro está situado no grupo de ligação 2, localizado a 88 cM do início do grupo (lod 2,9). O segundo, situado no grupo de ligação 5, localizado a 162 cM do início do grupo (lod 2,4). Comparando com o mapa de ligação dos marcadores RAPD (Tabela 17), pode-se concluir que o primeiro QTL está situado entre os marcadores OPO-20<sup>5</sup> e OPO-20<sup>3</sup>, a uma distância de 11,9 cM do primeiro e 0,3 cM do segundo. O segundo QTL está situado entre os marcadores OPO-19<sup>2</sup> e OPAA-09, a uma distância de 2,7 cM do primeiro e 42,3 cM do segundo. O primeiro QTL identificado possui efeito aditivo positivo e o segundo negativo. Esses QTLs identificados com a média dos experimentos realizados no inverno estão muito próximos dos localizados nos experimentos anteriores, indicando que os marcadores situados nessa região podem ser informativos em um futuro processo seletivo. Como se conseguiu identificar dois QTLs que se expressam especificamente na época de inverno, pode-se concluir que esta época de cultivo é mais estável do que a época da seca, na qual não se conseguiu identificar nenhum QTL específico. Na análise de regressão, dois desses marcadores (OPAA-09 e OPO-20<sup>3</sup>) foram identificados, em vários experimentos, como ligados a QTLs que participam do controle genético da produtividade de grãos, sendo que o marcador OPO-20<sup>3</sup> foi identificado como ligado a um QTL na análise de regressão considerando a média

de todos os experimentos, e em um experimento individual chegou a explicar 9,90% da variação genética. Dessa forma, esse marcador pode ser bastante útil no processo seletivo para produtividade de grãos que utilize a seleção assistida por marcadores como ferramenta para aumentar a eficiência do processo seletivo. Essa idéia se reforça ainda mais quando analisamos os gráficos com todos os mapeamentos simultaneamente (Figura 26) e observamos o grande número de “picos” de lod score na região desse marcador.

FIGURA 24 - Mapeamento e efeito aditivo de QTLs para produtividade de grãos em feijoeiro na época de inverno, Lavras, MG, 1997.

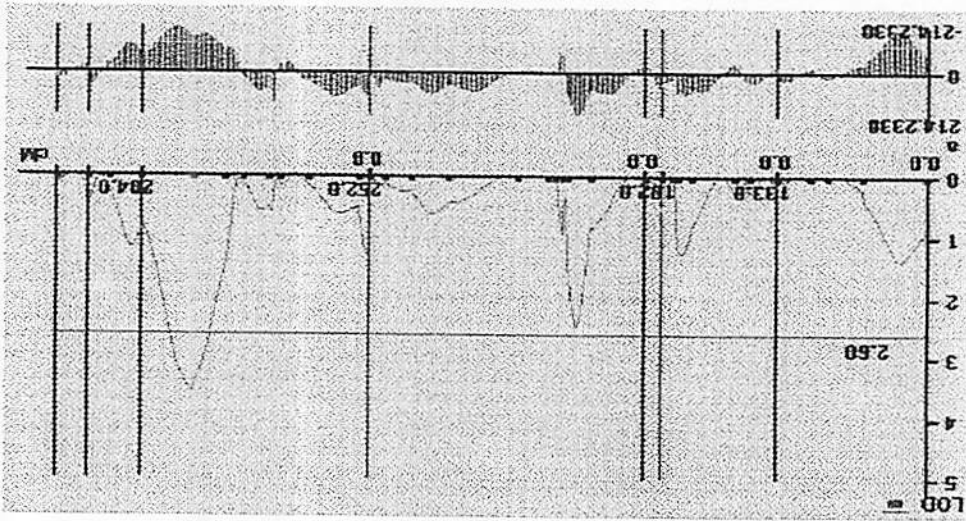
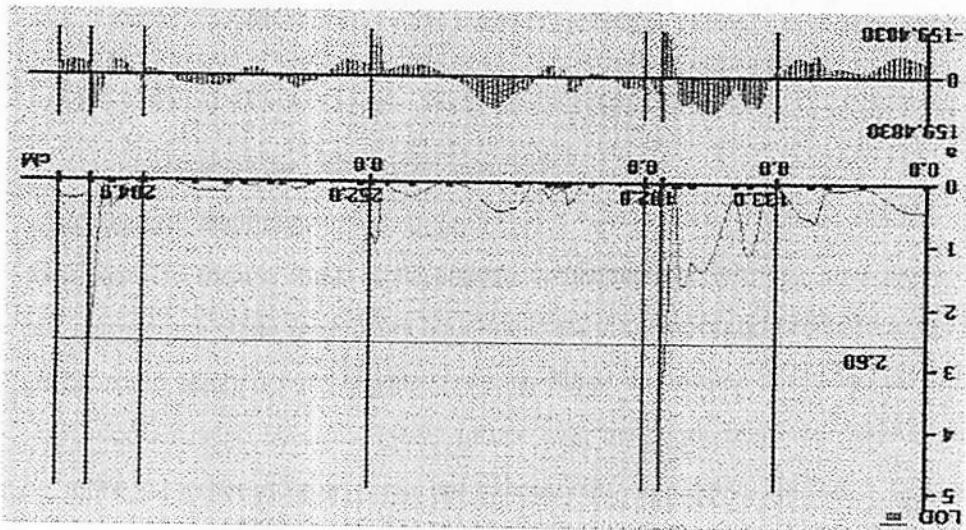


FIGURA 23 - Mapeamento e efeito aditivo de QTLs para produtividade de grãos em feijoeiro na época de inverno, Lavras, MG, 1996.



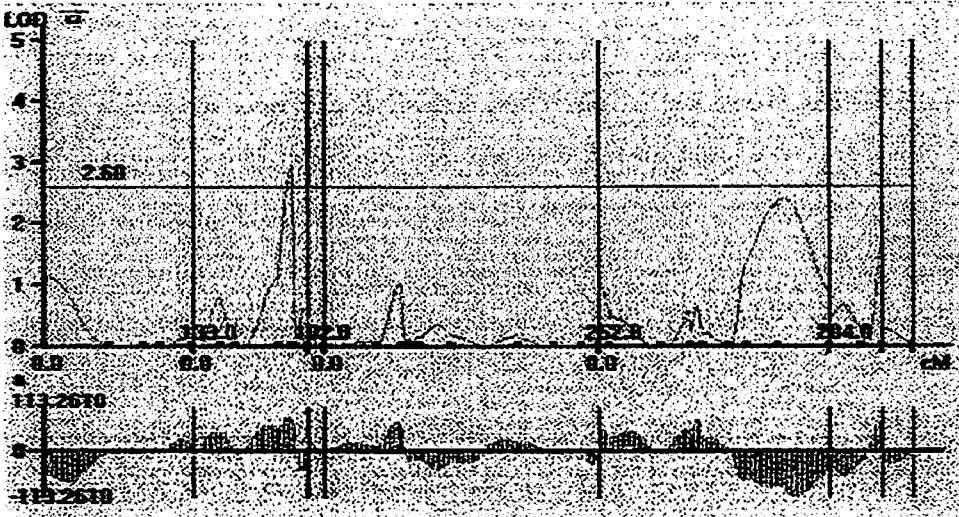


FIGURA 25 - Mapeamento e efeito aditivo de QTLs para produtividade de grãos em feijoeiro na média dos experimentos realizados no inverno, Lavras e Patos de Minas, MG, 1996/1997.

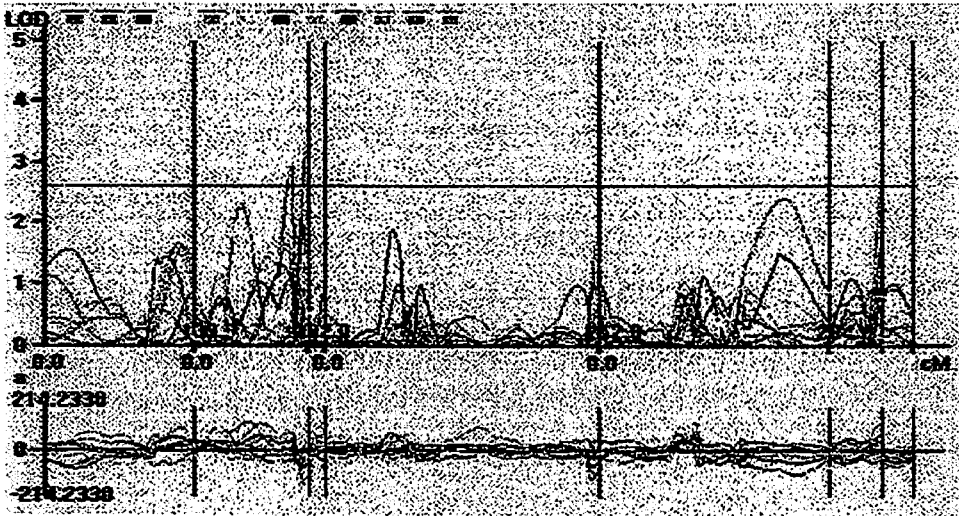


FIGURA 26 - Mapeamento e efeito aditivo de QTLs para produtividade de grãos em feijoeiro em vários experimentos, em diferentes épocas e locais e anos.

### 4.3 Considerações Gerais

Analisando-se as avaliações fenotípicas das famílias, pode-se considerar que, de uma forma geral, elas foram realizadas de forma bastante precisa e consistente. A consistência é baseada na utilização de experimentos com repetições e delineamento experimental, o que não é possível quando se utiliza o mapeamento a partir de avaliação fenotípica de plantas individuais, como na geração  $F_2$  e retrocruzamentos. Além disso, o grande número de experimentos realizados e a diversidade de condições ambientais (locais, épocas e anos) devem ter permitido a expressão de todo o potencial genético das famílias avaliadas. Considerando a precisão experimental avaliada por meio do coeficiente de variação, nota-se que, na maioria dos casos, eles foram abaixo dos relatados na literatura para a cultura do feijoeiro, indicando alta precisão nas avaliações fenotípicas. Assim, pode-se concluir que o desempenho fenotípico das famílias foi estimado da maneira mais fidedigna possível, visto que, principalmente para produtividade de grãos, a avaliação é comprometida pela baixa herdabilidade dessa característica.

Com exceção de produtividade de grãos e reação ao oídio, as características avaliadas não apresentaram variabilidade satisfatória devido à pequena divergência entre os genitores dessa população, principalmente com relação à época de florescimento e reação à mancha angular. Entretanto, essa baixa variabilidade, na maioria dos casos, indicou a ausência de alelos de efeitos principais, o que acaba facilitando a detecção dos alelos de efeitos menores, que na realidade são os mais difíceis de serem identificados pelas técnicas atuais do melhoramento de plantas. A identificação desses alelos de efeitos menores via marcadores moleculares pode se somar à detecção dos alelos de efeitos maiores por meio de avaliação fenotípica, e assim aumentar a eficiência do processo seletivo, aumentando os ganhos com a seleção através de um programa de seleção

assistida por marcadores que utilize a informação molecular associada com a informação fenotípica.

A interação genótipos por ambientes se mostrou significativa para todas as características, e as correlações entre as médias das famílias nos diferentes ambientes foi, com exceção de peso de sementes, baixa, indicando que, no feijoeiro, a expressão do fenótipo depende estritamente do ambiente de avaliação e de sua interação específica com cada família da população. Na cultura do feijão, a interação é muito expressiva devido à diversidade de locais e épocas de cultivos utilizados, sendo que, especialmente os ambientes utilizados nesse trabalho, foram muito contrastantes, principalmente para as condições de temperatura. Assim, já era esperado que essa interação se manifestasse nos QTLs que foram identificados pelos marcadores, de tal forma que, apesar do QTL e do marcador estarem presentes e ligados ao mesmo grupo de ligação, o marcador só é informativo se o QTL expressar o seu efeito nos vários ambientes de avaliação.

Na verdade, espera-se que a maioria dos QTLs sofra o efeito dessa interação e só se expresse em condições específicas. No entanto, existem alguns QTLs que mantêm seus efeitos significativos na maioria dos ambientes. Esses são os mais interessantes de serem identificados por ligação a um marcador molecular. Entretanto, eles devem ser a minoria, devido à grande variação ambiental na avaliação das famílias e à acentuada interação genótipos por ambientes. Portanto, tais QTLs devem ser difíceis de serem identificados por meio de marcadores moleculares, a não ser que o mapa de ligação dos marcadores seja altamente saturado, ou seja, com no mínimo um marcador a cada 15 cM (Tanksley, 1993), o que aumenta as chances de encontrar um marcador ligado a esse QTL, aparentemente tão raro.

Neste trabalho, principalmente por problemas laboratoriais, o mapa de ligação construído envolveu um número pequeno de marcadores RAPD, o que

ocasionou a construção de um mapa molecular com baixa saturação. Dessa forma, esse mapa apresenta algumas regiões bastante descobertas, o que dificulta a identificação dos QTLs. Assim, se os QTLs mais estáveis são uma minoria, nas condições em que as famílias foram avaliadas, eles são mais difíceis, ainda, de serem identificados. Além disso, apesar da grande facilidade e rapidez de trabalho, os marcadores RAPD apresentam problemas de consistência e reproducibilidade (Ferreira e Grattapaglia, 1993), que podem reduzir a precisão das informações geradas pelo mapa. No entanto, pode-se esperar um grau de informação bastante aceitável dos mapas construídos a partir de marcadores RAPD se eles forem construídos com alta saturação. Segundo Lanza, Guimarães e Schuster (2000) o número de marcadores necessários para construir um mapa genético depende do tamanho do genoma, do número de cromossomos e da frequência de recombinação genética. Um mapa pode ser considerado completo, quando o número de grupos de ligação obtido pela análise dos marcadores for igual ao número básico de cromossomos ou quando todos os marcadores genéticos mapeados estiverem ligados, sugerindo que todas as regiões do genoma estão representadas.

A amostra da população trabalhada foi bastante representativa (196 famílias), sendo muito superior ao mínimo indicado para o mapeamento, que segundo Young (1994) é de 50 famílias. Por ter sido baseado em uma grande amostra da população, o mapeamento realizado nesse trabalho tem grande potencial de informação quando forem adicionados novos marcadores. Assim, seria necessário que o mapa atual fosse mais saturado para não só aumentar o grau de informação, como também confirmar as informações já existentes.

De uma forma geral, a regressão identificou maior número de QTLs do que o mapeamento por intervalo composto muito em virtude do maior número de marcadores disponíveis para a análise de regressão, visto que, nesse processo,



não existe necessidade dos marcadores estarem ordenados em grupos de ligação. Já no mapeamento existe esta necessidade, o que limita o número de marcadores disponíveis para análise, pois nem todos se ligaram a um grupo, certamente, também, devido ao baixo número de marcadores usados. Na maioria dos casos não houve uma correspondência entre os marcadores identificados pela regressão e pelo mapeamento, sendo que isso foi, também, provavelmente devido à baixa saturação do mapa e ao diferente número de marcadores usados nos dois procedimentos, o que reduziu a precisão das inferências sobre localização dos QTLs com relação aos marcadores.

Para todas as características, foram detectados QTLs mais estáveis, mas ao contrário do que é relatado na literatura (Paterson et al., 1991; Stuber et al., 1992; Tanksley, 1993), eles foram, na maioria dos casos, de pequeno efeito. A explicação para essa diferença de resultados pode ser a utilização de critérios diferenciados para considerar os QTLs como estáveis. Além disso, o pequeno número de QTLs de grande efeito detectados neste trabalho não fornece informações precisas sobre seu comportamento. Desta forma, foram detectados alguns QTLs de efeito principal, mas, na maioria dos casos, foram identificados em experimentos específicos. Aqueles que também foram localizados com base na média de vários experimentos tinham seu efeito sensivelmente reduzido, certamente devido à interação do QTL por ambiente, como o caso do marcador OPR-02<sup>2</sup>, identificado como ligado a um QTL que controla a reação ao oídio.

A proporção da variação genética explicada pelos QTLs detectados experimentalmente depende de uma série de fatores, tais como o cruzamento analisado (Beavis et al., 1991), a característica avaliada (Edwards et al., 1992), o delineamento experimental e a resolução do mapa em termos de número de marcadores (Edwards, Stuber e Wendel, 1987). Dessa forma, é natural que ocorram resultados diferenciados para cada mapeamento realizado nas condições

específicas de cada programa de melhoramento de plantas, de tal forma que, as informações obtidas devem ser utilizadas com maior sucesso nas próprias condições em que foram obtidas.

Finalmente, vale comentar que, em virtude da grande interação genótipos por ambiente, e conseqüentemente dos baixos valores de herdabilidade nas análises conjuntas (modelo aleatório), existe grandes possibilidades da seleção assistida por marcadores contribuir para aumentar a eficiência de seleção, visto que, nessas condições, o processo de melhoramento convencional é muito difícil. Além disso, Lande e Thompson (1990) relatam que quando menor a herdabilidade de um caráter maior é a eficiência da seleção assistida por marcadores em relação a seleção fenotípica, o que reforça o potencial de utilização de marcadores moleculares no melhoramento do feijoeiro, apesar das várias dificuldades que ainda devem ser superadas.

Nesse trabalho, conseguiu-se identificar alguns marcadores ligados a QTLs estáveis. A utilização desses marcadores no processo seletivo pode auxiliar na identificação de linhagens com fenótipos desejáveis (principalmente resistência ao oídio e alta produtividade), e que se expressam na maioria dos ambientes, contribuindo assim para o aumento da eficiência dos programas de melhoramento genético do feijoeiro.

## 5 CONCLUSÕES

Existe a possibilidade de identificar marcadores moleculares ligados a características de importância agrônômica em feijoeiro utilizando tanto o processo de regressão múltipla quanto o processo de mapeamento por intervalo composto.

Utilizando o processo de regressão, foram identificados 23 marcadores para produtividade de grãos, 18 para peso de sementes, 8 para época de florescimento, 12 para reação ao oídio (*Erysiphe polygoni*) e 10 para mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*). Com o processo de mapeamento por intervalo composto foram identificados 8 para produtividade de grãos, 4 para peso de sementes, 3 para florescimento, 10 para reação ao oídio e 2 para mancha angular. Não houve grande concordância entre os resultados apresentados pelos dois métodos para a maioria das características analisadas

A interações de QTLs por locais e QTLs por épocas de cultivo foram bastante expressivas, sendo identificados alguns poucos QTLs com maior estabilidade.

Utilizando o processo de regressão, encontrou-se, para florescimento, 62,5% dos QTLs identificados nas análises individuais, que também foram identificados quando se fez a análise com a média dos ambientes; para peso de sementes foram 16,67%, reação ao oídio 41,67%, reação à mancha angular 40,0% e produtividade de grãos 8,70%. Com o processo de mapeamento por intervalo composto, encontrou-se 0% para florescimento; 50% para peso de sementes, 40% para reação ao oídio, 0% para reação à mancha angular e 12,5% para produtividade de grãos.

Os marcadores que se mostraram mais promissores para serem utilizados na seleção assistida foram OPE-20<sup>2</sup> e OPO-13<sup>2</sup> para época de florescimento;

OPN-02<sup>1</sup> e OPM-06<sup>1</sup> para peso de sementes; OPR-02<sup>2</sup>, OPD-08 e OPN-10 para reação a oídio; OPN-02<sup>2</sup> e OPN-07<sup>3</sup> para reação a mancha angular e OPO-20<sup>3</sup> e OPN-07<sup>2</sup> para produtividade de grãos.

O marcador OPD-08 está ligado a todas as características avaliadas nesse trabalho, com exceção da reação à mancha angular, mostrando estar próximo a um QTL de grande importância para o desenvolvimento do feijoeiro, e que pode ser utilizado no melhoramento dessa espécie, pois atua no sentido de reduzir a severidade do oídio e de aumentar a produtividade de grãos.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, A. DE F.B. **Predição do potencial genético de populações segregantes de feijoeiro utilizando genitores iner-raciais.** Lavras: UFLA, 1997. 80p. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- ABREU, A.F.B.; RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; MARTINS, L.A. **Progresso do melhoramento genético do feijoeiro nas décadas de setenta e oitenta nas regiões Sul e Alto Paranaíba em Minas Gerais. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.29, n.1, p. 105-112, jan. 1994.**
- ADAM-BLONDON, A.F.; SEVIGNAC, M.; BANNEROT, H.; DRON, M. SCAR, RAPD, and RFLP markers linked to dominant gene (*Are*) conferring resistance to anthracnose in common bean. **Theoretical and Applied Genetics, Berlin, v.88, n.6/7, p.865-870, Aug. 1994.**
- AJMONE-MARSAN, P.; MONFREDINI, G.; LUDWIG, W.F.; MELCHINGER, A.E.; FRANCESCHINI, P.; PAGNOTTO, G.; MOTTO, M. **In an elite cross of maize a major quantitative trait locus controls one-fourth of the genetic variation for grain yield. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, v.90, n.3/4, p.415-424, mar. 1995.**
- ALZATE-MARIN, A.L.; CARVALHO, G. A. de; MENARIM, H. et al. **Identification of RAPD markers associated with resistance to anthracnose in common beans. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, Fort Collins, v. 40, p.130-131, 1997.**
- APUYA, N.R.; FRAZIER, B.L.; KEIM, P., et al. **Restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, v.75, p.889-901, 1988.**
- ARUMUGANATHAM, K.; EARLE, E.D. **Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Molecular Biology Reporter, New Brunswick, v.9, p. 208-218, 1991.**
- BACKES, G.; GRANER, B.; FOROUGH-WEHR, B.; FISCHBECK, G.; WENZEL, G.; JAHOR, A. **Localization of quantitative trait loci (QTL) for agronomic important characters by use of a RFLP map in barley**

- (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.90, n.1, p.294-302, jan. 1995.
- BASSETT, M.J. A revised linkage map of common bean. **Hort Science**, Alexandria, v.26, n.7, p.834-836, July 1991.
- BEARZOTI, E. Simulação de seleção recorrente assistida por marcadores moleculares em espécies autógamas. Piracicaba, ESALQ/USP, 230p. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- BEAVIS, W.D.; GRANT, D.; ALBERTSEN, M.; FINCHER, R. Quantitative trait loci for plant height in four maize populations and their associations with qualitative genetic loci. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.83, n.2, p.141-145, 1991.
- BECKAMANN, J.S.; SOLLER, M. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. **Biotechnology**, v.8, p.930-932, 1990.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SCOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
- BETT, K.E.; MICHAELS, T.E. A two-gene model for powdery mildew resistance in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v.38, p.145-146, 1995.
- BURR, B.; BURR, F.A. Recombinant inbreds for molecular mapping in maize: Theoretical and practical considerations. **Trends in Genetics**, Oxford, v.7, p.55-60, 1991.
- BURR, B.; BURR, F.A.; TONPSON, K.H.; ALBERTSEN, M.C.; STUBER, C.W. Gene mapping with recombinant inbreds in maize. **Genetics**, Bethesda, v.118, p.519-526, 1988.
- CAUSSE, M.A.; FULTON, T.M.; CHO, Y.G., et al. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. **Genetics**, Bethesda, v.138, p.1251-1274, 1994.

- CARVALHO, G.A.; NIETSCHKE, S.; ALZART-MARIN, A.L.; FERRERA, C.F.; PAULA Jr., T.J.; FALEIRO, F.G.; BARROS, F.G.; MOREIRA, A. A. Identificação de marcadores RAPD ligados a genes de resistência à mancha-angular do feijão. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.22, p.225, ago.1997. Suplemento. (Resumo 133).
- CASTANHEIRA, A.L.M.; SANTOS, J.B. dos; FERREIRA, D.F.; MELO, L.C. Identification of common bean alleles resistant to anthracnose using RAPD. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v.22, n.4, p.565-569, Dec. 1999.
- CHASE, C.D.; ORTEGA, V.M.; VALLEJOS, C.E.; DNA restriction fragment length polymorphisms correlate with isozyme diversity in *Phaseolus vulgaris* L. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.81, p.806-811, 1991.
- COCHRAN, W.G.; COX, G.M. *Experimental design*. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 1966. 611p.
- COLLICCHIO, E. Associação entre o porte da planta do feijoeiro e o tamanho dos grãos. Lavras: UFLA, 1995. 98p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- CORTE, H.R. Comportamento de populações segregantes de feijão, avançadas pelo método do "bulk", por dezessete gerações. Lavras: UFLA, 1999. 95p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- DE VICENTE, M.C.; TANKSLEY, S.D. QTL analysis of transgressive segregation in an interspecific tomato cross. *Genetics*, Bethesda, v.134, p. 585-596, 1993.
- DEVOS, D.M.; MILLAN, T.; GALE, M.D. Comparative RFLP maps of the homoeologous group-2 chromosomes of wheat, rye and barley. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.85, v.784-792, 1993.
- DIERS, B.W.; KEIM, P.; FEHR, W.R.; SHOEMAKER, R.C. RFLP analysis of soybean seed protein and oil content. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.83, n.5, p.608-612, 1992.

- DOEBLEY, J.; STEC, A. Genetic analysis of the morphological differences between maize and teosinte. *Genetics*, Bethesda, v.129, n.2, p.285-295, Feb. 1991.
- DRAPER, N.R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. John Wiley, 2. Ed. New York: John Wiley, 1981, 709p.
- DUARTE, J.M.; SANTOS, J.B.; MELO, L.C. Genetic divergence among common bean cultivars from different races based on RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v.22, n.3, p. 419-426, Sept. 1999.
- DUNDAS, B. Breeding beans for resistance to powdery mildew and rust. *Phytopathology*, St. Paul, v.32, n.9, p.828, 1942.
- DUNDAS, B. Inheritance of resistance to powdery mildew in beans. *Hilgardia*, Berkeley, v.10, n.8, p.241-253, Nov. 1936.
- EDWARDS, M.; JOHNSON, L. RFLPs for Rapid Recurrent Selection. In: *Symposium of Analysis of Molecular Marker Data*. Corvallis, 1994. *Proceedings...* Corvallis: American Society for Horticultural Science, 1994. p.33-40
- EDWARDS, M.D.; HELENTJARIS, T.; WRIGHT, S.; STUBER, C.W. Molecular-Marker-facilitated investigation of quantitative trait loci in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.83, p.765-774, 1992.
- EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W.; WENDEL, J.F. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. Numbers, genomic distribution and types of gene action. *Genetics*, Bethesda, v.116, p.113-125, 1987.
- ELLIS, T.H.N.; TURNER, L.; HELLENS, R.P.; LEE, D.; HARKER, C.L.; ENARD, C.; DOMONEY, C.; DAVIES, D.R. Linkage maps in pea. *Genetics*, Bethesda, v.130, p.649-663, 1992.
- ESTEFANEL, V.; PIGNATARO, I.A.B.; STORCK, L. Avaliação do coeficiente de variação de experimentos com algumas culturas agrícolas. In : **SIMPÓSIO DE ESTATÍSTICA APLICADA A EXPERIMENTAÇÃO AGRONÔMICA**, 2, 1987, Londrina. *Anais...* Londrina, 1987. p. 115-131.



- EVANS, A.M. e DAVIS, J.H.C. Breeding Phaseolus beans as grain legumes for Britain. *Applied Biology*, Cambridge, v.34, p.01- 42, 1978.
- FERREIRA, C.F.; BORÉM, A.; CARVALHO, G.A.; NIETSCHKE, S.; JÚNIOR, T.J.P.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identificação de marcadores RAPD ligados ao gene de resistência à raça 63.39 da Mancha-angular do feijoeiro. *Bragantia*, Campinas, v.58, n.2, p. 247-252, 1999.
- FERREIRA, D.F. **Eficiência de métodos de mapeamento de locos quantitativos (QTLs) e da seleção assistida por marcadores moleculares através de simulação.** Piracicaba: ESALQ, 1995. 210Pp. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 2 ed. Brasília:EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220p.
- GEPTS, P.; OSBORN, T.C.; RASHKA, K.; BLISS, F.A. Phaseolin protein variability in wild forms and land races of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. *Economical Botanic*, v.40, p. 451-468, 1986.
- HALDANE, J.B.S. The recombination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linkage factors. *Journal of Genetics*, Bangalore, v.8, p.299-309, 1919.
- HALEY, S.D.; AFANADOR, L.K.; KELLY, J.D. Identification and application of random amplified polymorphic DNA marker for the I gene (potyvirus resistance) in common bean. *Phytopathology*, St. Paul, v.84, n.2, p.157-160, Feb. 1994
- HALEY, S.D.; MIKLAS, P.N.; STAVELY, J.R.; BYRUM, J.; KELLY, J.D. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.86, n.4, p.505-512, 1993.
- HALWARD, T.; STALKER, H.T.; KOCHERT, G. RFLP map of peanut. In: PHILLIPS, R.L.; VASIL, I.K. **DNA-Based Markers in Plants.** Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 1994. p.246-260.

- HART, G.E. RFLP maps of bread wheat. In: PHILLIPS, R.L.; VASIL, I.K. **NA-Based Markers in Plants**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 1994. p.327-358.
- HELENTJARIS, T.; WEBER, D.; WRIGHT, S. Identification of the genomic locations of duplicate nucleotide sequence in maize by analysis of restriction fragment length polymorphisms. *Genetics*, Bethesda, v.118, p.353-363, 1988.
- JANSEN, R.C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics*, Bethesda, v.135, p.205-211, 1993.
- JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA, *Nature*, London, v.314, p.67-73, 1985.
- JOHNSON, E.; GUZMAN, P.; MANDALA, D.; MKANDAWIREM. B.; STEMPLE, S.; GILBERTSON, R.; GEPTS, P. Molecular tagging of the bc-3 gene for introgression into Andean common bean. *Crop Science*, Madison, v.37, n.1, p.248-254, Jan/Feb. 1997.
- KANAPP, S.J.; STROUP, W.W.; ROSS, W.M. Exact confidence intervals for heritability on a progeny mean basis. *Crop Science*, Madison, v.25, n.1, p.192-194, Jan/Feb. 1985.
- KANTETY, R.V.; ZENG, X.; BENNETZEN, J.L.; ZEHR, B.E. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Molecular Breeding*, Dordrecht, v.1, p.365-373, 1995.
- KAO, C.H.; ZENG, Z.B.; TEASDALE, R.D. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics*, Bethesda, v.152, p.1203-1216, 1999.
- KEIN, P.; DIERS, B.W.; OLSON, T.C.; SHOEMAKER, R.C. RFLP mapping in soybean: association between marker loci and variation in quantitative traits. *Genetics*, v.126, p.735-742, 1990.
- KEIM, P.; SCHUPP, J.M.; TRAVIS, S.E.; CLAYTON, K.; ZHU, T.; SHI, L.; FERREIRA, A.; WEBB, D.M. A high-density soybean genetic map based on

- AFLP markers. *Crop Science*, Madison, v.37, n.2, p.537-543, Mar./Apr. 1997.
- KESSELI, R.V.; PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Analysis of detailed genetic linkage map of *Lactuca sativa* (lettuce) constructed from RFLP and RAPD markers. *Genetics*, Bethesda, v.136, p.1435-1446, 1994.
- KLEINHOF, A.; KILIAN, A. RFLP maps of barley. In: PHILLIPS, R.L. and VASIL, I.K. *DNA-Based Markers in Plants*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 1994. p.163-198.
- LANAUD, C.; RISTERUCCI, A.M.; N'GORAN, A.K.J.; CLEMENT, D.; FLAMENT, M.H.; LAURENT, V.; FALQUE, M. A genetic linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.91, n.6/7, p.987-993, Mar. 1995.
- LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in improvement of quantitative traits. *Genetics*, Bethesda, v.124, n.3, p.743-756, Mar. 1990.
- LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative trait using RFLP linkage maps. *Genetics*, Bethesda, v.121, p.185-199, 1989.
- LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHANSON, J. et al. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, San Diego, CA, v.1, p.174-181, 1987.
- LANZA, M.A.; GUIMARÃES, C.T.; SHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.21, n.204, p.97-108, maio/jun. 2000.
- MACHADO, C.F. *Procedimentos para escolha de genitores de feijão*. Lavras: UFLA, 1999. 118p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- MELO, L.C.; SANTOS, J.B.; RAMALHO, M.A.P. Choice of parents to obtain common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars tolerant to low temperatures at

- the adult stage. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.20, n.2, p. 283-292, June 1997.
- MICHELMORE, R.V.; KESSELI, R.V.; RYDER, E.J. Genetic mapping in lettuce. In: PHILLIPS, R.L.; VASIL, I.K. **DNA-based markers in plants**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 1994. p.223-239.
- MIKLAS, P.N.; JOHNSON, E.; STONE, V.; BEAVER, J.S.; MONTOYA, C.; ZAPATA, M. Selective mapping of QTL conditioning disease resistance in common bean. **Crop Science**, Madison, v.36, n.5, p.1344-1351, Sept./Oct. 1996.
- MIKLAS, P.N.; STONE, V.; URREA, C.A.; JOHNSON, E.; BEAVER, J.S. Inheritance and QTL analysis of field resistance to ashy stem blight in common bean. **Crop Science**, Madison, v.38, n.4, p.916-921, July/Aug. 1998.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v.55, p.335-350, 1987.
- NIENHUIS, J.; HELENTJARIS, T.; SLOGUM, M.; RUGGERO, B.; SCHAEFER, A. Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of loci associated with insect resistance in tomato. **Crop Science**, Madison, v.27, n.4 p.797-803, July/Aug. 1987.
- NIENHUIS, J. ; SINGH, S.P. Genetics of seed yield and its components in common bean (*Phaseolus vulgaris*) of Middle-American origin. I. General combining ability. **Plant Breeding**, Berlin, v.101, p.105-106, 1988.
- NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SCKROCH, P.; SANTOS, J. B. dos . Genetic relationships among cultivars and lines of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.120, n.2, p. 300-306, Mar. 1995.
- NODARI, R.O .; TSAI, S.M.; GILBERTSON, R.L.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean, 2. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, v.85, n.5, p.513-520, 1993.

- OLAYA, G.; ABAWI, G.S.; WEEDEN, N.F. Inheritance of the resistance to *Macrophomina phaseolina* and identification of RAPD markers linked to the resistance genes in beans. *Phytopathology*, St. Paul, v.86, n.6, p.674-679, June 1996.
- OLIVEIRA, A.C. Construção de mapas genéticos em plantas. In: Milach, S.C.D. *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre, RS:UFRGS, 1998, p.41-56.
- OLIVEIRA, L.B. Alternativas na escolha dos parentais em um programa de melhoramento do feijoeiro. Lavras: UFLA, 1995. 67p. (Dissertação - Mestrado Genética e Melhoramento de Plantas).
- PARK, S.O.; COYNE, D.P.; BOKOSI, J.M. et al. Identification of RAPD markers linked to a major gene for rust resistance and indeterminate growth habit using bulked segregant analysis in a common bean cross. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, Fort Collins, v.40, p.116-117, 1997.
- PATERNIANI, E. Maize breeding in the tropics. *Critical Reviews in Plant Sciences*, Boca Raton, v.9, n.2, p.125-154, 1990.
- PATERSON, A.H. *Molecular dissection of complex traits*. Boca Raton, Flórida, CRC Press LLC, 1998. 305 p.
- PATERSON, A.H.; DAMON, S.; HEWITT, J.D.; ZAMIR, D.; RAQBINOWITCH, H.D. Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato comparison across species, generations and environments. *Genetics*, Bethesda, v.127, p.181-197, 1991.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PEREIRA-FILHO, I. A choice of parents for dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) breeding. I. Interaction of mean components by generation and by localization. *Revista Brasileira Genética*, Ribeirão Preto, v.11, n.2, p.391-400, June, 1988.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; ZIMMERMANN, M.J. *Genética quantitativa em plantas autógamas*. Goiânia, UFG, 1993. 271p.

- REZENDE, V.F. Caracteres agronômicos e marcadores RAPD associados ao gene de reação ao agente causal do oídio no feijoeiro. Lavras: UFLA, 2000. 60p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- REZENDE, V.F.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A. de F.B. Comportamento de linhagens de feijão com relação ao nível de resistência ao oídio. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 5., 1996, Goiânia. Anais... Goiânia: Embrapa-CNPAP-APA. 329-331.
- REZENDE, V.F.; RAMALHO, M.A.P.; CORTE, H.R. Genetic control of common bean (*Phaseolus vulgaris*) resistance to powdery mildew (*Erysiphe polygoni*). *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v.22, n.2, p.233-236, June 1999.
- REINISCH, A.J.; DONG, J.M.; BRUBAKER, C.L. STELLY, D.M. WENDEL, J.F.L; PATERSON, A .H. A detailed map of cotton, *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense*: chromosome organization and evolution in disomic polyploid genome. *Genetics*, Bethesda, v.138, p.829-847, 1994.
- REITER, R.S. Genetic analysis of tolerance to low phosphorus stress in maize using Restriction Fragment Length Polymorphism. Madison: University of Wisconsin, 1989. 102p. (Tese de Doutorado).
- SAIKI, R.K. Amplification of genomic DNA. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. PCR protocols a guide to methods and applications. San Diego, p.13-20, 1990.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOEFFEL, S.; SHCARF, S.J.; HIGUCHI, G.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, Washington, v.239, n.4839, p.487-491, Jan. 1988.
- SAKIYAMA, N.S. Marcadores moleculares e as hortaliças. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.11, n.2, p.204 - 206, 1993.
- SANTOS, J.B.; VENCOVSKY, R.; RAMALHO, M.A.P. Controle genético da produção de grãos e seus componentes primários em feijoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.20, n.10, p.1203-1211, Out. 1985.

- SARTORATO, A.; RAVA, C.A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle.** Brasília: EMBRAPA - SPI, 1994. 300p. (EMBRAPA - CNPAF. Documentos, 50)
- SAX, K. The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. **Genetics**, Bethesda, v.8, p.552-560, 1923.
- SHAW, J.K.; NORTON, J.B. The inheritance of seed-coat color in garden beans. **Massachusetts Agriculture Experiment Station Bulletin**, Berlin, v.185, p.58-104, 1918.
- SHOEMAKER, R.C. RFLP map of soybean. In: PHILLIPS, R.L.; VASIL, I.K. **DNA-Based Markers in Plants.** Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 1994. p. 299-309, 1994.
- SILVA, J.A. G.; SORRELS, M.; BURNQUIST, W.L.; TANKSLEY, S.D. RFLP linkagem map and genome analysis of *Saccharum spontaneum*. **Genome**, Ottawa, v.36, n.4, p.782-791, Aug. 1993.
- SINGH, S.P. Gene pools in cultivated dry bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v.31, p.180-182, 1988.
- SINGH, S.P. Patterns of variation in cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Economic Botany**, New York, v.43, n.1, p.39-57, 1989.
- SINGH, S.P.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D.G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Economic Botany**, New York, v.45, p. 379-396, 1991.
- STROMBERG, L.D; DUDLEY, F.K.; RUGENER, J.W. Comparing conventional early generation selection with molecular marker assisted selection in maize. **Crop Science**, Madison, v.34, n.5, p.1221-1225, Sept./Oct. 1994.
- STUBER, C.W.; EDWARDS, M.D.; WENDEL, J.F. Molecular-marker facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. **Crop Science**, Madison, v.27, n.4, p.639-648, July/Aug.1987.

- STUBER, C.W.; GOODMAN, M.M; MOLL, R.H. Improvement of yield and ear number resulting from selection at allozyme loci in a maize population. *Crop Science*, Madison, v.22, n.4, p.737-740, July/Aug. 1982.
- STUBER, C.W.; LINCOLN, S.E.; WOLFF, D.W.; HELENTAJARIS, T. LANDER, E.S. Identification of genetic factors contributing to hererosis in a hybrid form two elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics*, Bethesda.132, p. 823-839, 1992.
- TAKEDA, C.; SANTOS, J.B.; RAMALHO, M.A.P. Progeny test for the ESAL 501 x A 354 common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hibrid at different locations. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, v.14, n.3 p.771-779, Sept. 1991.
- TELXEIRA, F.F.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. Estimativa do número de genes envolvidos no início da floração do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), usando a metodologia de Jinks e Towey. *Ciência e Prática*, Lavras, v.19, n.3, p.335-338, 1995.
- URREA, C.A.; MIKLAS, P.N.; BEAVER, J.S.; RJILEY, R.M. A codominant randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker useful for indirect selection of BGMV resistance in common bean. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.121, n.6, p.1035-1039, Nov. 1996.
- TALBOT, D.R.; ADANG, M.J.; SLIGHTON, J.L.; HALL, T.C. Size and organization of a multigene family encoding phaseolin, the major seed storage protein of *Phaseolus vulgaris*. *Molecular and General Genetic*, Berlin, v.198, p.42-49, 1984.
- TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. *Annual Reviews of Genetic*, Palo Alto, v.27, p. 205-233, 1993.
- TANKSLEY, S.D. Rice molecular map. In: PHILLIPS, R.L.; VASIL, I.K. *DNA-Based Markers in Plants*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 1994a. p. 286-290.
- TANKSLEY, S.D. Tomato molecular map. In: PHILLIPS, R.L.; VASIL, I.K. *DNA-Based Markers in Plants*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 1994b. p. 310-326.



- TARAN, B.; MICHAELS, T.E.; PAULS, K.P. Genetic mapping of agronomic traits in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, Fort Collins**, v.43, p.60-61, 2000.
- THODAY, J.M. Location of polygenes. **Nature, London**, v.191, n.4786, p.368-370, July 1961.
- VALLE, F.; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa: UFV, Departamento de Fitopatologia, 1997. v.2, p.335-435.
- VALLEJOS, C.E. *Phaseolus vulgaris*: the common bean. In: PHILLIPS, R.L.; VASIL, I.K. **DNA-Based Markers in Plants**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 1994. p. 261-270.
- VALLEJOS, C.E.; SAKIYAMA, N.S.; CHASE, C.D. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. **Genetics, Bethesda**, v.131, p.733-740, 1992.
- VASCONCELOS, M.J.V.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. et al. Genetic diversity of the common bean *Phaseolus vulgaris* L. determined by DNA - based molecular markers. **Brazilian Journal of Genetics, Ribeirão Preto**, v.19, n.3, p.474-451, Sept. 1996.
- VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica aplicada no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 496p.
- VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa: UFV, 1983. 231p.
- VIENNE, D.; MAURICE, J.; JOSSE, M.; LEONARDI, A.; DAMERVAL, C. Mapping Factors Controlling Genetic Expression. **Cellular and Molecular Biology, Noisy-de-Grande**, v.40, n.1, p. 29-39, 1994.
- WHITE, J.W.; SINGH, S.P. Sources and inheritance of earliness in tropically adapted indeterminate common bean. **Euphytica, Wageningen**, v.55, p.15-19, 1991.
- WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful

- as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v.18, p.6531-6535, 1990.
- YOUNG, N.D. Constructing a plant genetic linkage map with DNA markers. In: PHILLIPS, R.L.; VASIL, I.K. *DNA-Based Markers in Plants*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 1994. p.39-57.
- YOUNG, R.A. ; KELLY, J.D. RAPD markers linked to three major anthracnose resistance genes in common bean. *Crop Science*, Madison, v.37, p.940-946, 1997.
- ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. *European Patent Application Application 0534858 A1*, 1993.
- ZENG, Z.B. Theoretical basis of precision mapping of quantitative trait loci. *Proceedings of the National Academy of Science United States of America*, Washington, v.90, p.10972-10976, 1993.
- ZENG, Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, Bethesda, v.136, p.1457-1468, 1994.
- ZHENG, J.; NAKATA, M.; UCHIYAMA, H.; TANAKA, R. Giemsa C-banding pattern in several species of *Phaseolus* and *Vigna*. *Cytologia*, Tokyo, v.56, p.459-466, 1991.