



MONIK EVELIN LEITE

**SELEÇÃO NATURAL EM POPULAÇÕES DE
FEIJOEIRO, CONDUZIDAS EM DIFERENTES
NÍVEIS DE NITROGÊNIO, UTILIZANDO A
PRODUTIVIDADE DE GRÃOS E ALELOS DE
MICROSSATÉLITES**

LAVRAS-MG

2010

MONIK EVELIN LEITE

**SELEÇÃO NATURAL EM POPULAÇÕES DE FEIJOEIRO,
CONDUZIDAS EM DIFERENTES NÍVEIS DE NITROGÊNIO,
UTILIZANDO A PRODUTIVIDADE DE GRÃOS E ALELOS DE
MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. João Bosco dos Santos

Co-orientador

Dr. Magno Antonio Patto Ramalho

LAVRAS – MG

2010

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

Leite, Monik Evelin.

Seleção natural em populações de feijoeiro, conduzidas em diferentes níveis de nitrogênio, utilizando a produtividade de grãos e alelos de microssatélites / Monik Évelin Leite. – Lavras : UFLA, 2010.

146 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: João Bosco dos Santos.

Bibliografia.

1. Phaseolus vulgaris. 2. Marcadores SSR. 3. Eficiência do uso de nitrogênio. 4. Adaptação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.53

MONIK EVELIN LEITE

**SELEÇÃO NATURAL EM POPULAÇÕES DE FEIJOEIRO,
CONDUZIDAS EM DIFERENTES NÍVEIS DE NITROGÊNIO,
UTILIZANDO A PRODUTIVIDADE DE GRÃOS E ALELOS DE
MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de julho de 2010.

Dr. Magno Antônio Patto Ramalho UFLA

Dr. Alan Carvalho de Andrade CENARGEN

Dr. João Bosco dos Santos
Orientador

LAVRAS – MG

2010

À Deus, pois sem Ele nada seria possível

*Aos meus pais, Beto e Elaine, que desde o início me ensinaram a acreditar no
valor do conhecimento*

*Ao meu marido Miguel, que com muito amor e compreensão compartilhou
comigo esta conquista.*

*À minha filha Ana Clara, que com todo seu carinho, me deu força para
conseguir enfrentar esta batalha.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado força, para dar mais um passo em minha caminhada.

À universidade Federal de Lavras, em especial ao programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela oportunidade de realização do Mestrado, e a CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

Ao professor João Bosco, pela orientação, serenidade, paciência, confiança e por todos os ensinamentos transmitidos durante o curso.

Ao professor Magno Antonio Patto Ramalho pelos ensinamentos, pela co-orientação e por conceder o material para a realização deste trabalho. À doutora Ângela, pelos ensinamentos e boa convivência nas tarefas de campo. Ao Dr. Alan, pela disponibilidade e valiosas sugestões apresentadas para a melhoria do trabalho.

Aos companheiros e amigos de mestrado Fernando, Danilo, Izabel e Lidiane.

Aos amigos do laboratório de Genética molecular da UFLA, Rafaela, Igor, Karla, Flávia, Melina, Letícia, Fernanda, Juliana, Gheysa, Paulo Filipe, Renato, Márcia e toda a ajuda e amizade.

Ao amigo Lamartine, pela disposição, por estar sempre pronto a me auxiliar, competência e pela amizade.

A todos os amigos do GEN e do “feijão”, pelo convívio, amizade e ajuda.

Aos funcionários do departamento de biologia: Heloíza, Zélia, Rafaela, Irondina e Du, pelo carinho e convivência amigável.

Aos meus pais, Beto e Elaine e meus irmãos, Rafael, Yasmin e Igor, pelo amor e motivação em todos os momentos de minha vida.

Ao meu esposo Miguel, pelo carinho, apoio e compreensão indispensáveis nessa etapa de minha vida.

A minha filha Ana Clara, que mesmo sem entender nada, me deu muito carinho e força para enfrentar mais esta batalha.

A todos que contribuíram pela o êxito deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Este estudo teve por objetivo verificar se a seleção natural atua em populações segregantes de feijão conduzidas na presença e ausência de N, bem como verificar se a seleção natural afeta a frequência dos alelos de microssatélite de forma específica, visando identificar aqueles que podem auxiliar na seleção. Foram obtidas quatro populações F8 originadas dos cruzamentos CI-107 x Ouro Negro e IAPAR-81 x VC-5 e conduzidas em bulk. Os genitores CI-107 e IAPAR-81 são considerados responsivos e os genitores Ouro Negro e VC-5 tolerantes. Foram obtidas 100 progênies de cada cruzamento e conduzido na presença e ausência de N. Foi extraído o DNA das 400 progênies, das quais 194 foram avaliadas na safra das águas e 79, na safra de inverno quanto à produção de grãos. Essas progênies foram avaliadas em dois experimentos distintos com e sem N, no delineamento látice 14 x 14 na safra das águas e 9 x 9 na safra de inverno. Utilizando-se os dados de produtividade média de grãos foram estimados os índices de resposta à aplicação de N e realizadas as análises de variância individual e conjunta para safras e níveis Na média das duas safras, a produtividade de grãos obtida com N foi 50% superior. No geral, a produtividade média das progênies de cada cruzamento mostrou uma tendência para uma maior produtividade no experimento de mesma origem em relação às progênies de origem diferente, à exceção daquelas originadas com N, do cruzamento CI-107 x Ouro Negro, na safra das águas. Observou-se também que as progênies originadas em ambientes sem N foram mais eficientes e as originadas com N foram mais responsivas. Esses resultados evidenciaram que se o objetivo é obter linhagens para condições sob estresse de N, a seleção deve ser realizada nas mesmas condições, para aumentar a chance de sucesso, aliado ao efeito da seleção natural que atua para selecionar indivíduos mais adaptados para um ambiente particular. Foram selecionados 35 pares de primers polimórficos nos genitores, sendo 20 comuns aos dois cruzamentos. Utilizando os DNAs das 400 progênies, constatou-se que a seleção natural atuou em 22 dos locos avaliados, independentemente do cruzamento e da origem da progênie. Alelos dos dois genitores foram favorecidos pela seleção natural. Foram ainda identificados QTLs para o índice de resposta ao N e para produção de grãos, sendo obtidos dois marcadores que foram comuns para o índice de resposta e para produção de grãos, tanto nas análises considerando as progênies de origem sem N quanto considerando todas as progênies, independente da origem, portanto, estes primers são marcadores potenciais para eficiência no uso de N.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. Eficiência de uso de nitrogênio. Marcadores SSR. Adaptação

ABSTRACT

The objectives of this study were to verify whether natural selection acts in segregating populations of common bean conducted in the presence or absence of N and also check whether natural selection affects the frequency of microsatellite alleles in a specific manner, in order to identify markers that may help in assisted selection. Four F₈ populations originated from crosses CI-107 x Ouro Negro and IAPAR-81 x VC-5 were obtained and conducted through the bulk method. The parents CI-107 and IAPAR-81 are considered responsive and the parents Ouro Negro and VC-5 tolerant. One hundred progenies were obtained from each cross and conducted in the presence or in the absence of N. The DNA was extracted from each of 400 progenies, and from these 194 progenies were evaluated in the rainy season and 79 progenies in the winter season for grain yield. The progenies were evaluated in two separate experiments with and without N in a 14 x 14 lattice design in the rainy season and 9 x 9 lattice design in winter crop. Using the data of mean grain yield it was estimated the rate of response to N application (α). Analyses of variance for individual experiments and joint analyses for seasons and levels of N were set up. The average grain yield of the two seasons obtained with N was 50% higher. Overall, mean grain yield of progenies from each cross showed a tendency to increased productivity in the experiment of the same origin in relation to the progenies of different origin, except for those that originated with N of the cross CI-107 x Ouro Negro, in the rainy season. It was also noted that progenies originated from environment without N were more efficient for use N, and the progenies originated from environment with N were more responsive. If the goal is to obtain lines under N stress, the selection must be made under the same conditions, to increase the chance of success coupled with the effect of natural selection that acts to select individuals best adapted to this particular environment. Thirty five primer pairs were polymorphic in the parents and 20 of them were common to the two crosses. Using DNAs from 400 progenies it was found that natural selection acted in 22 loci evaluated independently of the parents and the origin of progeny. Alleles from both parents were favored by natural selection. QTLs for α and grain yield it were identified and two common markers were identified for the two traits in both analysis considering the progenies originated without N and considering all the progenies regardless of origin, so these primers are potential markers for the use efficiency of N.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. Nitrogen use efficiency. SSR markers. Adaptation

SUMÁRIO

	CAPITULO 1: Introdução geral.....	11
1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Melhoramento do feijoeiro e a condução de populações segregantes	14
2.2	Seleção natural.....	16
2.3	Macronutrientes na cultura do feijoeiro	19
2.4	Fixação Biológica de nitrogênio	24
2.5	Seleção de plantas visando à melhoria da eficiência de uso de N	25
2.6	Resposta diferencial do feijoeiro à adubação nitrogenada	31
2.7	Reação da polimerase em cadeia (PCR).....	32
2.8	Marcadores microssatélites ou de sequências repetidas	34
2.9	Identificação de QTLs.....	36
2.10	Problemas na detecção de QTLs.....	37
2.11	QTLs para eficiência no uso do nitrogênio	42
	REFERÊNCIAS	46
	CAPÍTULO 2 Seleção natural em populações de feijão conduzidas em diferentes níveis de nitrogênio	56
1	INTRODUÇÃO	59
2	MATERIAL E METODOS.....	61
2.1	Local de realização do experimento.....	61
2.2	Obtenção das populações segregantes	61
2.3	Condução dos experimentos	62
2.4	Análise dos dados de campo	64
2.5	Estimativas de herdabilidade e ganho de seleção	68
2.6	Estimativa do índice de resposta à aplicação de nitrogênio (α)...	69
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4	CONCLUSÃO	96
	REFERÊNCIAS	97
	CAPÍTULO 3 Seleção natural em alelos de microssatélites do feijão conduzidas sobre diferentes níveis de N e identificação de QTLs	100
1	INTRODUÇÃO	103
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	105
2.1	Extração de DNA e reação de SSR (Single Sequence Repeat)..	105
2.2	Pré-seleção de primers selecionados pela seleção natural	106
2.3	Teste da alteração das frequências genotípicas nas populações segregantes	107
2.4	Estimativas dos coeficientes de adaptabilidade	

	relativa acumulados	108
2.5	Identificação de QTLs em feijoeiro.....	109
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	110
3.1	Emprego de microssatélites nas populações conduzidas em diferentes níveis de N	111
3.2	Estimativa das frequências alélicas.....	118
3.3	Estimativa dos coeficientes de adaptabilidade relativa acumulados	122
3.4	Identificação de QTLs.....	126
4	CONCLUSÕES	139
	REFERÊNCIAS	140
	ANEXOS	144

CAPÍTULO 1 :

Seleção Natural na produção de grãos e alelos de microssatélites em populações conduzidas em diferentes níveis de N

1 INTRODUÇÃO

A planta do feijoeiro é muito exigente em nutrientes, por possuir ciclo curto e sistema radicular pouco desenvolvido. Devido a isso, para que a planta possa expressar todo o seu potencial genético em produtividade de grãos, ela necessita que os nutrientes estejam prontamente disponíveis nos momentos de demanda (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

O nitrogênio é um dos vários nutrientes exigidos para um bom desenvolvimento do feijoeiro, encontrado em abundância nas células das plantas e, por isso, de grande importância na produção de semente. No entanto e na maioria das vezes, não está disponível em quantidades suficientes nos solos de regiões tropicais (ALVES, 2002; FERREIRA; ANDRADE; ARAÚJO, 2004). Este problema é ainda agravado pelo fato da fixação biológica de nitrogênio, normalmente ser insuficiente para suprir as necessidades da planta, mesmo com o enorme esforço da pesquisa visando à melhoria da eficiência na fixação simbiótica desse nutriente. Para se ter uma produção em níveis econômicos é então necessária a adubação nitrogenada.

A grande maioria dos agricultores que utiliza agricultura tipicamente familiar, praticamente não utiliza fertilizantes nitrogenados, por ser um insumo relativamente caro. Dessa forma, é importante a obtenção de cultivares que apresentem maior eficiência de uso deste nutriente, ou seja, desenvolver linhagens produtivas mesmo em ambientes com baixa disponibilidade de nitrogênio mineral, mas também capazes de atender à adubação nitrogenada. Entretanto, é difícil avaliar e selecionar tais linhagens. Uma alternativa para contornar este problema é o uso da seleção natural por meio da condução de populações segregantes de feijoeiro em ambientes com e sem adubação nitrogenada. A avaliação de populações conduzidas nesses ambientes pode permitir a identificação de progênies menos exigentes no emprego de adubos

nitrogenados, bem como as mais responsivas à adubação nitrogenada, uma vez que a seleção natural tende a selecionar genótipos mais adaptados a cada ambiente particular (FURTINI et al., 2009).

O uso de marcadores moleculares, como os microssatélites, pode contribuir para selecionar alelos para maior adaptação (LEITE, 2008; RODRIGUES; SANTOS, 2006 e alguns desses alelos podem estar relacionados à eficiência na utilização do nitrogênio, já que em solos pobres em nitrogênio, a eficiência no seu uso favoreceria a sobrevivência das populações e poderia contribuir para a identificação de locos relacionados à capacidade de resposta à adubação nitrogenada. Dessa forma, a identificação de marcadores relacionados à maior eficiência no uso de N pode auxiliar na seleção.

A maioria dos estudos envolvendo a utilização de ferramentas moleculares na identificação de genótipos eficientes no uso de N foi realizada com gramíneas, principalmente com as culturas do milho (AGRAMA et al., 1999; GALLAIS; HIREL, 2004; HIREL et al., 2001) e trigo (DIAGUO et al., 2006; LE GOUIS et al., 2008; MACCAFERRI et al., 2008; QUARRIE et al., 2005). No caso do feijoeiro as pesquisas nessa área ainda são escassas.

Como esse tipo de informação ainda é limitada para a cultura do feijoeiro, o presente trabalho teve por objetivos verificar se a seleção natural atua em populações segregantes de feijão conduzidas na presença e na ausência de N e também verificar se a seleção natural afeta a frequência dos alelos de microssatélite de forma específica, visando identificar aqueles que podem auxiliar na seleção.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Melhoramento do feijoeiro e a condução de populações segregantes

O feijoeiro é uma planta tipicamente autógama, devido a sua morfologia floral que força a liberação do pólen dentro da flor ou devido à ocorrência de cleistogamia, o que faz com que predomine a autofecundação como sistema reprodutivo. Nessa espécie, entretanto, a fecundação cruzada também pode ocorrer, podendo variar de acordo com a cultivar. Porém, a taxa de ocorrência desse tipo de sistema reprodutivo é de no máximo 5% e é promovida principalmente por insetos.

Existem várias opções de métodos de melhoramento e, no caso de autógamias, o método mais amplamente utilizado é a hibridação, que permite reunir em um único indivíduo os alelos desejáveis que se encontram em linhagens distintas. Para aplicação deste método, existem três etapas fundamentais: a escolha dos genitores, como combinar tais genitores e a escolha do método de condução da população segregante (BORÉM, 1997).

A escolha dos genitores depende dos caracteres avaliados, do tipo de herança e da fonte de germoplasma disponível. A escolha dos genitores pode ser facilitada quando o caráter melhorado for de herança qualitativa, ou seja, controlado por poucos genes e pouco influenciado pelo ambiente. No entanto, esta escolha se torna mais difícil para caracteres quantitativos como a produção de grãos, controlada por muitos genes e muito influenciada pelo ambiente.

O objetivo do melhoramento de plantas autógamias é o de obter linhagens com o maior número de alelos favoráveis. Com o decorrer das gerações, as frequências de heterozigotos diminuem, reduzindo à metade a cada geração e a frequência de homozigotos aumenta na mesma proporção. Portanto, é necessário enfatizar que a probabilidade de selecionar uma linhagem com todos os alelos favoráveis nas primeiras gerações segregantes é muito pequena,

sobretudo se o caráter for controlado por vários genes. Desse modo, a seleção só é iniciada após a maioria dos locos estarem em homozigose, isto é, a partir da geração F_5 .

Na ausência de seleção, na geração F_∞ , a população derivada de cruzamento biparental será apenas constituída de genótipos homozigóticos com frequência de 50% de cada genótipo para cada loco. Considerando n locos e utilizando esse mesmo raciocínio, pode-se prever a probabilidade de ocorrência de locos em homozigose e heterozigose em uma geração x , por meio da expansão do binômio $(a + b)^n$ (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 2008).

Assim, existem vários procedimentos para conduzir a população segregante até gerações mais avançadas de autofecundação. Entre eles o método de bulk, onde, a partir da F_2 , as plantas são colhidas em conjunto, massalmente e tomada uma amostra de sementes para a obtenção da F_3 . As sementes plantadas em cada geração são uma amostra das sementes colhidas das plantas na geração anterior. O processo se repete por algumas gerações e quando a maioria dos locos está em homozigose o bulk é aberto, ou seja, são colhidas plantas individuais, que darão origem as progênies. Posteriormente, essas progênies são avaliadas em experimentos com repetições, até serem identificadas as melhores linhagens.

Esse método possui algumas vantagens em relação aos demais, uma vez que é menos oneroso. Isso porque na sua condução, antes de as progênies serem avaliadas, o gasto com área experimental e mão de obra é pequeno. Além disso, possui facilidade de condução, não sendo necessárias anotações, nem colheita individual de plantas, a não ser na última geração de condução. Esse método também possui maior flexibilidade, pois o melhorista pode postergar a abertura do "bulk." em safras com grande número de progênies para avaliar, por uma ou mais gerações sem alterar suas propriedades genéticas. Essas vantagens -- comparadas aos demais métodos de condução de população segregante -- tornam

esse método um dos mais vantajosos para o feijoeiro, como observado Raposo, Ramalho e Abreu (2000).

No decorrer das gerações, a população é submetida à seleção natural, onde os genótipos mais competitivos, mais adaptados, aumentam de frequência por apresentarem maior taxa reprodutiva. Devido à atuação da seleção natural neste método, o melhorista deveria escolher cuidadosamente o ambiente, para que a seleção natural possa agir na direção desejável por ele. Por exemplo, uma população segregante para resistência à doença deveria ser conduzida na presença do patógeno a fim de reduzir a produtividade das plantas suscetíveis. Se a seleção natural favorecer um determinado genótipo, a sua frequência irá aumentar. Se, de outra forma, a seleção natural agir contra tal genótipo, ele irá diminuir sua frequência (ALLARD, 1999).

2.2 Seleção natural

A seleção natural é a sobrevivência ou reprodução diferencial de genótipos que diferem em um ou mais caracteres herdáveis e a taxa de variação dos genótipos é particular para cada um.

A seleção natural atua sempre que os genótipos diferem no valor adaptativo. Esse valor adaptativo é avaliado pela taxa de aumento de um genótipo em relação a outros. Estas diferenças genotípicas no sucesso reprodutivo se devem a diferenças na fertilidade e capacidade de sobrevivência. Portanto, o sucesso reprodutivo de um dado genótipo é chamado de adaptabilidade (FUTUYMA, 1986).

A seleção natural atua sobre um genótipo por meio de seu fenótipo. Ela atua em alelos que estão relacionados à adaptabilidade. Se determinado alelo é favorável, então a seleção tende a aumentar a sua proporção, mas se é desfavorável, sua proporção tende a ser reduzida. Assim, em uma população, os

pais contribuem desigualmente, de tal forma que a adaptabilidade desta população seja aumentada. Isso leva à alteração das frequências alélicas e, conseqüentemente, das frequências genotípicas, como observado nos trabalhos de Allard (1999) e Rodrigues e Santos (2006).). A frequência de um alelo pode aumentar em um ambiente e diminuir em outro, dependendo da flutuação das condições locais. Portanto, alguns alelos são favoráveis em alguns ambientes e desfavoráveis em outros (ALLARD; HANSCH, 1964).

A efetividade da seleção natural dependerá do grau de dominância exibido pelo alelo sob ação da seleção e da diferença fenotípica entre os indivíduos. Quanto menor a diferença, menor a taxa de seleção. Para tanto, deve-se também considerar os tipos de interação alélica para se ter ideia da adaptabilidade. A seleção pode atuar contra um determinado alelo, eliminando os indivíduos que o possuem, ou então atuar a seu favor, preservando os indivíduos que os possuem.

Segundo Falconer e Mackay (1996), a força da seleção é expressa pelo coeficiente de seleção (s), que representa a redução (ou aumento) proporcional de gametas contribuídos por determinado genótipo, comparado a um genótipo padrão, que geralmente é mais favorável. A contribuição do genótipo favorável é representado por 1 e a do genótipo desfavorável, por $1-s$. Essa expressão corresponde à adaptabilidade relativa (ω_i) do Genótipo i em relação aos demais. Assim, se o coeficiente de seleção for igual a 0,1 ($s_i=0,1$), a adaptabilidade será de 0,9 ($\omega_i = 0,9$), o que significa que para 100 zigotos produzidos pelo genótipo favorável, 90 serão produzidos pelo genótipo para o qual a seleção atua favoravelmente (FALCONER; MACKAY, 1996).

A seleção pode se mostrar mais ou menos eficiente, dependendo das frequências alélicas iniciais, sendo mais intensa quando a frequência do alelo desfavorável é maior e ineficiente quando sua frequência é muito baixa. A

eficiência também pode ser alterada em função de interações alélicas existentes, bem como com o coeficiente de seleção.

A adaptabilidade média da população ($\bar{\omega}$) pode ser dada como a soma das contribuições relativas dos diferentes genótipos (HEDRICK, 1999). A adaptabilidade média pode ser reduzida, quando alguns indivíduos são eliminados por possuírem alelos desfavoráveis, incapacitando sua sobrevivência ou sua reprodução. A proporção da população eliminada em decorrência de causas genéticas é chamada carga genética e dela resulta a presença de alelos deletérios na população. Em espécies tipicamente autógamas, como o feijão, que possui uma pequena taxa de fecundação cruzada, as mudanças nas frequências alélicas devido à seleção direcional, seja ela natural ou artificial, são geralmente incrementadas (HEDRICK, 1999). A causa desse efeito pode ser mostrada assumindo o equilíbrio das frequências genotípicas pela autofecundação, isto é, ausência de heterozigotos. Nesse exemplo extremo, o efeito da seleção se reduz à seleção gamética e, nesse caso, o diferencial de seleção (Δq) corresponde à diferença entre os dois homozigotos, resultando no dobro do valor da mudança da frequência alélica (Δq), quando comparada ao acasalamento ao acaso (HEDRICK, 1999).

Alguns trabalhos têm mostrado a ação da seleção natural, sobre a produção de grãos, e nestes observa-se que sua atuação é favorável, como, por exemplo, o trabalho realizado por Soliman e Allard (1991). Estes autores investigaram a produção de grãos em uma população composta do cruzamento de cinco cultivares de cevada, sendo que esta população foi submetida à ação da seleção natural, por três gerações, tendo sido observado um aumento acentuado da produção ao longo das gerações, possivelmente devido ao aumento da adaptabilidade.

Outro trabalho mostrando atuação favorável da seleção natural foi o realizado por Corte et al. (2002). Eles avaliaram seis populações obtidas de um

dialélio parcial durante 17 gerações sucessivas e este trabalho mostrou que a seleção natural atuou em todas as populações segregantes, contribuindo para um aumento na média da produção de grãos de 2,5% por geração, sobre a média dos pais.

Em trabalho realizado pelo programa de melhoramento da Universidade Federal de Lavras (UFLA), utilizando-se populações segregantes do feijoeiro submetidas à atuação da seleção natural, também se observou um aumento na produção de grãos ao longo das gerações. Neste trabalho, a partir de três cruzamentos, foram obtidas seis populações segregantes, sendo três conduzidas em ambiente com adubação nitrogenada e três em ambientes sem adubação nitrogenada. Verificou-se a ocorrência de maior produtividade em gerações mais avançadas (F_8), onde a seleção natural teria atuado. Todas as populações foram posteriormente avaliadas em experimentos com repetição e observou-se que a seleção natural atuou selecionando indivíduos mais adaptados para o ambiente particular ao qual foram conduzidos (FURTINI et al., 2009).

Portanto, a seleção natural pode até ser desfavorável para alguns caracteres de interesse agrônomo, como o hábito de crescimento e peso da semente. Porém, para muitos outros, como resistência a doenças e pragas, produção e resistência a fatores abióticos, ela é favorável, permitindo a manutenção de indivíduos mais adaptados ao meio em que estão submetidos. Dessa forma, o melhorista pode utilizar os efeitos da seleção natural para alguns caracteres de difícil avaliação, como, por exemplo, eficiência de uso de algum nutriente do solo.

2.3 Macronutrientes na cultura do feijoeiro

O feijoeiro é uma planta de ciclo curto, exigente em nutrientes, devido ao seu sistema radicular pequeno e pouco profundo. Desta forma, é fundamental

que os nutrientes estejam à disposição da planta em quantidades, tempo e locais adequados para que esta possa expressar seu verdadeiro potencial genético (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Dentre os nutrientes mais exigidos pelo feijoeiro, estão o fósforo (P), nitrogênio (N), potássio (K), que são geralmente empregados em maior proporção, sendo considerados os macronutrientes primários, bem como o enxofre (S), o cálcio (Ca) e o magnésio (Mg), exigidos em menores quantidades, sendo considerados os macronutrientes secundários (VIEIRA, 2006).

Embora haja diferenças na literatura com relação às quantidades de nutrientes absorvidas pelo feijoeiro, Rosalem e Marubayashi (1994), relataram que normalmente a exigência nutricional do feijoeiro é maior que a da soja, por exemplo, e as quantidades médias de nutrientes exportados por 1.000 Kg de grãos são: 35,5 Kg de N, 4,0 Kg de P, 15,3 Kg de K, 3,1Kg de Ca, 2,6 Kg de Mg e 5,4 Kg de S. Vieira (2006) relata que os macronutrientes são, em geral, absorvidos até aos 70 à 80 dias após a emergência do feijoeiro e que a época de maior absorção, ocorre entre 42 e 47 dias para a maioria dos nutrientes, coincidindo com a época do florescimento e formação das vagens. Contudo, para o enxofre, a maior absorção ocorre mais próxima do final do ciclo. O autor relata ainda que o N, P, K, e S acumulam-se principalmente nos grãos, o Ca nas folhas e o Mg nas hastes.

A importância do enxofre no sistema de produção do feijoeiro se relaciona ao seu papel no desenvolvimento de raízes, na fixação biológica de N, e por se tratar de uma leguminosa que apresenta altos teores de proteínas. O enxofre faz parte da constituição dos aminoácidos, cisteína e metionina, e também atua em processos enzimáticos. A deficiência desse mineral resulta em perda do vigor e redução na produção (SOUZA, 2005).

A deficiência em cálcio provoca redução no crescimento, pouca ramificação, as vagens ficam deformadas e murchas, as sementes não se

desenvolvem e ocorre queda precoce das folhas. A deficiência em Mg causa clorose internerval, amarelecimento geral e pontos necrosados, as plantas podem apresentar atrofia, com folhas pequenas, talo rígido, redução na formação de ramos, folhas e flores (SOUZA, 2005). Esses nutrientes são essenciais para a planta. Contudo, a deficiência desses nutrientes não é muito comum e a necessidade de sua aplicação está relacionada à calagem

O fósforo é essencial ao metabolismo das plantas e a sua baixa disponibilidade na fase inicial do ciclo vegetativo pode causar restrições ao seu desenvolvimento, não sendo possível recuperação posterior da planta, mesmo quando se aumenta o suprimento de P a níveis adequados (GRANT et al., 2001). O fósforo tem papel importante na formação de compostos energéticos como ATP da célula, participando diretamente da respiração e fotossíntese das plantas, sendo também de grande importância para leguminosas que apresentam bactérias fixadoras de N₂, que absorvem de forma ativa os nutrientes do solo e sintetizam vários compostos orgânicos (CAMÂRA, 2000).

O fósforo contribui para o desenvolvimento do sistema radicular e de toda a planta, contribuindo assim para um melhor rendimento dos grãos e favorecendo o desenvolvimento de bactérias fixadoras de nitrogênio. A sua deficiência leva à queda acentuada na produção, além do pequeno desenvolvimento da planta, redução na produção de flores e coloração das folhas verde escura (VIEIRA, 2006).

Depois do N, o potássio (K) é o nutriente encontrado em maior quantidade na planta do feijoeiro. Além disso, quase a totalidade do K é absorvida pelo feijoeiro até 40-50 dias após a emergência (ROSALEM, 1996). Porém, resultados em pesquisas conduzidas em épocas diferentes mostram que a resposta a tal fertilizante é pouco frequente no Brasil devido, principalmente, à fertilidade natural do solo, com teores médios e altos de K (SILVEIRA; DAMASCENO, 1993). O potássio tem papel fundamental na ativação

enzimática, translocação de açúcares, abertura e fechamento dos estômatos e regulação osmótica.

Em condições de baixa fertilidade dos solos, ocorre comprometimento no desenvolvimento das plantas, gerando com isso baixa produtividade e até mesmo morte precoce da planta devido à nutrição inadequada (FERREIRA; ANDRADE; ARAÚJO, 2004).

Apesar de elementos como o oxigênio, carbono e hidrogênio serem mais abundantes nas plantas -- em comparação ao nitrogênio -- este faz parte de muitos compostos, como proteínas e ácidos nucléicos presentes nas células vegetais, sendo o macronutriente aniônico mais abundante nas plantas, apresentando uma concentração que varia de 2 a 5% da matéria seca. O nitrogênio pode ser obtido por meio da fixação biológica, ou pode ser absorvido do solo. Inúmeros trabalhos de pesquisa relatam que a fixação biológica realizada no feijoeiro pode resultar em um aporte de 20 a 60 Kg/ha de nitrogênio ao sistema, mas isso vai depender das condições edafoclimáticas. Entretanto, é necessário adubação adicional para se conseguir maior produtividade (FANCELLI; TSUMANUMA, 2007). A absorção do N ocorre principalmente sob a forma de nitrato (NO_3^-) ou amônio (NH_4^+), sendo a primeira forma a mais frequente. Após a absorção, ele é reduzido à amônia e é então incorporado aos aminoácidos (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000). A absorção de nitrogênio ocorre praticamente durante todo o ciclo da cultura, mas a época de maior exigência, quando a velocidade de absorção é máxima, ocorre dos 35 aos 50 dias da emergência da planta, coincidindo com a época do florescimento. Neste período, a planta absorve de 2,0 a 2,5 Kg N/ha.dia (RAIJ, 1991).

O nitrato e os aminoácidos são as principais formas de transporte de N no xilema das plantas superiores. Nas plantas fixadoras de N_2 , como ocorre com o feijão, o transporte do N fixado é feito sob a forma de compostos como a glutamina, uréidos e asparagina. O nitrogênio é redistribuído nas plantas via

floema, sob a forma de aminoácidos e o suprimento insuficiente pelo meio promove a mobilização do N das folhas velhas para os órgãos e folhas mais novas (FAQUIN, 2001). A redução de crescimento e o amarelecimento das folhas mais velhas, que caem prematuramente e as nervuras que se tornam mais destacadas do fundo são algumas das características observadas em plantas submetidas a uma nutrição deficiente em nitrogênio. Essas características são decorrentes da hidrólise das proteínas e do decréscimo no conteúdo de clorofila (ROSALEM; MARUBAYASHI, 1994).

Em diversos sistemas de produção, a disponibilidade de nitrogênio é quase sempre um fator limitante e sua influência no crescimento da planta é maior do que a de qualquer outro nutriente. Isso se deve, principalmente, a sua participação fundamental na formação dos aminoácidos que serão utilizados na formação das proteínas. Estas participam como enzimas nos processos metabólicos das plantas, tendo assim uma função mais funcional do que estrutural. O nitrogênio também é componente essencial dos ácidos nucléicos, membranas, hormônios e moléculas de clorofila, sendo, portanto, fundamental para o desenvolvimento da planta (SALGADO; VIEIRA, 1994).

Pelo fato de o N ser um elemento que se perde facilmente por meio de processos como volatilização, lixiviação e desnitrificação no sistema solo-planta, seu manejo adequado -- visando maximizar a eficiência de seu uso -- é altamente desejável. Para tanto, tem-se buscado reduzir sua perda no solo e melhorar sua absorção pelas plantas (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).). Caso não seja adotado o manejo apropriado, pode ocorrer deficiência de N, o que resulta em plantas com baixa fitomassa e senescência prematura, evidenciada pelo amarelecimento das folhas mais velhas. A eficiência de uso das fontes de N pelas culturas anuais como o feijoeiro é baixa, ao redor de 50%. Uma das causas para esse baixo valor está relacionada à dose e à época de aplicação inadequada (FAGERIA; BALIGAR, 2005).

Cerca de 50% do N total absorvido é exportado pelos grãos e o restante permanece no solo, na forma de resíduos culturais (FAGERIA; BALIGAR, 2005). A baixa recuperação de N é responsável não somente pelo maior custo de produção, mas também pela poluição ambiental (FAGERIA; BALIGAR, 2005). A melhoria da eficiência de uso de N é desejável para aumentar a produtividade, reduzir os custos de produção e manter a qualidade ambiental.

2.4 Fixação biológica de nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) consiste na transformação do N_2 biologicamente inerte em amônia (NH_3). Esse processo é mediado por bactérias especializadas, denominadas rizóbios, que em leguminosas se alojam nos nódulos das raízes, onde realizam a fixação do nitrogênio. A bactéria utiliza os fotoassimilados produzidos pela planta hospedeira e a planta se beneficia do N fixado pelo rizóbio na forma de NH_3 , ocorrendo uma relação mutualística entre bactéria e planta.

Dentre as leguminosas ocorre diferença na fixação de nitrogênio, sendo algumas mais e outras menos eficientes. O feijão comum não possui uma fixação biológica muito eficiente, sendo a fixação menor que sua necessidade. Portanto, são necessárias outras fontes de N para suprir a necessidade da planta. Deve-se considerar que pequenas doses podem ser benéficas a FBN e o excesso de N mineral pode levar à redução da nodulação, uma vez que a nodulação ocorre em função da demanda nutricional e na presença de N mineral estas demandas são reduzidas, não ocorrendo estímulo para nodulação (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; VALADÃO et al., 2009).

Existem estimativas otimistas da fixação de N da ordem de 50 Kg/ha (YAMADA, 1997) e ainda autores que afirmam que a inoculação de estirpes eficientes de *Rhizobium* em cultivar nodulante de feijoeiro pode possibilitar a

não utilização de nitrogênio em cobertura na cultura do feijoeiro, sem afetar a produtividade (FERREIRA; ANDRADE; ARAÚJO, 2004). E no trabalho de Valadão et al. (2009) nota-se que a inoculação de sementes com estirpes de rizóbio proporcionou ao feijoeiro rendimento semelhante ao obtido com a utilização de fertilizantes nitrogenados.

Diversos fatores podem influenciar a eficiência da fixação simbiótica de N, dentre eles a temperatura e acidez do solo, teores de nutriente, diversidade genética da cultivar e do rizóbio (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Isso tem feito com que ocorra uma elevada variabilidade de resposta a nodulação nas diferentes cultivares de feijoeiro, que em alguns casos tem levado ao insucesso da utilização de inóculos nessa cultura no campo como nos trabalhos de Alves (2002) e Silva (2002). Esses resultados levam à constatação de que, embora se tenha obtido avanço no conhecimento dos fatores que afetam a fixação biológica de N, ainda não se tem informações seguras para se realizar a recomendação generalizada de estirpes, cultivares ou inoculação para a cultura do feijoeiro (ROSALEM, 1996).

2.5 Seleção de plantas visando a melhoria da eficiência no uso de N

O nitrogênio, como um elemento essencial na nutrição mineral de plantas, é conhecido por afetar vários caracteres de desenvolvimento e arquitetura das plantas. . O interesse no estudo da eficiência no uso de nitrogênio tem sido grande, devido aos riscos de dano ambiental pela eutrofização dos sistemas aquáticos, aumento no custo da produção de alimentos e também devido ao crescimento populacional mundial que tem aumentado a demanda na produção de alimentos, exigindo uma expansão agrícola para regiões de baixa fertilidade de solo, onde o retorno econômico é insuficiente para justificar o emprego de pesadas doses de fertilizantes. Então, é necessário o

desenvolvimento de uma agricultura altamente produtiva que também preserve a qualidade do meio ambiente (FAGERIA; BALIGAR, 2005).

Desde que uma grande quantidade de fertilizantes seja requerida para o aumento da produção, uma alternativa seria então selecionar cultivares ou genótipos dentro das diversas culturas que apresentam maior capacidade produtiva e com o mínimo de fertilizante nitrogenado, satisfazendo tanto o interesse econômico, quanto o ambiental.

O efeito do nitrogênio nas plantas depende da espécie considerada, bem como dos diferentes genótipos encontrados dentro de uma determinada espécie. O arroz, trigo, milho, cevada e legumes em geral são as mais importantes espécies cultivadas utilizadas na alimentação humana, desta forma a alta produtividade destas culturas são alvos de muitos programas de melhoramento. É, portanto, de grande importância estudar a eficiência no uso do N (EUN), definida como a produtividade de grãos por unidade de N disponível no solo e que pode ser dividida em dois processos: eficiência de absorção e eficiência de utilização do N.

São vários os conceitos de eficiência que podem ser utilizados para EUN, os quais, em geral, se baseiam nos processos pelos quais as plantas adquirem, translocam, acumulam e usam o nutriente para melhor produzirem matéria seca e/ou grãos em condições de baixo ou de alto nível de nutriente. Contudo, o conceito de EUN de uma cultura também deve ser considerado em função da textura do solo, condições climáticas, processos de interação entre solo e bactérias (BURGER; JACKSON, 2004; WALLEY et al., 2002) e as fontes de N, se são orgânicas ou inorgânicas (SCHULTEN; SCHNITZER, 1998).

Tem sido proposta a classificação das cultivares em quatro categorias, dependendo da produção em solos sobre estresse do nutriente e da capacidade em responder a adubação (BLAIR, 1993):

- a) Cultivares eficientes e não responsivas (ENR): São as que apresentam alta produção sob baixos teores do nutriente, não respondendo ao aumento do fornecimento do nutriente;
- b) Cultivares eficientes e responsivas (ER): são as que apresentam alta produção sobre baixos teores do nutriente e respondem positivamente ao aumento do fornecimento do nutriente;
- c) Cultivares ineficientes e responsivas (IR): são as que produzem pouco sob baixos teores do nutriente e respondem positivamente ao aumento do fornecimento do elemento;
- d) Cultivares ineficientes e não responsivas (INR): são aquelas que produzem pouco sob baixos teores do nutriente e não respondem ao aumento no fornecimento do nutriente;

Na maioria das espécies vegetais o ciclo de vida das plantas no que diz respeito à gestão do N pode ser dividida em duas fases. A primeira fase é a vegetativa, onde na planta em desenvolvimento, as raízes e folhas comportam como órgãos de assimilação de N inorgânico e a síntese de aminoácidos provenientes do N absorvido antes da floração é então reduzido por meio da via de assimilação de nitrato. Nesta fase, os aminoácidos formados são mais utilizados para a síntese de enzimas e proteínas envolvidas, principalmente na construção da arquitetura da planta e dos componentes da maquinaria fotossintética. Na segunda fase, geralmente após o florescimento, ocorre a remobilização do N acumulado pela planta e as raízes começam a se comportar como fontes de N, fornecendo aminoácidos que serão exportados para os órgãos reprodutivos e armazenamento, tais como sementes, bulbos ou troncos (HIREL et al., 2007).

Estas fases vão então contribuir para o enchimento de grãos que varia de espécie para espécie e pode ser influenciado pela disponibilidade de N no solo em diferentes períodos de desenvolvimento da planta, pelo calendário de

aplicação do fertilizante nitrogenado e por condições ambientais, como luz e vários fatores bióticos e abióticos (HIREL et al., 2007).

Um dos desafios mais difíceis para os melhoristas é o de obter uma produção mínima e satisfatória sob condições de baixa fertilização, sendo então necessárias pesquisas que expliquem, por exemplo, porque certos genótipos das culturas advindas de determinados locais têm maior capacidade de absorver e utilizar N em condições de baixa fertilização. Isto permitirá a identificação de caracteres morfológicos, fisiológicos e moleculares associados à adaptação a solos com estresse de N (LAFITTE; EDMEARES; TABA, 1997).

Em paralelo, estudos fisiológicos da planta do milho combinados com experimentos de caracteres morfológicos realizados em campo e QTLs permitirão identificar caracteres moleculares e bioquímicos, e componentes da EUN que governam a adaptação em ambientes sob estresse de N antes e depois do enchimento dos grãos em linhagens ou híbridos, exibindo capacidade variável para absorver e utilizar o N (GALLAIS et al., 2006).

O estresse nutricional pode estar relacionado a diversos fatores morfológicos, anatômicos e fisiológicos, como: alteração da razão raiz/ parte aérea; aumento do tamanho, densidade, diâmetro e formação de pêlos do sistema radicular; associação com microorganismos; modificações do micro ambiente na rizosfera; distribuição e remobilização do nutriente na parte aérea, mobilizando de tecidos velhos para tecidos reprodutivos e meristemas; variação na capacidade de absorção e capacidade de manutenção do metabolismo, mesmo em condições de estresse (MARSCHER, 1995).

A nutrição com nitrogênio tem grande influência no desenvolvimento da planta e por isso surgem questões como: quais são os mecanismos de herança da EUN e como os vários eventos metabólicos de assimilação do nitrogênio interagem no desenvolvimento da planta para modular os caracteres complexos

como o crescimento da planta, produção de grãos e arquitetura (DAWSON; MURPHY; JONES, 2008).

A compreensão dos principais mecanismos da herança da EUN ainda não é clara, devido, principalmente, à complexidade inerente da EUN em função das interações genéticas múltiplas e a fatores ambientais (DAWSON; MURPHY; JONES, 2008). Em sua maior parte, os mecanismos genéticos têm sido estudados, considerando-se as características sob seleção que estão voltadas para o aumento da resposta em produtividade das culturas (DAWSON; MURPHY; JONES, 2008; HIREL et al., 2007).

Vários estudos na literatura buscam compreender os eventos metabólicos associados à eficiência no uso de nitrogênio, bem como correlacioná-la a diversos caracteres morfológicos, anatômicos e fisiológicos, cuja finalidade principal é o entendimento da base genética da EUN.

Hirel et al. (2007) associaram funções metabólicas e caracteres agrônômicos e observaram uma correlação alta e positiva entre conteúdo de nitrato, glutamina sintetase, produção e seus componentes. Por outro lado, a atividade da nitrato redutase foi negativamente correlacionada. Os resultados sugerem que o aumento na produtividade nos genótipos de milho deveu-se à habilidade de acumular nitrato em suas folhas durante o crescimento vegetativo e de remobilizar o nitrato acumulado durante o enchimento de grãos.

Em experimento hidropônico e de campo, Diaguo et al. (2006) avaliaram os caracteres do trigo : massa seca, massa seca da raiz, número de perfilhos e total de nitrogênio absorvido pelas plantas. Foi observada correlação positiva desses caracteres entre si e também com a EUN.

Em trabalho com cevada Beatty et al. (2010) também correlacionaram metabolismo com caracteres agrônômicos. Genótipos de cevada foram avaliados em diferentes níveis de nitrogênio e em condições de câmara de crescimento para se determinar os efeitos sobre a absorção de N e a eficiência na

utilização de N. Foram comparados os níveis metabólicos e produção de sementes. Foram selecionadas cultivares com maiores EUN durante anos, em diferentes níveis de N. Observou-se que genótipos de alta EUN em ambiente sob estresse predominaram em eficiência de utilização com relação à eficiência de absorção. No experimento realizado em hidroponia, o metabolismo de N foi associado a níveis de aminoácidos que foram diferentes entre raízes e brotos. Em campo, observou-se diferença nos níveis de metabólitos das mesmas cultivares em alto e baixo nível de N.

Em vários trabalhos também pode ser observada a redução na EUN com o aumento da oferta de N e esta redução pode estar relacionada à eficiência na absorção, eficiência na utilização e eficiência na retenção do N (DAWSON; MURPHY; JONES, 2008). Estudos com trigo e gramíneas perenes mostraram redução em todos esses componentes (HUGGINS; PAN, 2003).

Ortiz-Monasterio et al. (1997) verificaram que em todas as variedades de trigo avaliadas, tanto a eficiência na absorção quanto na translocação para utilização foram reduzidas em maiores suprimentos de Nitrogênio causando uma grande redução na EUN.

Morris e Pausen (1985) demonstraram redução na eficiência de translocação de N em ambientes com alto suprimento de N, quando comparado ao baixo suprimento em estudos com a cultura do trigo.

Huggins e Pan (2003) mostraram que houve um ligeiro aumento na absorção de N disponível em alto nível, mas houve queda severa na retenção de N no solo, resultando em redução líquida da EUN.

Todos esses trabalhos mostram que ocorre uma adaptação das diferentes culturas às condições de estresse de N, tornando-as mais eficientes na absorção, utilização e retenção do N nessas condições.

2.6 Resposta diferencial do feijoeiro à adubação nitrogenada

A cultura do feijão tem mostrado resposta positiva à aplicação de nitrogênio, sendo que de um total de 80 experimentos em campo com a cultura, conduzidos em cerca de 30 municípios de Minas Gerais, 64 % dos experimentos responderam à aplicação do nitrogênio (VIEIRA, 2006). Isso está relacionado ao aumento da expectativa de produção, propiciado pela evolução das cultivares e das técnicas de cultivo.

No trabalho de Furtini et al. (2006), foi observado que somente algumas linhagens responderam de forma positiva a adubação nitrogenada, o que evidenciou a possibilidade de se identificar linhagens eficientes no uso de nitrogênio em cobertura, bem como identificar linhagens que respondam ao nutriente aplicado. Foram avaliadas 100 linhagens, dentre elas, 23 responderam a aplicação do nitrogênio, sendo que 22 tiveram resposta positiva. Ocorreu ampla variação da produtividade, com eficiência variando de 11,3 a 18,3 Kg/ha.

Procurando entender o comportamento diferencial das linhagens de feijão em relação à eficiência na utilização do nitrogênio (EUN), Lago et al. (2009) utilizaram linhagens mais divergentes com relação à EUN do estudo de Furtini et al. (2006). Os autores associaram os teores de N-total e frações nitrogenadas das folhas (N-nítrico, N-insolúvel e N-solúvel) e a EUN. Houve indicação de que, para algumas linhagens, as frações de N e N-total nas folhas poderiam explicar a maior EUN.

Furtini et al. (2009) obtiveram populações segregantes a partir de cruzamentos entre cultivares tolerantes e responsivas. Estas populações foram estudadas para verificar a eficiência de utilização de nitrogênio e a direção da seleção natural em ambientes com e sem adubação nitrogenada. As populações avançadas em cada ambiente foram avaliadas nos dois ambientes. Foram identificadas populações com maior produtividade média em cada nível de N e

as populações obtidas a partir do cruzamento IAPAR-81 x VC-5 apresentaram maior produtividade média, independentemente da origem e do nível de nitrogênio. Verificou-se também que populações avançadas no ambiente sem nitrogênio apresentaram maior produtividade média em ambientes sem nitrogênio, sendo possível selecionar populações com maior eficiência no uso de nitrogênio.

Santos e Fageria (2007) associaram a resposta e eficiência do uso de N pelo feijoeiro ao manejo do fertilizante nitrogenado em solo de várzea. Observou-se que a aplicação do N no sulco de semeadura causou efeito salino do fertilizante, reduzindo a população do feijoeiro e mostrou maior eficácia quando o N é aplicado em sulcos distintos da linha de semeadura e 15 dias após a emergência. Observou-se também que houve diversidade na EUN entre as cultivares avaliadas e que a produtividade de grãos está positivamente relacionada à recuperação e utilização de N e ambas diferem conforme o manejo do fertilizante empregado.

Como a identificação de genótipos favoráveis demanda intensa experimentação nas condições de uso da cultura, há a possibilidade de se identificar algumas regiões genômicas relacionadas à EUN com marcadores de DNA, como os baseados na PCR (Polymerase Chain Reaction).

2.7 Reação da polimerase em cadeia (PCR)

A tecnologia PCR (Polymerase Chain Reaction) foi concebida por Mullis em meados da década de 80 (MULLIS; FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1985). A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade de PCR tornam a técnica particularmente poderosa para estudos genético-moleculares, mesmo envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo.

Essa técnica permite amplificar pequenos e específicos fragmentos do

genoma, permitindo a obtenção, *in vitro*, de várias cópias de determinada região do DNA. Como a reação de PCR é específica, pode-se obter a amplificação de sequências de nucleotídeos-alvo mesmo em uma amostra com grande diversidade de sequências, permitindo a detecção de organismos específicos em misturas heterogêneas.

Durante a PCR, ocorre a replicação do DNA *in vitro*, processada em três etapas: a desnaturação, o anelamento e a extensão, que se distinguem por diferentes temperaturas, constituindo um ciclo. Na desnaturação, ocorre a separação das cadeias complementares de uma molécula de DNA a 95°C. No anelamento, ocorre a hibridização dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) em seus sítios complementares e em temperatura apropriada. A extensão ocorre na temperatura ótima de ação da DNA polimerase, que é de aproximadamente 72°C. O número de ciclos varia de 25 a 40 (SALKI et al., 1985).

Os primers são pequenas moléculas de DNA de cadeia simples que delimitam a sequência de DNA de fita dupla, alvo de amplificação (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Esses primers são sintetizados artificialmente, de maneira que suas sequências de nucleotídeos venham a complementar e permitir amplificar as sequências específicas flanqueadas pelo par de primers (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Adicionalmente, quando o primer obtido é de sequência aleatória, como no RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), há a possibilidade de se amplificar um conjunto de fragmentos do genoma que constituem uma amostra do mesmo.

Grande parte das técnicas moleculares hoje utilizadas apropria-se da PCR ou de suas variações para os mais diversos estudos moleculares.

2.8 Marcadores microssatélites ou de sequências repetitivas

Diferentes experimentos realizados na década de 80 demonstraram que grande parte do genoma de eucariontes é constituída por diferentes classes de sequências repetitivas de DNA. O DNA repetitivo é constituído por sequências altamente repetitivas (DNA satélite), sequências moderadamente repetitivas (DNA microssatélites e minissatélites) e DNA móvel e de sequências dispersas (os elementos transponíveis, DNA moderadamente repetitivo também).

O DNA microssatélite ou sequências simples repetidas (SSR) consiste de sequências repetidas em fila, geralmente de um a seis nucleotídeos, ocupando uma extensão de até 100 pares de bases. Essas sequências são encontradas em diversos organismos, tanto em seres eucariontes quanto procariontes e são distribuídas por todo o genoma, flanqueadas por sequências altamente conservadas. Nas plantas, os sítios são distribuídos com uma frequência de um a cada 50 mil pares de bases (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). As sequências de microssatélite ocorrem tanto em regiões que codificam quanto naquelas que não codificam, porém suas frequências são maiores nas regiões que codificam.

Os microssatélites são originados a partir do pareamento desalinhado de sequências repetidas durante a replicação do DNA e pela permuta desigual, com isso ocorre então a produção de números variados de unidades repetidas, de forma que fragmentos de microssatélites assumem comprimentos diferentes. Cada um desses fragmentos de um dado loco é equivalente a um alelo de determinado gene e pode ser analisado por PCR, usando pares de primers que flanqueiam essa região. Assim tornam os microssatélites (SSR) um dos tipos de marcadores com maior variabilidade alélica e altamente polimórfico.

A detecção das sequências de microssatélites amplificadas é feita em gel de poliacrilamida ou agarose de alta resolução e separados por eletroforese. A

utilização de géis adequados é indispensável para a eficiência no trabalho realizado com SSR a fim de que ocorra perfeita separação dos fragmentos de DNA, pois esses diferem em poucos pares de bases, dependendo do número de nucleotídeos repetidos. Entre as classes de marcadores existentes, o SSR é o que mais se aproxima do marcador ideal para o estudo de genética de populações (RAFALSKI; TINGEY; WILLIAMS, 1991). Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), os locos simples dos marcadores de microssatélites são caracterizados por sua hipervariabilidade, abundância e uniformidade, pois são distribuídos ao longo de todo genoma, permitindo a cobertura completa dos cromossomos de uma determinada espécie; reprodutibilidade que permite intercâmbio entre diferentes grupos de pesquisa, facilitando a seleção assistida; são do tipo co-dominante, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados; multialélicos e de grande conteúdo informativo, uma vez que cada segmento amplificado é de tamanho diferente, representando um alelo do mesmo loco e herança Mendeliana. Assim, são considerados ideais para a identificação e discriminação de genótipos e para estudos de populações.

As maiores vantagens dos SSR é que as sequências amplificadas são altamente estáveis e ideais para o uso de PCR. Ao longo de todo o genoma, a sua distribuição possibilita que um ou mais locos sejam identificados próximos ou mesmo dentro de genes de interesse, constituindo-se em um marcador ideal.

A maior limitação do uso de microssatélites é a identificação dos primers, pois se trata de um procedimento muito trabalhoso, que exige equipe especializada, além de equipamentos para sequenciamento, tornando o desenvolvimento dos marcadores SSR um processo de elevado custo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Entretanto, para muitas espécies mais estudadas já estão disponíveis as sequências para várias centenas ou milhares de primers e inclusive para o feijão (BEAN IMPROVEMENT COOPERATIVE - BIC, 2007).

2.9 Identificação de QTLs

Com o advento dos marcadores moleculares, tornou-se possível mapear e caracterizar os caracteres quantitativos, tanto em populações naturais quanto em populações experimentais. A grande aplicabilidade dos marcadores moleculares se deve principalmente a neutralidade fenotípica, abundância e nível de polimorfismo.

A vantagem da neutralidade fenotípica se deve aos alelos alternativos nos locos marcados não sofrerem influência direta do ambiente, o que não apenas torna mais fácil detectar ligação em marcadores segregantes e poligenes, mas também fornece uma maneira imparcial para estimar o efeito fenotípico. A abundância de marcadores permite que todo genoma seja marcado, sendo teoricamente possível detectar e caracterizar todos os poligenes que afetam um caráter quantitativo. Em uma população, o nível de polimorfismo depende, evidentemente, da sua diversidade genética e do número de primers, no caso do marcador SSR.

A capacidade de detectar poligenes depende do desequilíbrio de ligação. E quanto maior esse desequilíbrio, maior será a ligação física dos locos e maior a capacidade de se mapear e caracterizar poligenes. Esse desequilíbrio é maior em populações segregantes F_2 , F_3 ou de retrocruzamentos. Em populações endogâmicas, o desequilíbrio é menor devido à maior possibilidade de recombinações meióticas (BURR; BURR, 1991). Bearzoti (2000) comenta que, em espécies autógamas, o desequilíbrio de ligação se dissipa em uma taxa mais lenta e apresenta um limite diferente de zero. Para linhagens recombinantes, apesar de o desequilíbrio de ligação ser menor, elas possuem a vantagem de poderem ser multiplicadas e retestadas com maior acurácia para as características quantitativas.

A primeira análise empregada na associação marcador molecular/caráter quantitativo foi a análise por marca simples ou análise por pontos. Essa análise é realizada para cada marcador separadamente. As desvantagens desta análise é que, normalmente, subestima-se a magnitude do efeito do QTL detectado, devido à recombinação do loco marcador e o QTL e também ao devido efeito de confundimento entre distância genética e magnitude do efeito do QTL, resultando na localização imprecisa do QTL (VIEIRA et al., 2006).

Entre as metodologias que consideram marcas individuais, destacam-se os métodos da regressão múltipla e o da máxima verossimilhança, que permite a estimação de a e d , além de ser assintoticamente não tendenciosa (BEARZOTI, 2000). É importante considerar que as variáveis avaliadas guardam certa redundância entre si. Por essa razão, são usados os métodos de seleção de variáveis *backward*, *forward* e *stepwise*, para que um modelo seja buscado até que se obtenha aquele em que sejam incluídas todas as variáveis significativas pelo teste de t (BEARZOTI, 2000). Um dos problemas das análises de regressão linear é a detecção de falsos QTLs. Esse problema pode ser minimizado aumentando-se o nível de significância o que reduz o poder de detecção.

2.10 Problemas na detecção de QTLs

Na maioria dos estudos realizados até hoje, nota-se que a grande maioria dos QTLs identificados é de efeito menor, o que é fácil perceber, já que grande parte dos genes em uma população pode afetar os caracteres quantitativos.

As estimativas dos efeitos dos QTLs são frequentemente inconsistentes e estas inconsistências têm forçado os melhoristas a focar em QTLs de maior efeito, que são mais consistentes, ou a desenvolver estratégias de melhoramento que contornem essa inconsistência como mapeamento de QTLs, realizado

independentemente dentro das varias populações F_2 (BERNARDO, 2008). As razões para essa inconsistência na estimativa dos QTLs incluem:

i- diferentes QTLs segregando em diferentes populações mapeadas; ii-interação QTLs x ambientes; iii- interações epistáticas entre QTLs; iv- Super estimativa do efeito e subestimativa do número de QTLs em função do tamanho populacional geralmente pequeno. É esperado detectar diferentes QTLs em diferentes populações de mapeamento, considerando que os QTLs podem estar segregando em algumas populações e não em outras, já que os diferentes germoplasmas podem ter diferentes alelos de QTLs nas diferentes populações.

Diferenças na segregação dos QTLs não seria um problema se o alelo original fosse identificado em uma fonte específica de germoplasma e esta fonte fosse utilizada como um parental comum. Por exemplo, em um trabalho populacional com milho, a linhagem Sumai três, que possuía o alelo Fhb1 de resistência à *Giberela fusarium*, foi cruzada com uma série de linhagens suscetíveis ao *Fusarium giberela*. O loco Fhb1 segregou em diferentes cruzamentos, porque o gene de resistência Fhb1 foi encontrado exclusivamente em sumai três (PUMPHREY; BERNARDO; ANDERSON, 2007). Contudo, esta situação é pouco provável, já que para a grande maioria dos caracteres, os pais não são muito divergentes e um único pai não possui o monopólio dos alelos favoráveis em muitos locos de associados à QTLs, como ocorre na produção de grãos em linhagens elites (BERNARDO, 2008).

Quando se obtêm um alelo de QTL favorável, vindo de um doador parental, o efeito do QTL introgridido pode variar, devido à ocorrência de epistasia, ou seja, interações genéticas entre QTLs, que podem aparecer nas progênies devido a genes epistáticos advindos de um segundo parental (BLANC et al., 2006). Pumphrey, Bernardo e Anderson (2007), observaram que o alelo de resistência à *Giberela fusarium*, Fhb1, introgrididos em 13 progênies teve o efeito de resistência esperado em 12 progênies. No entanto, observou-se efeito

negativo em uma progênie. Este efeito negativo pode ter ocorrido devido à interações desfavoráveis entre o alelo *Fhb1* e algum gene desconhecido na linhagem receptora.

Blanc et al. (2006), avaliaram a produção de grãos de seis populações F_2 de milho com 150 famílias cada, obtidas a partir do cruzamento entre quatro linhagens e detectaram muitas interações epistáticas. Estas interações foram de 8% para umidade de grão, de 9% para dados de espiga e de 42% para produção de grãos. Sendo a produção de grãos o mais complexo destes caracteres, estes resultados sugerem que as interações genéticas entre QTLs são mais importantes para caracteres controlados por um maior número de QTLs de efeitos menores (BERNARDO, 2008).

Sabendo que um dos princípios da genética quantitativa é o de que genes que afetam características complexas estão sujeitos à interação genótipo x ambiente, espera-se, então, a interação QTLs x ambiente. Isso corresponde à expressão diferencial dos QTLs em relação às mudanças ambientais e essa interação pode ocorrer de três maneiras: (i) um QTL pode se expressar em um ambiente e não em outro; (ii) um QTL pode se expressar fortemente em um ambiente e de forma mais fraca em outro; (iii) um QTL pode se expressar de forma muito diferenciada em certos ambientes ou mesmo apresentar efeitos opostos em outros (VIEIRA, 2006). As plantas -- especialmente as autógamas e de propagação vegetativa -- tendem a evidenciar um alto grau de interação genótipo x ambiente, o que permite uma maior adaptação delas às variações ambientais e também a manutenção das variações genéticas nas suas populações (JAIN; MARSHAL, 1967). A interação G x E reduz a associação entre os valores fenotípicos e genotípicos e leva a distintos níveis de significância do efeito do QTL em diferentes ambientes.

A Interação genótipo x ambiente tem se mostrado significativa em muitos estudos. Como, por exemplo, no estudo realizado por Kerns et al.(1999)

com a cultura do milho, no qual encontraram evidências de interação QTLs x ambientes em 11 marcadores associados à ferrugem do milho, enquanto seis marcadores não apresentaram uma associação significativa com os três ambientes avaliados. Em um estudo de mapeamento de QTLs para a avaliação da produção de grãos, da umidade do grão, do peso de espiga, da concentração protéica e da altura da planta em uma população de 344 indivíduos em milho, Melchinger et al. (1998) identificaram um total de 107 QTLs. A interação entre QTLs x ambientes significantes foi observada em cerca de um terço destes QTLs.

Em um estudo com arroz, Xing et al.(2002) realizaram um mapeamento genético cujo objetivo era identificar QTLs e determinar a interação entre eles e o ambiente e a interação QTLs x QTLs. Neste estudo, foram utilizadas 240 linhagens endogâmicas recombinantes oriundas do cruzamento das cultivares Zhenshan 97 e Minghui 63. Os experimentos foram conduzidos em dois anos. Por meio de análises com marcadores RFLP e SSR, foram detectados cinco QTL para caracteres de produtividade da planta, dos quais dois foram detectados nos dois anos. Para panículas férteis por planta, foram detectados seis QTLs, dos quais apenas um foi detectado nos dois anos. Para número de grãos por panícula, foram detectados cinco QTLs, dos quais três foram identificados nos dois ambientes. Para peso de 1000 grãos, foram detectados nove QTLs, dos quais quatro foram identificados nos dois anos. Estes dados mostraram intensa interação QTLs x anos.

Vários estudos realizados para a cultura do feijoeiro também têm mostrado significativa interação QTL x ambiente. Em seu trabalho com feijão, Pereira et al. (2008) observaram que os QTLs identificados apresentaram diferentes intensidades nas diferentes safras e nas duas populações avaliadas e que aqueles QTLs identificados em uma população não tiveram R^2 significativo para a outra população. Resultados semelhantes foram obtidos por Bento (2006),

que trabalhou com milho tropical e mapeou 24 QTLs, sendo que todos eles sofreram interação com o ambiente. Assim como nos trabalhos de Torga et al. (2010), Rodrigues et al. (2006) e Teixeira et al. (2004).

A interação QTLs x ambientes também tem sido observada em trabalhos relacionados à eficiência do uso de N, como nos estudos realizados com trigo por Le goes et al.(2008) e Maccaferri et al. (2008).

Os resultados do mapeamento de QTLs podem ainda diferir devido ao efeito Beavis, diferenças ocorridas devido ao tamanho populacional. Beavis (1994) utilizou dados de simulação e também dados obtidos de 400 famílias de milho derivadas do cruzamento entre as cultivares B73 x Mo17 para determinar o efeito de uma população pequena no poder da detecção de QTLs e a acurácia dos efeitos dos QTLs estimados. Com base nas médias das famílias através do ambiente, QTLs foram avaliados na população inteira, com as 400 famílias e também foram avaliados quatro subconjuntos, cada um com 100 famílias; as famílias foram divididas de forma aleatória. Um total de quatro QTLs foi detectado para a população de tamanho de 400. Em contraste, apenas um dos três QTLs foi detectado em cada um dos subconjuntos de 100 famílias. O R^2 estimado para a população de 400 foi de 8% e com 100 famílias o R^2 foi de 8% para 23%. Na simulação, Beavis (1994) considerou populações com 100, 500 e 1000 famílias e mostrou que a população com 1000 famílias apresentou efeitos de QTLs mais próximo do real. Populações pequenas levam a um menor número de QTLs identificados e os QTLs identificados foram superestimados.

2.11 QTLs para eficiência no uso do nitrogênio

Os marcadores moleculares também podem ser uma ferramenta importante para auxiliar na seleção de genótipos eficientes no uso de nitrogênio e vários estudos têm sido realizados para a detecção de genes candidatos, que podem, ao menos parcialmente, explicar a variação na eficiência no uso de nitrogênio como o observado para culturas como milho (AGRAMA et al., 1999; GALLAIS; HIREL, 2004; HIREL et al., 2001), trigo (DIAGUO et al., 2006; LE GOUIS et al., 2008; MACCAFERRI et al., 2008; QUARRIE et al., 2005) e soja (SANTOS; NICOLAS; HUNGRIA, 2006).

Hirel et al. (2001), estudaram a base genética da eficiência do uso de nitrogênio em milho. Através do uso de marcadores moleculares, foram selecionados QTLs associados à produção, à glutamina sintetase, conteúdo de nitrato e nitrato redutase. Locos avaliados apresentaram coincidência, o que pode ser devido a sua correção. Esses locos representam elementos chave para o controle do uso de nitrogênio.

Objetivando identificar regiões cromossômicas no trigo que controlam a eficiência no uso de nitrogênio, Le Gouis et al. (2008) avaliaram uma população de linhagens diplóides obtidas do cruzamento de duas cultivares: uma tolerante à deficiência no uso do nitrogênio (Arche) e outra sensível (Récital). As populações obtidas foram avaliadas em três anos com relação ao metabolismo da glutamina sintetase e glutamato desidrogenase. Foram detectados 18 QTLs localizados em 13 cromossomos para a atividade da glutamato desidrogenase e 15 QTLs localizados em 12 cromossomos para atividade da glutamina sintetase. Vários QTLs foram detectados em apenas um dos anos, evidenciando a grande interação QTLs x ambientes, mas quatro QTLs para glutamato desidrogenase e três para glutamina sintetase foram detectados pelo menos em dois anos. Os QTLs identificados foram comparados aos QTLs previamente detectados para

caracteres agronômicos de produção e seus componentes e 14 dos 18 QTLs identificados para glutamato desidrogenase e sete dos 15 identificados para glutamina sintetase foram comuns. Esse estudo identificou então possíveis QTLs candidatos envolvidos no controle da produção de grãos em relação à eficiência do uso do nitrogênio para trigo e confirmou que há uma variabilidade genética para produção de grãos em baixo nível de N.

Quarrie et al. (2005) constataram que QTLs específicos para produção de trigo foram detectados em condições de baixa fertilização com N e sugere ser possível melhorar a estabilidade de produção, combinando QTLs relacionados à produtividade que estão expressos em ambientes com baixa fertilização com N.

Outros estudos que relacionam a produção de grãos e caracteres relacionados à eficiência no uso de nitrogênio foram realizados por Agrama et al. (1999), Maccaferri et al. (2008) e Diago et al. (2006).

Agrama et al. (1999) estudaram populações de milho obtidas do cruzamento de cultivares contrastantes para eficiência no uso de nitrogênio. Foram utilizadas famílias $F_{2,3}$, conduzidas em ambientes com alta concentração de nitrogênio e em ambientes com baixa concentração de nitrogênio. Dentre outros caracteres, foram analisados a altura da planta, a produtividade de grãos, o número de espigas por planta. Foram genotipados 99 fragmentos de restrição obtidos por marcadores do tipo RFLP e utilizados para o desenvolvimento de um mapa de ligação utilizado para identificar QTLs. Entre dois e seis locos foram associados a cada característica e as correspondências de varias regiões genômicas associadas aos caracteres medidos sobre concentrações limitadas de nitrogênio sugerem a presença de QTLs associados à eficiência de uso do nitrogênio.

Maccaferri et al. (2008) estudaram uma população de 181 linhagens recombinantes de trigo derivada do cruzamento Meridiano x Claudio que foi avaliada em cinco ambientes, variando o regime de água e oferta de N. Foram

avaliados os caracteres tempo de maturação, altura da planta, produção de grãos, número de espigas/m², número de grãos/m² e peso de grãos. Foi observada maior média na produção em ambiente com fertilização normal de N. Nenhum QTL para o ambiente com fertilização de N normal foi observado. Todavia, observou-se $R^2= 24,1\%$, considerando alguns marcadores em condições de baixa disponibilidade de N. Nesse estudo, foram observados QTLs mais explicativos para condições de baixa ($R^2=62,2\%$) e alta irrigação ($R^2= 55,7\%$).

Também trabalhando com trigo em ensaios de campo, Diaguo et al. (2006) detectaram nove QTLs em baixo nível de nitrogênio e oito em alto nível de adubação nitrogenada relacionados à eficiência do uso de nitrogênio. QTLs também foram observados para características de alta correlação com EUN avaliadas em sistemas hidropônicos.

Para leguminosas existem poucos trabalhos relacionados à detecção de QTLs para eficiência no uso de N. Existem alguns estudos para caracterização de estirpes fixadoras, detecção de organismos específicos nos extratos de solo (REIS JÚNIOR et al., 2002), bem como na identificação de QTL associados à simbiose (SANTOS; NICOLAS; HUNGRIA, 2006).

No estudo realizado por Santos, Nicolas e Hungria (2006), visando detectar QTLs relacionados à fixação biológica, foram estudadas duas populações de soja obtidas de cultivares com diferentes capacidades de fixação biológica. Os QTLs detectados para soja foram de efeitos menores: seis marcadores microsatélites, relacionados à nodulação e detectados nas duas populações estudadas, podem ser utilizados no melhoramento, visando a um incremento na contribuição da fixação biológica.

Gallais e Hirel (2004) verificaram que a maioria das regiões cromossômicas relacionadas a caracteres de desenvolvimento vegetativo, produção, composição dos grãos e características relacionadas à EUN detectadas em baixo nível de nitrogênio correspondiam a locos com características

quantitativas (QTLs) detectados sob alto nível de nitrogênio. Já no estudo de Agrama et al. (1999), a maioria dos QTLs associados à eficiência do uso de nitrogênio foi identificada em ambiente sob baixo nível de N.

REFERÊNCIAS

AGRAMA, H. A. S. et al. Identification of quantitative trait loci for nitrogen use efficiency in maize. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 5, n. 2, p. 187-195, May 1999.

ALLARD, R. W. **Principles of plant breeding**. 2. ed. New York: J. Wiley, 1999. 254 p.

ALLARD, R. W.; HANSCHKE, P. E. Some parameters of population variability and their implications in plant breeding. **Advances in Agronomy**, New York, v. 16, p. 281-325, 1964.

ALVES, V. G. **Resposta do feijoeiro a doses de nitrogênio no plantio e cobertura e à inoculação de sementes com rizóbio**. 2002. 46 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

BEAN IMPROVEMENT COOPERATIVE. **Genetics**: bean SSR primers. East Lansing, 2007. Disponível em: <<http://www.css.msu.edu/bic>>. Acesso em: 2 mar. 2010.

BEARZOTI, E. Mapeamento de QTL. In: JORNADA EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2000, Goiânia. **Anais...** Goiânia: UFG, 2000. p. 232.

BEATTY, P. H. et al. Nitrogen use efficiencies of spring barley grown under varying nitrogen conditions in the field and growth chamber. **Annals of Botany**, London, v. 105, n. 3, p. 1171-1182, Mar. 2010.

BEAVIS, W. D. **The power and deceit of QTL experiments**: lessons from comparative QTL studies. Washington: American Seed Trade Association, 1994. 266 p.

BENTO, D. A. V. **Mapeamento de QTL para produção de grãos e seus componentes em uma população de milho tropical**. 2006. 133 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2006.

BERNARDO, R. Molecular markers and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years. **Crop Science**, Madison, v. 48, n. 5, p. 1649-1664, Sept./Oct. 2008.

BLAIR, G. J. Nutrient efficiency: what do we really mean. In: RANDALL, P. J. et al. **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1993. p. 205-213.

BLANC, G. A. et al. Connected populations for detecting quantitative trait loci and testing for epistasis: an application in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 113, n. 2, p. 206-224, July 2006.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 547 p.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Estádios fenológicos do trigo para a adubação nitrogenada em cobertura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 317-323, mar./abr. 2001.

BURGER, M.; JACKSON, L. E. Plant and microbial nitrogen use and turnover: rapid conversion of nitrate to ammonium in soil with roots. **Plant and Soil**, The Hague, v. 266, n. 1/2, p. 289-301, Jan. 2004.

BURR, B.; BURR, F. A. Recombinant inbreds for molecular mapping in maize: theoretical and practical considerations. **Trends in Genetics**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 55-60, Feb. 1991.

CÂMARA, G. M. S. **Nitrogênio e produtividade da soja**. Piracicaba: ESALQ/LPU, 2000. 22 p.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.

CORTE, H. R. et al. Natural selection for grain yield in dry bean populations bred by the bulk method. **Euphytica**, Dordrecht, v. 123, n. 3, p. 387-393, Feb. 2002.

DAWSON, J. C.; MURPHY, K. M.; JONES, S. S. Decentralized selection and participatory approaches in plant breeding for low-input systems. **Euphytica**, Dordrecht, v. 160, n. 2, p. 143-154, Mar. 2008.

DIAGUO, A. et al. Mapping QTLs for nitrogen uptake in relation to the early growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 284, n. 1/2, p. 73-84, Nov. 2006.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. Enhancing nitrogen use efficiency in crop plants. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 88, n. 11, p. 97-185, Nov. 2005.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4. ed. Essex: Longman, 1996. 464 p.

FANCELLI, A. L.; TSUMANUMA, G. M. Nitrogênio e enxofre nas culturas de milho e feijão. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S.; VITTI, G. C. **Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira**. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute, 2007. p. 445-482.

FAQUIN, V. **Nutrição mineral de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 182p.

FERREIRA, A. C. B.; ANDRADE, M. J. B.; ARAÚJO, G. A. A. Nutrição e adubação do feijoeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 25, n. 223, p. 61-72, 2004.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 220 p.

FURTINI, I. V. et al. Natural selection for nitrogen use efficiency in common bean population. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Washington, v. 52, p. 130-131, 2009.

_____. Resposta diferencial de linhagens de feijoeiro ao nitrogênio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1696-1700, nov./dez. 2006.

FUTUYMA, D. J. **Evolutionary biology**. 2. ed. Washington: Sinauer Associates, 1986. 631 p.

GALLAIS, A. et al. Modelling post-silking N-fluxes in maize using ¹⁵N-labelling field experiments. **New Phytologist**, Cambridge, v. 172, n. 4, p. 696-707, Dec. 2006.

GALLAIS, A.; HIREL, B. An approach of the genetics of nitrogen use efficiency in maize. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 1, p. 295-306, Feb. 2004.

GRANT, C. A. et al. A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 95, p. 1-11, set. 2001.

HEDRICK, P. W. **Genetics of populations**. 2. ed. Sudbury: J. Bartlett, 1999. 553 p.

HIREL, B. et al. Challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: toward a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 9, p. 2369-2387, Sept. 2007.

_____. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. **Plant Physiology**, Washington, v. 125, n. 3, p. 1258-1270, Mar. 2001.

HUGGINS, D. R.; PAN, W. L. Key indicators for assessing nitrogen use efficiency in cereal-based agroecosystems. **Journal of Crop Production**, New Jersey, v. 8, n. 1/2, p. 157-186, Jan. 2003.

JAIN, S. K.; MARSHALL, D. R. Population studies in predominantly selfpollinated species: X., variation in natural populations of *Avena fatua* and *A. barbata*. **American Naturalist**, Chicago, v. 101, p. 19-33, 1967.

KERNS, M. R. et al. QTL for resistance to common rust and smut in maize. **Maydica**, Bergamo, v. 44, n. 1, p. 37-45, 1999.

LAFFITE, H. R.; EDMEADES, G. O.; TABA, S. Adaptative strategies identified among tropical maize landraces for nitrogen-limiting environments. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 49, n. 2/3, p. 187-204, Feb. 1997.

LAGO, F. J. et al. Frações nitrogenadas e eficiência nutricional em linhagens de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 440-447, mar./abr. 2009.

LE GOUIS, J. L. et al. Genetic analysis of wheat nitrogen use efficiency: coincidence between QTL for agronomical and physiological traits. In: INTERNATIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM, 11., 2008, Sydney. **Proceedings...** Sydney: Sydney's University, 2008. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/2123/3217>>. Acesso em: 10 mar. 2010.

LEITE, M. E. **Efeito da seleção natural em alelos microssatélite do feijoeiro**. 2008. 50 p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

MACCAFERRI, M. et al. QTLs for yield and adaptation to reduced water and nitrogen inputs in durum wheat. In: INTERNATIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM, 11., 2008, Sydney. **Proceedings...** Sydney: Sydney's University, 2008. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/2123/3356>>. Acesso em: 20 mar. 2010.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. San Diego: Academic, 1995. 889 p.

MELCHINGER, A. E.; UTZ, H. F.; SCHÖN, C. C. Quantitative trait locus (QTL) mapping using different testers and independent population samples in maize reveals low power of QTL detection and large bias in estimates of QTL effects. **Genetics**, Bethesda, v. 149, n. 1, p. 383-403, May 1998.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 626 p.

MORRIS, C. F.; PAULSEN, G. M. Development of hard winter wheat after anthesis as affected by nitrogen nutrition. **Crop Science**, Madison, v. 25, n. 6, p. 1007-1010, Nov./Dec. 1985.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific Synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzimology**, Oxford, v. 155, n. 1, p. 335-350, 1987.

ORTIZ-MONASTERIO, J. I. et al. Genetic progress in wheat yield and nitrogen use efficiency under four nitrogen rates. **Crop Science**, Madison, v. 37, n. 3, p. 898-904, May/June 1997.

PEREIRA, H. S. et al. Informações fenotípicas e marcadores microssatélites de QTL na escolha de populações segregantes de feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 5, p. 707-713, maio 2007.

PUMPHREY, M. O.; BERNARDO, R.; ANDERSON, J. A. Validating the *Fhb1* QTL for Fusarium head blight resistance in near-isogenic wheat lines developed from breeding populations. **Crop Science**, Madison, v. 47, n. 1, p. 200-206, Jan./Feb. 2007.

QUARRIE, S. A. et al. A high-density genetic map of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) from the cross Chinese Spring_SQ1 and its use to compare QTLs for grain yield across a range of environments. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 110, n. 5, p. 865-880, Mar. 2005.

RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V.; WILLIAMS, J. G. K. RAPD markers: a new technology for genetic mapping and plant breeding. **AgBiotech News and Information**, Oxon, v. 3, n. 4, p. 645-648, 1991.

RAIJ, B. van. **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba: Ceres, 1991. 343 p.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. 4. ed. rev. Lavras: UFLA, 2008. 463 p.

RAPOSO, F. V.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B. Comparação de métodos de condução de populações segregantes do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 10, p. 1991-1997, out. 2000.

REIS JÚNIOR, F. B. et al. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microorganismos**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2002. 33 p. (Documentos, 51).

RODRIGUES, T. B. et al. Identificação de QTLs em feijoeiro por meio de marcadores SSR influenciados pela seleção natural. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1351-1357, set./out. 2007.

RODRIGUES, T. B.; SANTOS, J. B. dos. Effect of natural selection on common bean microsatellite (SSR) alleles. **Genetic and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 345-352, Apr. 2006.

ROSALEM, C. A. Calagem e adubação mineral. In: ARAÚJO, R. S. et al. (Ed.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, 1996. cap. 4, p. 353-385.

ROSALEM, C. A.; MARUBAYASHI, O. M. **Seja o doutor do seu feijoeiro**. Piracicaba: POTAFOS, 1994. 254 p. (Arquivo do Agrônomo, 7).

SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of betagoblin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

SALGADO, L. T.; VIEIRA, R. F. Macronutrientes na cultura do feijão. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 17, n. 178, p. 13-19, 1994.

SANTOS, A. B.; FAGERIA, N. K. Manejo do nitrogênio para eficiência de uso por cultivares de feijoeiro em várzea tropical. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 9, p. 1237-1248, set. 2007.

SANTOS, M. A.; NICOLAS, M. F.; HUNGRIA, M. Identification of QTL associated with the symbiosis of *Bradyrhizobium japonicum*, *B. Elkanii* and soybean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 1, p. 67-75, jan. 2006.

SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. The chemistry of soil organic nitrogen: a review. **Biology of Fertilized Soils**, Berlin, v. 26, n. 1, p. 1-15, 1998.

SILVA, C. C. da. **Aplicação foliar de cobalto, inoculação com rizóbio e adubação nitrogenada na cultura do feijoeiro**. 2002. 54 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

SILVEIRA, P. M.; DAMASCENO, M. A. Doses e parcelamento de K e de N na cultura do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 11, p. 1269-1276, nov. 1993.

SOLIMAN, K. M.; ALLARD, R. W. Grain yield of composite cross populations of barley: effects of natural selection. **Crop science**, Madison, v. 31, n. 3, p. 705-708, May/June 1991.

SOUZA, R. F. **Dinâmica de fósforo em solos sob influência da calagem e adubação orgânica, cultivados com feijoeiro**. 2005. 141 p. Tese (Doutorado em ciência do solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

TEIXEIRA, F. F. et al. QTL mapping for angular leaf spot in common bean using microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 5, n. 3, p. 272-278, Sept. 2005.

TORGA, P. P. et al. Seleção de famílias de feijoeiro baseada na produtividade, no tipo de grão e informações de QTLs. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 95-100, jan./fev. 2010.

VALADÃO, F. C. S. et al. Inoculação das sementes e adubações nitrogenada e molíbdica do feijoeiro-comum, em Rolim de Moura, RO. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 39, n. 4, p. 741-747, out. 2009.

VIEIRA, C. Adubação mineral e calagem. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 115-142.

VIEIRA, E. A. et al. **Mapeamento genético de caracteres quantitativo e sua interação com o ambiente**. Planaltina: EMBRAPA-Cerrados, 2006. 28 p.

WALLEY, F. et al. Relationship between soil nitrogen availability indices, yield, and nitrogen accumulation of wheat. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 66, n. 5, p. 1549-1561, Sept./Oct. 2002.

XING, Y. Z. et al. Characterization of the main effects, epistatic effects and their environmental interactions of QTLs on the genetic basis of yield traits in rice. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 105, n. 2/3, p. 248-257, Aug. 2002.

YAMADA, T. O nitrogênio e o potássio na adubação da cultura do milho.
Informações Agronômicas, Piracicaba, v. 78, n. 1, p. 1-4, jun. 1997.

CAPÍTULO 2:

Seleção natural em populações de feijão conduzidas em diferentes níveis de nitrogênio

RESUMO

Visando verificar se a seleção natural atua em populações segregantes de feijão, foram obtidas quatro populações a partir dos cruzamentos, Ouro Negro x CI-107 e VC-5 x IAPAR-81 e conduzidas em bulk até a geração F₈ na ausência e presença de N. Os genitores Ouro Negro e VC-5 são considerados tolerantes ao estresse de nitrogênio e IAPAR-81 e CI-107 responsivos. Foram tomadas 100 progênies, de cada cruzamento derivado de cada nível de N. Foram avaliadas 194 progênies na safra das águas e 79 progênies na safra de inverno quanto à produção de grãos. Essas progênies foram avaliadas em dois experimentos distintos com e sem N, no delineamento látice 14 x 14 na safra das águas e 9 x 9 na safra de inverno. Utilizando-se os dados de produtividade média de grãos foram estimados os índices de resposta à aplicação de N e realizadas as análises de variância individual e conjunta para safras e níveis. Na média das duas safras a produtividade de grãos obtida com N foi 50% superior. No geral, a produtividade média das progênies de cada cruzamento mostrou uma tendência a uma maior produtividade no experimento de mesma origem, com exceção para as progênies originadas com N do cruzamento CI-107 x Ouro Negro na safra das águas. Observou-se também que as progênies originadas em ambientes sem N foram mais eficientes e as originadas com N foram mais responsivas. Esses resultados evidenciaram que se o objetivo é obter linhagens para condições sob estresse de N, a seleção deve ser realizada nas mesmas condições, para aumentar a chance de sucesso aliado ao efeito da seleção natural para selecionar indivíduos mais adaptados para um ambiente particular.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. Eficiência no uso de N. Adaptação. Melhoramento genético.

ABSTRACT

Aiming at verifying if natural selection acts in segregating populations of common bean, four populations derived from the crosses Ouro Negro x CI-107 and VC-5 x IAPAR-81 were obtained, and conducted in bulk until F_8 under presence and absence of N. The parents Ouro Negro and VC-5 are considered tolerant to nitrogen stress and IAPAR-81 and CI-107 responsive. One hundred progenies were derived from each cross in each N level, and 194 progenies were evaluated in the rainy season and 79 progenies in the winter season based on grain yield. These progenies were evaluated in two separate experiments with and without N in a 14 x 14 lattice design in the rainy season and a 9 x 9 lattice design in winter season. Using mean grain yield it was estimated the index of response to N application (α), and performed individual and joint analyses of variance considering seasons and N levels. The average grain yield of the two seasons from environment with N was 50% higher. Overall, the mean grain yield of progenies from each cross showed a tendency to increase productivity in the experiment of the same origin, except for the progenies originated with N from crossing CI-107 x Ouro Negro in the rainy season. It was also noted that families originated in environments without N were more efficient for using N and those originated with N were more responsive. If the goal is to obtain lines under N stress, the selection must be made in the same condition, to increase the chance of success coupled with the effect of natural selection to select individuals best adapted to a particular environment.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. Nitrogen use efficiency. Adaptation. Genetic breeding

1 INTRODUÇÃO

A produtividade da cultura do feijoeiro pode ser afetada por vários fatores como, por exemplo, a cultivar utilizada, o manejo da cultura e os estresses bióticos e abióticos. Entre os fatores abióticos que afetam a cultura do feijoeiro, destaca-se a carência de nutrientes no solo, sendo o nitrogênio um dos nutrientes que mais afetam a produtividade desta cultura (VIEIRA, 2006).

Embora seja uma leguminosa, o feijoeiro apresenta fixação biológica de nitrogênio insuficiente para suprir as necessidades da planta. Por isso, na maioria das vezes, é necessária a aplicação de nitrogênio na cultura. Há, contudo, um grande número de agricultores que praticamente não utiliza a aplicação de fertilizantes e outro grupo que utiliza todos os recursos disponíveis para aumentar significativamente a produção. Pensando nisso e nos custos expressivos dos fertilizantes nitrogenados, os programas de melhoramento têm buscado como alternativa a obtenção de linhagens que sejam mais eficientes na utilização do N.

A eficiência na utilização do nitrogênio pode ser avaliada pelo retorno da produtividade por unidade de N aplicado, identificando linhagens responsivas. E também pela capacidade de algumas linhagens apresentarem uma boa produtividade em condições de estresse de N.

A maioria dos trabalhos sobre eficiência no uso de nitrogênio foi realizada com gramíneas, principalmente com as culturas de milho (AGRAMA et al., 1999; GALLAIS et al., 2006; HIREL et al., 2001) e trigo (HUGGINS; PAN, 2003; MORRIS; PAUSEN, 1985; ORTIZ-MONASTERIO et al., 1997). Para a cultura do feijoeiro, alguns trabalhos têm sido realizados no Brasil (FURTINI et al., 2006, 2009; LAGO et al., 2009).

A avaliação e seleção de genótipos eficientes no uso de N têm se mostrado difícil e a utilização da seleção natural por meio da condução de

populações segregantes do feijoeiro em ambientes com adubação nitrogenada e sob estresse de N apresenta-se como uma alternativa para essa dificuldade. A condução de populações nesses ambientes pode favorecer a obtenção de linhagens mais responsivas e eficientes no uso do N. Assim, este estudo teve por objetivo verificar se a seleção natural atua em populações segregantes de feijão, derivadas dos cruzamentos Ouro Negro x CI-107 e VC-5 x IAPAR-81, conduzidas em bulk até F_8 na ausência e na presença de N.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Local de realização do experimento

O experimento foi conduzido na área experimental do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, município de Lavras, localizada na Região Sul do Estado de Minas Gerais, a 918 metros de altitude, 21° 14' S de latitude e 45° 55' W de longitude.

2.2 Obtenção das populações segregantes

Foram utilizadas populações segregantes provenientes dos cruzamentos VC-5 x IAPAR-81 e Ouro Negro x CI-107. As quatro linhagens utilizadas são provenientes do banco de germoplasma da UFLA e dessas, três possuem grãos do tipo carioca. A linhagem Ouro Negro possui grãos negros. As linhagens CI-107 e IAPAR-81 foram consideradas responsivas e VC-5 e Ouro Negro identificadas como tolerantes à baixa disponibilidade de nitrogênio (FURTINI et al., 2006). Essas populações foram conduzidas pelo método da população em dois ambientes: o primeiro, que recebeu 100 Kg /ha de N, sendo 1/3 aplicado na semeadura e o restante em cobertura e o segundo, em que não se utilizou adubação nitrogenada. Esse procedimento foi repetido até a geração F₈ (FURTINI et al., 2009). Nessa geração, foram obtidas progênies que foram avaliadas em campo quanto à produção na safra das águas e na safra de inverno.

Nesse estudo, foram utilizadas 400 progênies, sendo 100 provenientes de populações conduzidas em ambiente com adubação nitrogenada e 100, em ambientes sem adubação nitrogenada, de cada cruzamento. Destas progênies, foram avaliadas na safra das águas aquelas que possuíam maior número de

sementes e, na safra de inverno, aquelas que possuíam os maiores e menores índices de resposta ao N (α).

2.3 Condução dos experimentos

As progênies foram avaliadas em dois experimentos distintos e contíguos. No primeiro, não se utilizou fertilizante nitrogenado e o segundo recebeu 100 Kg/ha de N, sendo 1/3 aplicado na semeadura e o restante em cobertura, as avaliações foram realizadas nas safras das águas e de inverno. Na semeadura, os dois experimentos receberam também 80 Kg/ha de P_2O_5 e K_2O . Para isso, foram aplicados 400 Kg/ha do formulado 0-20-20 de N, P_2O_5 e K_2O , respectivamente.

Os experimentos da safra das águas foram conduzidos no delineamento experimental látice simples 14x14, envolvendo as 194 progênies com maior número de sementes e mais duas testemunhas. As parcelas foram constituídas por duas linhas de um metro, com espaçamento de 50 cm, com 15 sementes por metro.

O experimento da safra de inverno foi conduzido no delineamento látice triplo 9x9, sendo avaliadas 79 progênies selecionadas com base no índice de resposta (α) e duas testemunhas (cultivar Ouro Negro e VC-5). As progênies com maiores e menores índice de resposta (α) foram selecionadas visando facilitar a seleção assistida por marcadores. As parcelas foram constituídas de duas linhas de dois metros, com mesmo espaçamento e número de sementes por metro utilizados na safra das águas.

Em ambas as safras, a semeadura foi realizada no sistema de plantio direto. Para isso, a área foi submetida à previa dessecação, aplicando-se glifosato cerca de 15 dias antes da semeadura.

O controle de plantas daninhas foi efetuado por meio da mistura fomesafen e fluazifop-p-butyl em pós-emergência. Antes da implementação dos experimentos, foram realizadas as análises de solo para cada safra e foram obtidas as características químicas apresentadas na Tabela 1. As características do solo foram distintas nas duas safras, especialmente para o teor de fósforo. Dentro de uma mesma safra, as características foram semelhantes para os experimentos nos dois níveis de N.

Tabela 1 Análises químicas dos solos amostrados à profundidade de 0 a 20 cm, na área experimental em Lavras

Análise Química ¹	Safra das águas 2008	Safra de inverno 2009
pH em H ₂ O	5,9AcM*	6,1AcM
P (mg .dm ⁻³)	8,5M	31,8MBo
K (mg.dm ⁻³)	70M	100Bo
Ca ²⁺ (cmol _c .dm ⁻³)	2,1M	2,9Bo
Mg ²⁺ (cmol _c .dm ⁻³)	0,7M	1,0Bo
Al ³⁺ (cmol _c .dm ⁻³)	0,1MBa	0,0MBa
H+Al (cmol _c .dm ⁻³)	2,9M	3,2M
SB (cmol _c .dm ⁻³)	3,0M	4,2Bo
t (cmol _c .dm ⁻³)	3,1M	4,2M
T (cmol _c .dm ⁻³)	5,9M	7,4M
V (%)	50,7M	56,5Bo
m (%)	3MBa	0MBa
MO (dag.Kg ⁻¹)	2,4M	2,5M
P-rem (mg L ⁻¹)	16	16

Análises realizadas no laboratório de análise de solos do Departamento de Ciência do Solo da UFLA;¹ SB = soma de bases trocáveis; t = CTC efetiva; T = CTC potencial; V = índice de saturação de bases; m = índice de saturação de alumínio; MO = matéria orgânica. AcM – acidez média, MBa – teor muito baixo, Ba – teor baixo, M – teor médio, Bo – teor bom, MBo – teor muito bom.

2.4 Análise dos dados de campo

Foram obtidos os dados de produtividade de grãos das progênes em cada experimento, com e sem N, em cada safra. As análises individuais para cada experimento foram realizadas no programa estatístico SAS, versão 8.0, conforme o modelo estatístico:

$$y_{ijt} = \mu + p_i + q_j + b_{k(j)} + e_{ijt}$$

y_{ijt} : Observação referente à progênie i na repetição j no bloco k ;

μ : Média geral;

p_i : Efeito da progênie i , sendo $i = 1,2,3,\dots,196$ no experimento das águas e 81 no de inverno;

q_j : Efeito da repetição j , sendo $j = 1,2$, no experimento das águas e 3 no de inverno;

$b_{k(j)}$: efeito do bloco k dentro da repetição j , sendo $k = 1, 2, 3,\dots, 14$ no experimento das águas e 9 no de inverno;

e_{ijt} : erro experimental $e_{ijk} \cap N(0, \sigma^2)$

O modelo da análise de variância para cada experimento, com e sem N e suas respectivas esperanças dos quadrados médios esta apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 Esquema da análise de variância para cada experimento, com e sem N, com as respectivas esperanças dos quadrados médios, utilizados na análise para produtividade de grãos

FV	GL	QM	E(QM)
Progênes	v1	Q1	$\sigma^2_{ei} + r\sigma^2_{pi}$
Erro	v2	Q2	σ^2_{ei}

r: número de repetições

Posteriormente, foram realizadas as análises conjuntas envolvendo os dois experimentos, com e sem nitrogênio, em cada safra, empregando a metodologia apresentada por Ramalho, Ferreira e Oliveira (2005). Os efeitos de níveis e média foram considerados fixos e os demais efeitos foram considerados aleatórios para a safra das águas e para a safra de inverno.

$$y_{ijt} = \mu + p_i + n_t + q_{j(t)} + (pn)_{it} + e_{ijt}$$

y_{ijt} : Observação referente à progênie i na repetição j no nível t ;

μ : Média geral;

p_i : Efeito da progênie i , sendo $i = 1, 2, 3, \dots, 196$ no experimento das águas e 81 no de inverno;

n_t : Efeito do nível t , sendo $t = 1, 2$

$q_{j(t)}$: Efeito da repetição j no nível t .

$(pn)_{it}$: Efeito da interação progênie x níveis

e_{ijt} : erro experimental médio $e_{ijk} \cap N(0, \sigma^2)$

O modelo para análise conjunta envolvendo os níveis de N e as esperanças dos quadrados médios está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 Esquema da análise conjunta dos experimentos com e sem N, por safra, com as respectivas esperanças dos quadrados médios

FV	GL	QM	E(QM)
Repetição/nível	v1	Q3	$\sigma^2_{e\mu} + s\sigma^2_{B/N\mu}$
Progênie (P)	v2	Q4	$\sigma^2_{e\mu} + rh\sigma^2_{P\mu}$
Níveis (N)	v3	Q5	$\sigma^2_{e\mu} + r\sigma^2_{PN\mu} + s\sigma^2_{B/N\mu} + sr\sigma^2_{N\mu}$
P x N	v4	Q6	$\sigma^2_{e\mu} + r\sigma^2_{PN\mu}$
Erro médio	v5	Q7	$\sigma^2_{e\mu}$

r: número de repetições; s: número de linhagens; h: número de níveis .

A análise de variância conjunta envolvendo os níveis e safras foi realizada de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$y_{ijk} = \mu + p_i + n_t + a_u + q_{j(tu)} + (pn)_{it} + (pa)_{iu} + (na)_{tu} + (pna)_{itu} + e_{ijtu}$$

y_{ijtu} : Observação referente à progênie i na repetição j no nível t na safra u ;

μ : Média geral;

p_i : Efeito da progênie i , sendo $i = 1,2,3,\dots,81$;

n_t : Efeito do nível t , sendo $t = 1,2$;

a_u : Efeito da safra u , sendo $u = 1,2,3$;

$q_{j(tu)}$: Efeito da repetição j no nível t na safra u ;

$(pn)_{it}$: Efeito da interação progênie x níveis;

$(pa)_{iu}$: efeito da interação progênie x safras;

$(na)_{tu}$: efeito da interação níveis x safras;

$(pna)_{itu}$: efeito da interação progênie x níveis x safras;

e_{ijtu} : erro experimental $e_{ijk} \cap N(0,\sigma^2)$

O modelo da análise de variância conjunta, envolvendo as duas safras e os dois níveis e as respectivas esperanças dos quadrados médios, esta apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 Esquema da análise de variância conjunta considerando todas as safras e níveis e as respectivas esperanças do quadrado médio, utilizadas na análise, para produtividade de grãos

FV	GL	QM	E(QM)
Repetição/nível/safra	v1	Q8	$\sigma^2_{e\mu} + s\sigma^2_{B/N/A}$
Progênes (P)	v2	Q9	$\sigma^2_{e\mu} + rhl\sigma^2_P$
Níveis (N)	v3	Q10	$\sigma^2_{e\mu} + rl\sigma^2_{PN} + S\sigma^2_{B/N/A} + sr\sigma^2_N$
Safras (A)	v4	Q11	$\sigma^2_{e\mu} + rh\sigma^2_{PA} + S\sigma^2_{B/N/A} + sr\sigma^2_A$
P x N	v5	Q12	$\sigma^2_{e\mu} + rl\sigma^2_{PN}$
P x A	v6	Q13	$\sigma^2_{e\mu} + rh\sigma^2_{PA}$
N x A	v7	Q14	$\sigma^2_{e\mu} + r\sigma^2_{PNA} + S\sigma^2_{B/N/A} + sr\sigma^2_{NA}$
P x N x A	v8	Q15	$\sigma^2_{e\mu} + r\sigma^2_{PNA}$
Erro médio	v9	Q16	$\sigma^2_{e\mu}$

r: número de repetições; s: número de linhagens; h: número de níveis; l: número de safras.

Estimou-se a acurácia seletiva (\hat{r}_{gg}), para as características produtividade de grãos e índice de resposta ao N (α) pela seguinte expressão (RESENDE; DUARTE, 2007):

$$\hat{r}_{gg} = \sqrt{1 - \frac{1}{F}}$$

em que:

F: valor do teste F de Snedecor para o efeito de progênie associado à ANAVA.

2.5 Estimativas da herdabilidade e ganho de seleção

Como o efeito de progênies foi considerado aleatório, nas duas safras, nas análises individuais realizadas para produtividade de grãos, foi possível estimar a herdabilidade e seus respectivos intervalos de confiança e o ganho de seleção.

As estimativas de herdabilidade, para as análises de variâncias individuais, foram obtidas por meio das expressões:

$$h^2 = (QM_{\text{progênies}} - QM_{\text{erro efetivo}}) / QM_{\text{progênies}}$$

Os estimadores dos limites inferior (LI) e superior (LS) de herdabilidade são os seguintes (KNAPP; STROUP; ROSS, 1985):

$$LI = \{ 1 - [QM_{\text{progênies}} / QM_{\text{erro efetivo}}] F_{1-\alpha/2; GL_{\text{progênies}}; GL_{\text{erro}}}^{-1} \}$$

$$LS = \{ 1 - [QM_{\text{progênies}} / QM_{\text{erro efetivo}}] F_{\alpha/2; GL_{\text{progênies}}; GL_{\text{erro}}}^{-1} \}$$

em que:

$F_{1-\alpha/2}$ e $F_{\alpha/2}$: valores tabelados da distribuição de F, sendo $\alpha = 0,05$.

O ganho esperado com a seleção foi estimado por meio da seguinte expressão:

$$GS(\%) = ds \times h^2$$

Em que:

ds: diferencial de seleção, sendo a diferença entre a média das progênies selecionadas, considerando uma intensidade de seleção de 10%, e a média geral do experimento;

h^2 : herdabilidade do caráter

Foram também obtidas as médias de produção para cada ambiente em cada safra, para se obter o incremento na produção dado pela adubação nitrogenada em cada safra.

2.5 Estimativa do índice de resposta à aplicação de nitrogênio (α)

A partir dos dados de produtividade média de grãos (Kg/ha) das progênies obtidas nos cruzamentos CI107 x Ouro negro e IAPAR 81 x VC-5, foi estimado o índice de resposta ao nitrogênio através da expressão de Thung (1990), ou seja:

$$\alpha_i = (N_{1i} - N_{2i}) / Q$$

α_i : índice de resposta ao nitrogênio da progênie i;

N_{1i} : produtividade média da progênie i no ambiente com aplicação de nitrogênio

N_{2i} : produtividade média da progênie i no ambiente sem aplicação de nitrogênio

Q: quantidade de nitrogênio aplicado (100 Kg/ha).

Posteriormente, foi realizado o agrupamento das médias (SCOTT; KNOTT, 1974) para separar as progênies quanto a EUN.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos foram avaliados em duas das safras geralmente utilizadas no plantio do feijão: na safra das águas 2008/2009, com semeadura em novembro e na safra de inverno 2009, com semeadura em julho. Nas duas safras foram observadas características distintas de fertilidade do solo, especialmente no teor de fósforo que foi muito maior na safra de inverno. Rodrigues et al. (2002) observaram que o aumento das doses de P eleva a produtividade de grãos, sendo esse efeito ainda mais pronunciado quando o P é combinado com N e isso pode ter contribuído para maior produtividade média na safra de inverno (Tabela 1A). Já a matéria orgânica, que é outro constituinte do solo que poderia alterar os resultados obtidos, foi semelhante em ambas as safras (Tabela 1).

Considerando uma mesma safra, a fertilidade do solo foi semelhante para os dois níveis de nitrogênio aplicados, visto que os experimentos foram plantados bem próximos um do outro, para se tentar isolar quaisquer outros efeitos que poderiam afetar a produtividade. Esse mesmo procedimento foi adotado por Furtini et al. (2006, 2009), avaliando linhagens e populações de feijão, respectivamente, com e sem N. Essa estratégia foi utilizada para que as diferenças no comportamento das progênies refletissem apenas a diferença no N aplicado, já que o manejo foi o mesmo. Ao que tudo indica tal estratégia foi correta, já que os CVs das análises de variância conjunta de cada safra (Tabela 2A) foram semelhantes aos obtidos em outros experimentos com a cultura (SOUZA; GERALDI; RAMALHO, 2000; TORGA et al., 2010). Os valores da acurácia nas duas safras foram maiores que 0,70, que também indica alta precisão experimental.

A eficiência relativa do látice foi superior a 100% em todos os experimentos, evidenciando ter sido vantajoso o emprego desse delineamento.

Os resumos das análises de variância para produtividade de grãos dos experimentos com e sem adubação nitrogenada, em cada safra, estão apresentados na tabela 1A. Em todos os experimentos foram detectadas diferenças significativas entre as progênies ($P \geq 0,01$), indicando haver variabilidade entre as mesmas, o que possibilitaria a realização da seleção. Nas análises individuais os CVs variaram de 21 a 37% o que indica uma precisão experimental considerada de média à baixa. Deve-se considerar, contudo, que na cultura do feijoeiro, além dos fatores experimentais, existem também fatores pós-colheita, como o manuseio das parcelas, que podem levar a uma menor precisão, bem como a ocorrência de antracnose em algumas progênies suscetíveis (SOUZA; GERALDI; RAMALHO, 2000). Observou-se ainda que os CVs, em cada safra, variaram com relação à aplicação de N. Na safra das águas o maior CV foi observado no experimento com N e na safra de inverno o maior CV ocorreu no experimento sem aplicação de N. Isso indica que na safra das águas o experimento com N foi o de menor precisão experimental e na safra de inverno a menor precisão ocorreu no experimento sem N.

A estimativa de CV como medida de precisão experimental tem sido questionada por alguns autores (CARGNELUTTI FILHO; STORK, 2007; RESENDE; DUARTE, 2007). Por esta razão foi estimada também a acurácia (\hat{r}_{g_g}), que reflete a correlação entre o valor genotípico verdadeiro do tratamento genético e aquele predito a partir de informações dos experimentos (COSTA et al., 2005) e pode variar de 0 a 1. É classificada como muito alta ($\hat{r}_{g_g} > 0,90$), alta ($0,70 \leq \hat{r}_{g_g} < 0,90$), moderada ($0,50 \leq \hat{r}_{g_g} < 0,70$) e baixa ($\hat{r}_{g_g} < 0,50$). No presente trabalho, as estimativas de acurácia para a produtividade de grãos foram de 51 a 84%, valores considerados de moderados a alto o que reflete uma precisão experimental relativamente boa.

A análise conjunta envolvendo os dois níveis de nitrogênio em cada safra é apresentada na Tabela 2A. Todas as fontes de variação apresentaram teste de F significativo, com exceção para a interação Origens x níveis, na safra das águas.

A análise conjunta envolvendo os dois níveis e as duas safras estão apresentadas na tabela 5. Pode-se observar que tanto a fonte de variação progênes, quanto a fonte de variação níveis foram altamente significativas ($P < 0,01$). A diferença nos níveis indica que o experimento com aplicação de N diferiu em produtividade daquele sem aplicação de N e isso pode ser evidenciado na tabela 6, onde se observa a média de produção para cada safra em cada nível.

Independentemente do nível de N, a produtividade média foi maior na safra de inverno, comparada com a das águas em 67%. Essa grande diferença na produção de grãos da safra de inverno em relação a das águas, pode ser devida ao intenso crescimento vegetativo nesta última safra, uma vez que o regime de chuvas nesta época é bem maior que no inverno. Além disso, na safra das águas também houve maior incidência de doenças como a antracnose e uma menor quantidade de fósforo disponível.

Em condições de disponibilidade de N, muita umidade e calor ocorre maior remobilização de nutrientes para as partes verdes das plantas (MARSCHNER, 1995). Esse desenvolvimento vegetativo faz com que se intensifique a competição entre as plantas e a eficiência reprodutiva é prejudicada. Desta forma ocorre redução na produção de grãos, principalmente em ambientes com adubação nitrogenada, como observado na safra das águas.

Na decomposição da fonte de variação progênes, nota-se que as progênes de ambas as origens apresentaram diferença significativa, isso indica que há variabilidade entre progênes de cada origem, sendo possível se fazer seleção (Tabela 5).

Também ocorreu interação entre progênies x níveis de N (Tabela 5). A presença de interação indica o comportamento não coincidente das progênies nos experimentos com adubação e sem adubação nitrogenada.

Na decomposição da interação progênies x níveis, pode-se observar também que ocorreu interação entre níveis e progênies tanto de origem com N, quanto de origem sem N, o que sugere um comportamento das progênies de cada origem não coincidente nos diferentes níveis, ou seja, as progênies apresentaram um comportamento particular em cada nível. Esse fato era esperado uma vez que as progênies apresentam diferenças em relação à tolerância e resposta ao nitrogênio, levando ao comportamento diferenciado nos dois níveis. O fato de as progênies terem sido originadas de populações conduzidas em bulk -- na ausência e na presença de N e avaliadas nas duas condições -- pode ter contribuído para aumentar a interação. Isso se nota especialmente entre aquelas derivadas das populações conduzidas sem N no inverno.

Contudo, quando se observa a interação origens x níveis, percebe-se que a interação não foi significativa, o que implica que a produtividade média das progênies das duas origens foi coincidente nos diferentes níveis (Tabela 5). Esse comportamento não era esperado, uma vez que a condução das populações em cada ambiente e sob ação da seleção natural deveria selecionar indivíduos adaptados para cada nível, como observado por Furtini et al. (2009). Considerando que na safra das águas a interação origens x níveis foi não significativa e a safra de inverno foi significativa (Tabela 2A), isso deve ter ocorrido, principalmente, devido à influência da safra das águas, onde o crescimento vegetativo foi intenso e a incidência de doenças como a antracnose também foi maior, prejudicando a produtividade de grãos e, conseqüentemente, alterando o comportamento das progênies.

Tabela 5 Resumo da análise de variância conjunta envolvendo os dois níveis, as duas safras e as progênies de cada origem, para produtividade de grãos em Kg/ha

FV	GL	QM
Safras (A)	1	112902241,34**
Níveis (N)	1	94344259,10**
Progênies (P)	78	383677,86**
Entre origens	1	688687,8*
Entre P. CN	39	338168,16**
Entre P. SN	38	422358,61**
P x N	78	298054,72**
Entre P x N CN	39	302072,21**
Entre P x N SN	38	285837,04*
O x N	1	605644,63ns
A x N	1	59058722,47**
A x P	78	282763,35**
A x N x P	78	371952,81**
Erro médio	610	176530,701
Média		1733
Acurácia (%)		73,47
CV		24,24

*, ** significativo a 5% e a 1% de probabilidade, pelo teste de F.

A interação safras x níveis, significativa ($P \leq 0,01$), indica que o efeito do estresse de nitrogênio não foi coincidente nos diferentes ambientes. Observa-se que o efeito do N foi diferente nas duas safras (Tabela 6), onde as maiores respostas ocorreram na safra de inverno. Na safra das águas, observou-se que o experimento com aplicação de N mostrou-se 8% mais produtivo do que o experimento sem aplicação do nutriente. Na safra de inverno, essa diferença foi muito maior, sendo o experimento com adubação nitrogenada 86% mais produtivo. O incremento por safra foi de 93 Kg/ha na safra das águas, 1274 Kg/ha na safra de inverno e de 684 Kg/ha na média dos experimentos. Esses

valores correspondem a 0,93 Kg, 12,74 Kg e 6,84 Kg de grãos por Kg de N aplicado (Tabela 6). Esses resultados eram esperados, uma vez que o nitrogênio é o nutriente mais exigido pela maioria das culturas, assim como para a cultura do feijoeiro (SALGADO; VIEIRA, 1994).

Tabela 6 Produtividade média de grãos (Kg/ha) das progênies obtidas com e sem aplicação de nitrogênio, e limites inferiores (LI) e superiores (LS) nas diferentes safras avaliadas

	Com N	LI	LS	Sem N	LI	LS	Incremento
Águas	1.313	192	2.550	1.220	148	2.504	8%
Inverno	2.760	1.500	3.900	1.486	750	2400	86%
Média	2.037			1.353			50%

A cultura do feijoeiro mostrou resposta positiva à adubação nitrogenada semelhante à observada em outros experimentos com a cultura, como nos trabalhos de Binotti et al. (2007), Furtini et al. (2006, 2008) e Vieira (2006). De acordo com Vieira (2006), o feijoeiro mostrou resposta positiva em 64% de 80 experimentos avaliados em 30 municípios de Minas gerais. Contudo, a comparação da magnitude de resposta nos experimentos é difícil, uma vez que a resposta à adubação nitrogenada depende de vários fatores ambientais, como umidade, temperatura e matéria orgânica do solo, bem como de fatores genotípicos, como as cultivares avaliadas. Binotti et al. (2007) verificaram que o fornecimento do nutriente em uma quantidade de 75Kg/ha proporcionou um incremento na produção de 62%, quando comparado às testemunhas sem N. Já nos estudos de Furtini et al. (2006, 2008), esse aumento ocorreu em menor magnitude. No trabalho de Furtini et al. (2006), a produtividade de grãos em ambiente com N em cobertura foi 12% superior à obtida no ambiente sem N.

Observou-se também que 77% das linhagens avaliadas não responderam à adubação nitrogenada e apenas 23% tiveram resposta positiva, comprovando a variação da resposta em função da constituição genotípica das cultivares. No trabalho de Furtini (2008) verificou-se que na média de todos os ambientes avaliados, os experimentos com aplicação de nitrogênio produziram 16% acima daqueles onde não houve o fornecimento do nutriente, ocorrendo um incremento médio de 3,81Kg/ha.

Em outras culturas as respostas a adubação nitrogenada são mais significativas, como a do milho em que a resposta média é de 17 Kg de grãos por Kg de N aplicado (FIDELIS et al., 2007), desta forma, não se deve realizar uma comparação direta dessas culturas, uma vez que se comportam de forma totalmente diferente com relação à utilização desse nutriente.

Todas as interações envolvendo progênies foram significativas, indicando que as progênies não tiveram comportamento coincidente nos dois níveis e nem nas duas safras. É, portanto, importante avaliar todas as progênies, pois o quadrado médio (QM) da interação representa o que ocorre em média, podendo, portanto, ocorrerem algumas progênies mais tolerantes e/ou responsivas. Verifica-se que a maioria das progênies apresentaram desempenho próximo da média, contudo é possível observar algumas progênies com desempenho acima da média para os dois níveis de N, como as progênies 312, 373 e 385. Mas, pode-se observar também progênies com desempenho abaixo da média nos dois níveis como as progênies 65 e 370 (Gráfico 1).

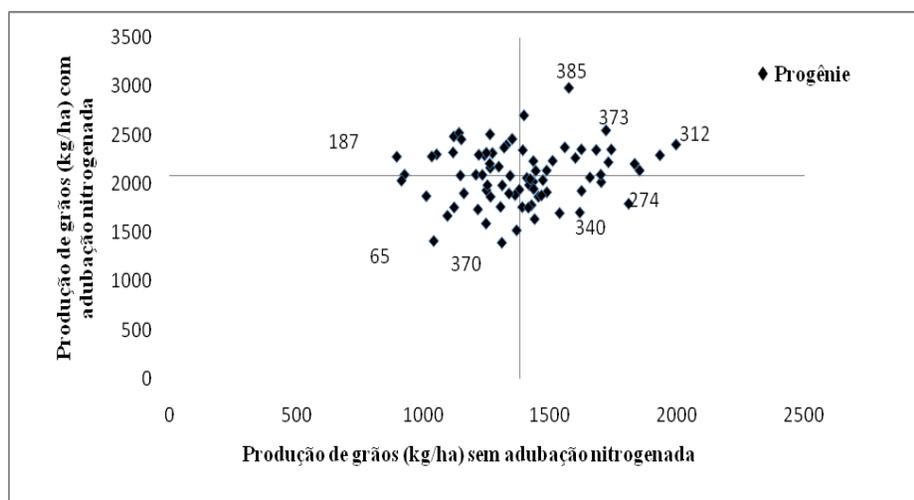


Gráfico 1 Produtividade média de grãos (Kg/ha) das progênies nos experimentos com e sem aplicação de N, na média das duas safras avaliadas

A distribuição de frequência para a média da produção de grãos nas duas safras para cada nível é apresentada no gráfico 2. Pode-se observar que na média dos experimentos sem N, a produção para 88,75% das progênies variou de 1066 a 1628Kg/ha, enquanto que a média dos experimentos com N 92,5% das progênies apresentou valores de produção que variaram de 1658 a 2451Kg/ha, ou seja, a resposta positiva para a grande maioria das progênies pode ser observada independente da origem.

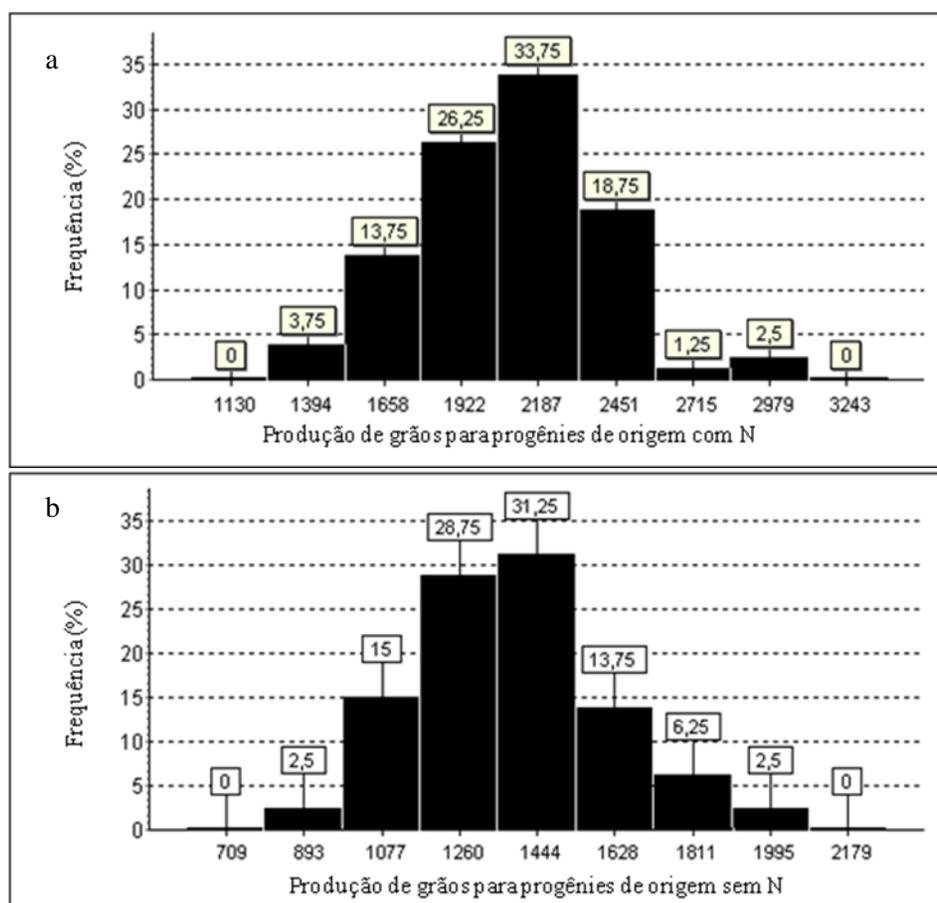


Gráfico 2 Distribuição de frequência da produção de grãos considerando a média dos experimentos com N e sem N, respectivamente

Quando se observa a resposta separada para cada cruzamento e cada nível de N, percebe-se que para o cruzamento entre os genitores CI-107 x Ouro Negro, nos experimentos com adubação nitrogenada, a produção variou de 1591 a 2451 Kg/ha para as progênies originadas sem N, já para as progênies originadas com N a produção variou de 1412 a 2481 Kg/ha (Gráfico 3). Na origem com N, observa-se que o limite inferior foi menor do que o de origem sem N, enquanto os limites superiores foram semelhantes para as duas origens.

Devido a isso, para este cruzamento na safra das águas e na média das duas safras, a produção foi em geral menor para as progênies de origem com N (Tabela 7). Esse fato não era esperado, já que a seleção natural tende a selecionar indivíduos mais adaptados para cada ambiente como observado por Furtini et al. (2009), e também notado para a média das progênies na safra de inverno.

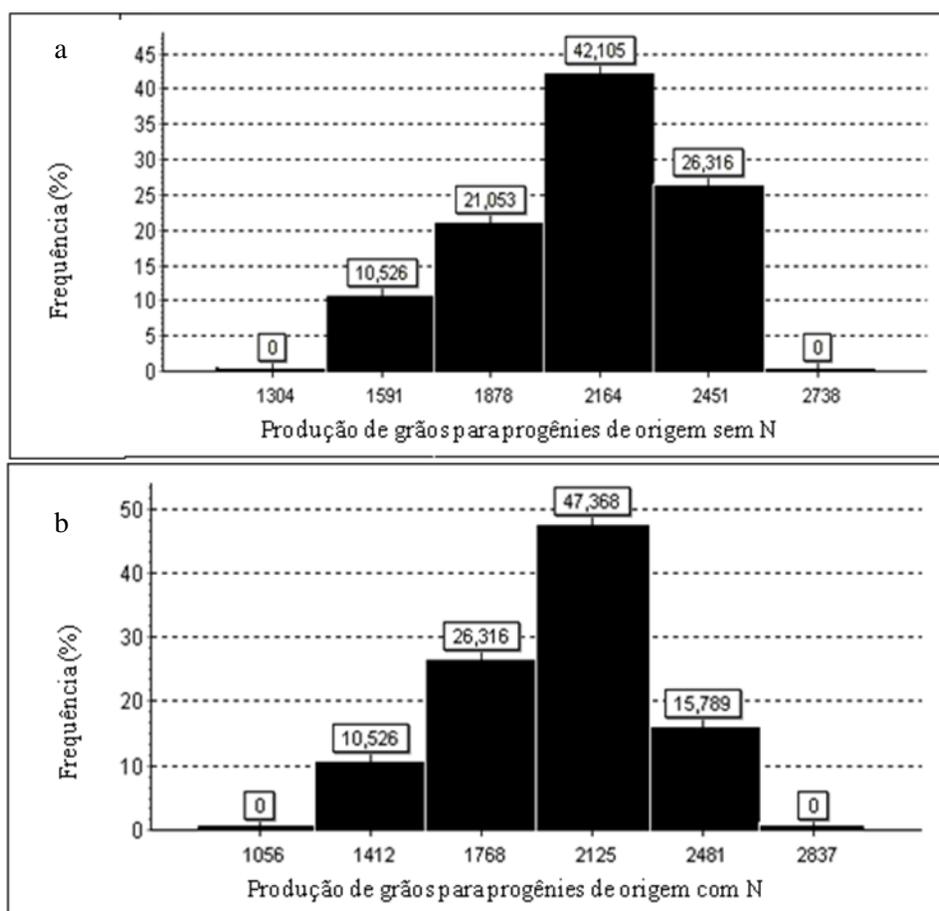


Gráfico 3 Distribuição de frequência da produção de grãos considerando a média dos experimentos com N, para o cruzamento CI-107 x Ouro negro, nas origens SN e CN, respectivamente

Tabela 7 Produtividade média de grãos em Kg/ha das progênes, nas diferentes origens, avaliadas na safra das águas e de inverno em experimento com e sem adubação nitrogenada

Origens	Sem nitrogênio			Com nitrogênio		
	Águas	Inverno	Conjunta	Águas	Inverno	Conjunta
Origem C/N C x O	1157	1433	1295	1390	2693	2042
Origem S/N C x O	1245	1628	1436	1544	2659	2101
Origem C/N I x V	1302	1398	1350	1429	2833	2131
Origem S/N I x V	1395	1490	1443	1314	2831	2073
Média	1275	1487	1381	1447	2754	2186

C x O: cruzamento entre CI-107 e Ouro Negro I x V cruzamento entre IAPAR-81 e VC-5

Para o cruzamento CI-107 x Ouro negro, nos experimentos sem N, observa-se uma tendência das progênes de mesma origem apresentar desempenho superior àquelas progênes de origem diferente, tanto na safra de inverno quanto na safra das águas (Tabela 7). Pela distribuição de frequência observa-se que as progênes originadas com N tiveram suas médias de produção variando de 1039 Kg/ha a 1622 Kg/ha e as progênes originadas sem N tiveram suas produções variando de 1115 Kg/ha a 1851 Kg/ha, apresentando tanto o limite superior quanto o inferior maiores que as progênes de origem não comum ao experimento, como o esperado (Gráfico 4).

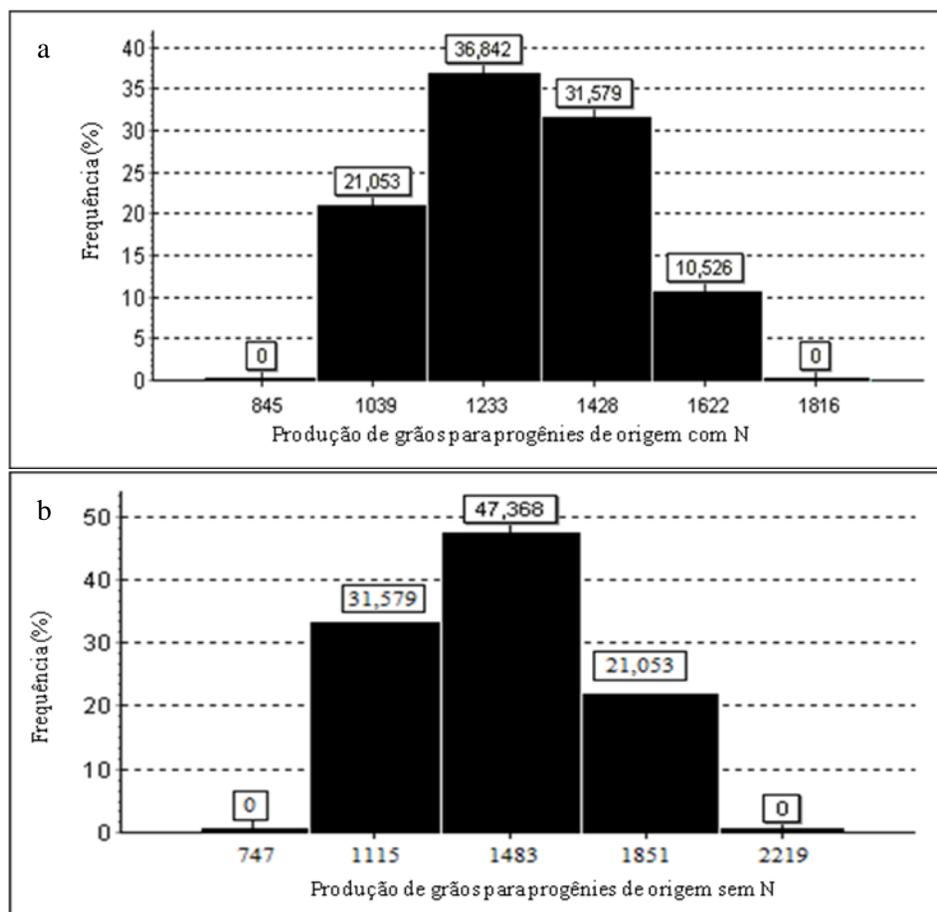


Gráfico 4 Distribuição de frequência da produção de grãos considerando a média dos experimentos sem N, para o cruzamento CI-107 x Ouro negro, nas origens CN e SN, respectivamente

Para o cruzamento IAPAR-81 x VC-5, nos experimentos com N, as progênies de mesma origem, mostraram uma tendência a um desempenho superior aquelas originadas sem N, tanto na safra das águas quanto na safra de inverno (Tabela 7). A partir do gráfico 5, pode se notar que as médias de produção das progênies que originaram sem N variaram de 1394 Kg/ha a 2979 Kg/ha, 88,8% das médias das progênies produziram em torno de 1922 Kg/ha e

2451 Kg/ha. Já as progênes que originaram com N tiveram suas médias variando de 1670 Kg/ha a 2697 Kg/ha, com tendência de produtividade média superior à origem sem N (Tabela 6). O desempenho das progênes desse cruzamento foi o inverso daquelas derivadas de CI-107 x Ouro Negro, para o mesmo experimento. Entretanto algumas progênes que se originaram sem N se destacaram em produtividade, desta forma, é mais vantajoso selecioná-las, mesmo quando vai se utilizar adubação nitrogenada.

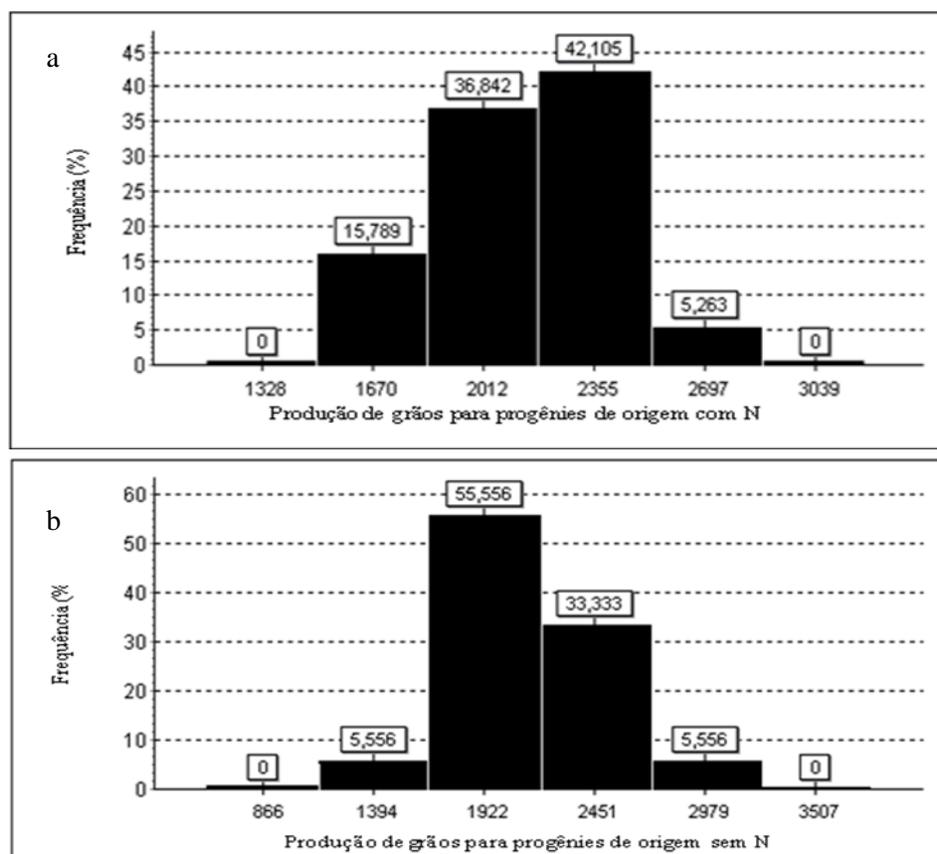


Gráfico 5 Distribuição de frequência da produção de grãos considerando a média dos experimentos com N, para o cruzamento IAPAR-81 x VC-5, nas origens SN e CN, respectivamente

Para o cruzamento IAPAR-81 x VC-5, nos experimentos sem N, as progênies de mesma origem apresentaram uma tendência a um melhor desempenho, tanto na safra das águas quanto na safra de inverno, resultado semelhante ao observado para o cruzamento CI-107 x Ouro Negro (Tabela 7). As progênies originadas sem N tiveram suas médias de produção variando de 912 Kg/ha a 1995 Kg/ha, sendo que 88,9% das progênies apresentaram média entre 1273 Kg/ha e 1634 Kg/ha, enquanto que para as progênies de origem com N tiveram suas médias de produção variando de 893 Kg/ha a 1931 Kg/ha, sendo que 73,7 % delas possuem médias entre 1239 Kg/ha e 1535 Kg/ha (Gráfico 6). Como as progênies mais produtivas foram aquelas de mesma origem do experimento, nesse caso, é mais vantajoso realizar a seleção entre as progênies sem N.

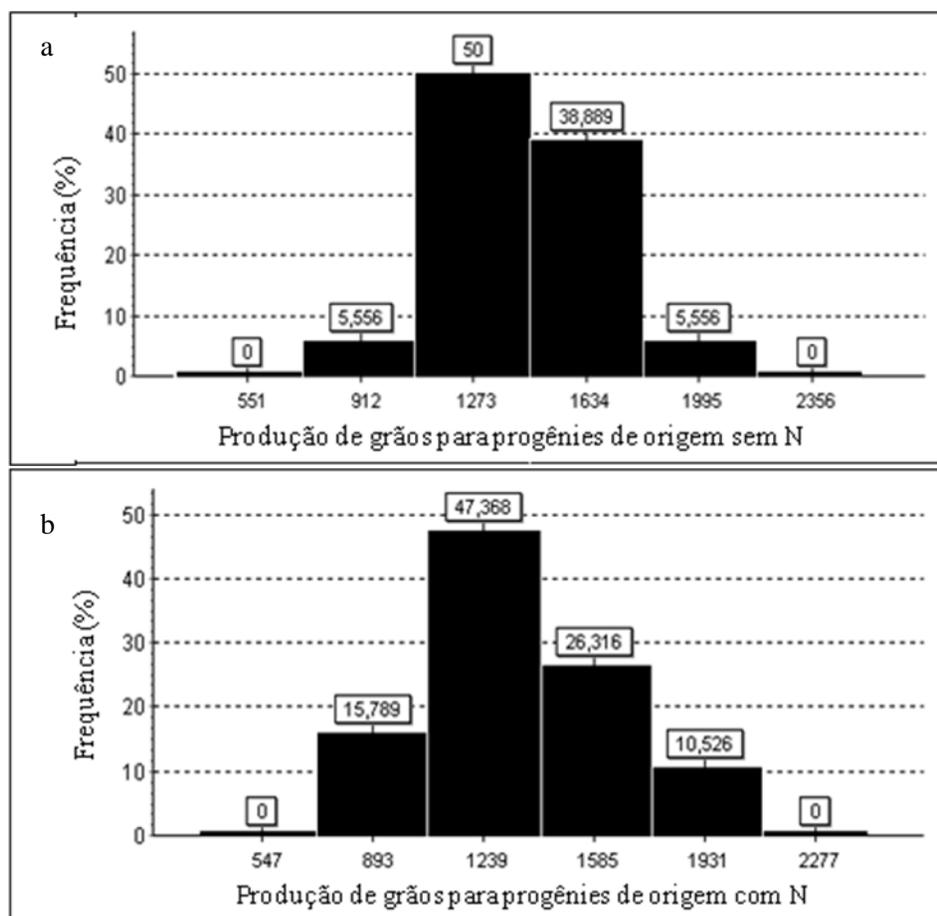


Gráfico 6 Distribuição de frequência da produção de grãos considerando a média dos experimentos sem N, para o cruzamento IAPAR-81 x VC-5, nas origens SN e CN, respectivamente

No geral a produtividade média das progênies do cruzamento CI-107 x Ouro Negro, de origem com N e experimento neste ambiente, foi inferior e o contrário do desempenho das demais progênies, como já citado. Este fato ocorreu porque elas tiveram menor produtividade na safra das águas (Tabela 7). Em concordância com este resultado, Banzinger, Betrán e Laffite (1997) trabalhando com a cultura de milho avaliaram progênies de irmãos germanos e

endogâmicas S_1 e S_2 obtidas pelo CIMMYT, no período de 1986 a 1995, em presença e ausência de N. Esses autores observaram diferenças no desempenho das progênies com N e sem N. Resultado semelhante também foi obtido por Furtini et al. (2009), utilizando populações segregantes do feijoeiro, conduzidas em bulk nos ambientes com N e sem N.

No experimento de Furtini et al. (2009), foram avaliadas populações obtidas a partir de três cruzamentos, em três gerações e originadas em dois níveis de N. Na avaliação de produção nas gerações, a produção com N foi maior que a produção sem N em duas gerações. E quando se considerou a origem das populações, sem N e com N, as populações apresentaram maior produção nos experimentos de mesma origem, com exceção para um dos cruzamentos no experimento sem N. Estes estudos evidenciaram que se o objetivo é obter linhagens para condições de estresse de N, a seleção deve ser realizada nessas mesmas condições, para se aumentar a chance de sucesso e a seleção natural atuar de forma favorável, selecionando indivíduos mais adaptados para um ambiente particular.

Para os agricultores, uma informação importante seria qual a resposta das diferentes progênies ao nitrogênio aplicado, ou seja, a estimativa do índice de resposta de uso de N (α). Como era esperado, ocorreu diferença nas estimativas de α entre as diferentes safras, como observado na tabela 8.

Tabela 8 Resumo da análise de variância conjunta, dos índices de resposta ao nitrogênio, obtidos na avaliação da safra das águas e de inverno

FV	GL	QM
Repetição/safra	3	20,568ns
Safras (A)	1	11038,303**
Tratamento (P)	80	93,712*
P x A	80	100,326**
Erro médio	303	63,6354
Média		7,18
Acurácia (%)		56,65
CV		29,54

*,** Significativo, a 5% e 1% de probabilidade, pelo teste de F.

Na média de todas as progênies, os menores índices foram obtidos na safra das águas, 2008-2009 e os maiores índices os da safra de inverno (Tabela 9). Na safra das águas, 70% das progênies de origem em ambiente com N, apresentaram resposta positiva ao nitrogênio. Para o plantio da safra de inverno, foram selecionadas as progênies de maior e menor resposta a adubação nitrogenada e nesta safra a grande maioria dos índices de resposta foi positiva. Apenas uma progênie apresentou resposta negativa a adubação nitrogenada, a progênie 274, indicando que nessa safra essa progênie produziu mais no experimento sem N. A quase totalidade das progênies com resposta positiva nessa safra, mostrou a grande superioridade na produção de grãos em ambientes com adubação nitrogenada, não excluindo, porém, a possibilidade de se obter progênies com alta produtividade em ambiente sem adubação nitrogenada.

Considerando o índice médio de eficiência na utilização de nitrogênio envolvendo as duas safras, 99% das progênies apresentaram resposta positiva, a resposta negativa foi observada apenas na progênie 274, mas ocorreram índices de resposta, próximas de zero, como nas progênies 340 e 370, o que indica que

tais progênies não apresentaram diferenças de rendimento independente da aplicação de N.

A partir do índice de resposta (α) foi realizado o teste de Scott-Knott, visando distinguir as 79 progênies, e os genitores Ouro negro e VC-5 quanto à resposta a adubação nitrogenada. As progênies foram então separadas em dois grupos, as responsivas ao N, com resposta superior a 7,18 Kg de grãos por Kg de N aplicado e, as não responsivas, aquelas com estimativas inferiores a este valor. As respostas obtidas pelo feijoeiro são inferiores ao que tem sido relatado para outras culturas, como o milho, em que a resposta média é 17 Kg de grãos por Kg de N aplicado (FIDELIS et al., 2007). No trabalho de Furtini (2008), a resposta média obtida foi de 4,15Kg de grãos por Kg de N aplicado, inferior a obtida neste trabalho.

A partir da associação dos índices de resposta (α) com a produção média de grãos das progênies no ambiente sob estresse de N. As progênies podem ser classificadas em quatro categorias (BLAIR, 1993):

- e) Ineficiente e não responsivas (INR): foram as que produziram abaixo da média geral dos experimentos sem adubação nitrogenada e apresentaram α abaixo da média dos índices;
- f) Ineficientes e responsivas (IR): foram as que produziram abaixo da média geral dos experimentos sem adubação nitrogenada e apresentaram α superior a média dos índices;
- g) Eficientes e não responsivas (ENR): foram as que produziram acima da média geral dos experimentos sem adubação nitrogenada e apresentaram α abaixo da média dos índices;
- h) Eficientes e responsivas (ER): foram as que produziram acima da média geral dos experimentos sem adubação nitrogenada e apresentaram α acima da média dos índices;

Independente da origem e do cruzamento pode-se observar no gráfico 7 que existem progênies que se enquadram nas quatro categorias, sendo que algumas progênies se destacam como a 373 e 385 que são eficientes e responsivas. E outras como a 370 e a 65 que não apresentam resposta ou eficiência, o que as levariam a serem eliminadas, já que não possuem vantagens quanto a esses caracteres.

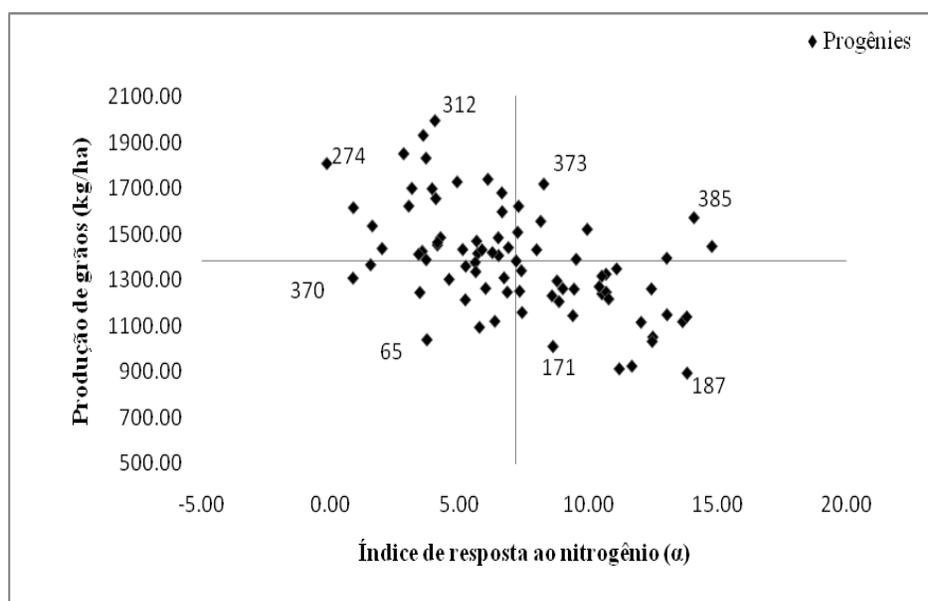


Gráfico 7 Índice de resposta ao nitrogênio e a produtividade média das linhagens sem aplicação de nitrogênio

Observa-se na tabela 9 que mesmo as progênies sendo provenientes de cruzamentos entre pais responsivos e tolerantes, apenas 10% delas foram ER, assim como os genitores Ouro negro e VC-5 (FURTINI et al., 2009). Das progênies ER apenas três delas se originaram em ambiente com N, e 5 se

originaram em ambiente sob estresse de N, sendo essas progênies as que mais se destacam, com maior tolerância e resposta a adubação. 38% foram ENR, sendo 60% destes de origem sem N e 40% de origem com N, estas progênies apresentaram produtividade alta em ambientes sob estresse de N, porém responderam pouco à adubação nitrogenada. 34% das progênies foram consideradas IR, sendo 63% de origem com N e 37% de origem sem N, apresentando produtividade média baixa em ambientes sem N, contudo, elas respondem bem a adubação nitrogenada. E por fim, 18% foram INR, sendo 57% de origem com N e 43% de origem sem N, ou seja, produzem pouco sob condições de estresse e não respondem a adubação nitrogenada, não sendo interessantes para o melhorista, quanto a EUN. Pode-se dizer que as progênies consideradas tolerantes e responsivas utilizam o N disponível no solo de forma mais eficiente que as demais categorias, talvez essa maior eficiência se deva a maior fixação biológica, utilizando-se estirpes nativas do solo, já que não foi realizada inoculação. As progênies que se enquadram nessa categoria são as procuradas pelos melhoristas, pois produzem bem sem grandes gastos com adubação e ainda respondem adubação nitrogenada. Essas progênies poderiam, portanto, ser aproveitadas por agricultores de subsistência ou mesmo para aqueles que empregam alta tecnologia.

Quanto aos cruzamentos dos quais as progênies originaram, não foi observada diferença. Esses resultados mostram que as progênies que originaram em ambientes sem N foram mais eficientes no geral que aquelas que originaram de ambiente com N e também que as progênies que originaram de ambientes com N foram mais responsivas que aquelas originadas em ambiente sem N. Isso pode ser indício da ação da seleção natural, que teria atuado em cada ambiente, selecionando as progênies mais adaptadas para cada situação.

Tabela 9 Estimativa do índice de resposta médio das progênes ao nitrogênio aplicado (α), produtividade média (Kg/ha) sem N e classificação das progênes quanto a eficiência e a resposta ao fornecimento de N para os dois cruzamentos e as duas origens

Cruzamento	Origem	Progênes	α médio ¹	Produção sem N ¹	Resposta
CI-107 x Ouro negro	CN	69	7,24 a	1508,11 a	
CI-107 x Ouro negro	CN	88	7,28 a	1621,43 a	
IAPAR-81 x VC-5	CN	169	13,02 a	1395,08 a	
CI-107 x Ouro negro	SN	279	9,51 a	1390,31 a	Eficientes
CI-107 x Ouro negro	SN	285	8,13 a	1556,00 a	e
CI-107 x Ouro negro	SN	290	7,98 a	1431,86 a	Responsivas
IAPAR-81 x VC-5	SN	373	8,25 a	1718,53 a	
IAPAR-81 x VC-5	SN	385	14,07 a	1571,79 a	
ON	----	----	14,77 a	1446,35 a	
VC-5	----	----	9,94 a	1521,06 a	
CI-107 x Ouro negro	CN	12	11,67 a	923,68 b	
CI-107 x Ouro negro	CN	15	8,84 a	1205,55 b	
CI-107 x Ouro negro	CN	17	12,48 a	1050,52 b	
CI-107 x Ouro negro	CN	44	9,38 a	1144,24 b	
CI-107 x Ouro negro	CN	45	13,63 a	1117,97 b	
CI-107 x Ouro negro	CN	47	8,99 a	1262,05 b	
CI-107 x Ouro negro	CN	48	10,51 a	1239,50 b	
CI-107 x Ouro negro	CN	80	8,77 a	1295,56 b	
CI-107 x Ouro negro	CN	90	10,67 a	1325,23 b	Ineficientes
IAPAR-81 x VC-5	CN	101	7,38 a	1340,15 b	e
IAPAR-81 x VC-5	CN	133	13,79 a	1138,98 b	Responsivas
IAPAR-81 x VC-5	CN	135	10,40 a	1270,62 b	
IAPAR-81 x VC-5	CN	170	12,42 a	1260,99 b	
IAPAR-81 x VC-5	CN	171	8,61 a	1009,72 b	
IAPAR-81 x VC-5	CN	178	12,45 a	1031,57 b	
IAPAR-81 x VC-5	CN	187	13,81 a	893,19 b	
IAPAR-81 x VC-5	CN	197	11,07 a	1348,66 b	
CI-107 x Ouro negro	SN	203	10,67 a	1246,52 b	
CI-107 x Ouro negro	SN	209	10,77 a	1216,83 b	

"Tabela 9, continua"

Cruzamento	Origem	Progênes	α médio	Produção sem N	Resposta
CI-107 x Ouro negro	SN	212	13,03 a	1148,05 b	
CI-107 x Ouro negro	SN	217	8,57 a	1230,81 b	
CI-107 x Ouro negro	SN	244	12,02 a	1115,35 b	Ineficientes
IAPAR-81 x VC-5	SN	318	11,18 a	911,97 b	e
IAPAR-81 x VC-5	SN	327	9,43 a	1260,14 b	Responsivas
IAPAR-81 x VC-5	SN	331	7,41 a	1157,92 b	
IAPAR-81 x VC-5	SN	372	10,50 a	1316,73 b	
IAPAR-81 x VC-5	SN	377	7,32 a	1250,89 b	
CI-107 x Ouro negro	CN	53	6,50 b	1406,49 a	
CI-107 x Ouro negro	CN	55	3,02 b	1622,10 a	
CI-107 x Ouro negro	CN	57	4,26 b	1484,88 a	
CI-107 x Ouro negro	CN	70	4,13 b	1452,22 a	
CI-107 x Ouro negro	CN	96	5,69 b	1415,43 a	
IAPAR-81 x VC-5	CN	114	3,69 b	1831,57 a	
IAPAR-81 x VC-5	CN	115	3,58 b	1931,20 a	
IAPAR-81 x VC-5	CN	126	3,14 b	1699,67 a	
IAPAR-81 x VC-5	CN	161	5,86 b	1431,43 a	
IAPAR-81 x VC-5	CN	166	4,14 b	1463,97 a	
IAPAR-81 x VC-5	CN	180	6,49 b	1484,32 a	Eficientes
IAPAR-81 x VC-5	CN	191	3,54 b	1424,71 a	e
CI-107 x Ouro negro	SN	205	4,07 b	1655,13 a	Não responsivas
CI-107 x Ouro negro	SN	224	3,93 b	1697,80 a	
CI-107 x Ouro negro	SN	235	1,99 b	1436,98 a	
CI-107 x Ouro negro	SN	249	3,70 b	1388,24 a	
CI-107 x Ouro negro	SN	256	6,64 b	1597,72 a	
CI-107 x Ouro negro	SN	268	2,83 b	1850,78 a	
CI-107 x Ouro negro	SN	274	-0,15 b	1807,87 a	
CI-107 x Ouro negro	SN	286	6,26 b	1419,30 a	
CI-107 x Ouro negro	SN	292	6,09 b	1739,33 a	
IAPAR-81 x VC-5	SN	306	3,40 b	1412,22 a	
IAPAR-81 x VC-5	SN	312	4,04 b	1994,97 a	

“Tabela 9, conclusão”

Cruzamento	Origem	Progênies	α médio	Produção sem N	Resposta
IAPAR-81 x VC-5	SN	317	5,11 b	1433,09 a	
IAPAR-81 x VC-5	SN	340	0,88 b	1615,17 a	
IAPAR-81 x VC-5	SN	342	6,88 b	1441,30 a	Eficientes
IAPAR-81 x VC-5	SN	371	5,65 b	1469,55 a	e
IAPAR-81 x VC-5	SN	390	1,61 b	1535,48 a	Não responsivas
IAPAR-81 x VC-5	SN	392	6,63 b	1680,04 a	
IAPAR-81 x VC-5	SN	400	4,90 b	1727,92 a	
CI-107 x Ouro negro	CN	65	3,73 b	1038,98 b	
CI-107 x Ouro negro	CN	71	1,55 b	1366,07 b	
CI-107 x Ouro negro	CN	73	6,36 b	1119,51 b	
CI-107 x Ouro negro	CN	75	4,59 b	1302,55 b	
IAPAR-81 x VC-5	CN	130	5,76 b	1093,17 b	
IAPAR-81 x VC-5	CN	179	5,60 b	1376,54 b	Ineficientes
IAPAR-81 x VC-5	CN	182	5,23 b	1359,93 b	e
IAPAR-81 x VC-5	CN	183	5,21 b	1213,23 b	Não responsivas
CI-107 x Ouro negro	SN	214	6,72 b	1309,28 b	
CI-107 x Ouro negro	SN	236	6,84 b	1246,85 b	
CI-107 x Ouro negro	SN	240	3,45 b	1245,38 b	
IAPAR-81 x VC-5	SN	307	5,62 b	1335,95 b	
IAPAR-81 x VC-5	SN	370	0,86 b	1307,78 b	
IAPAR-81 x VC-5	SN	374	6,00 b	1263,12 b	
Média	-----	-----	7,18	1383	-----

¹ médias seguidas de mesma letra pertencem ao mesmo grupo.

A herdabilidade é um dos parâmetros genéticos mais importantes para o trabalho do melhorista, uma vez que ela representa o quanto da variação fenotípica pode ser perpetuada via seleção, ou seja, a proporção da variação genética presente na variação fenotípica total. A herdabilidade expressa então a confiança do valor fenotípico como um indicador do valor reprodutivo

(BERNARDO, 2002). Observa-se na tabela 12 que a herdabilidade tanto da produtividade de grãos quanto do índice de resposta (α), para a safra das águas e para o experimento com N da safra de inverno, foi diferente de zero com limites inferiores positivos, considerando a probabilidade de 95%, o que evidencia a possibilidade de sucesso com a seleção. Para o experimento sem N da safra de inverno o limite inferior foi negativo, sendo possível então que a herdabilidade seja zero. As estimativas de herdabilidade obtidas com a cultura do feijão variam de 10,6% a 64,9% (MORETO; RAMALHO; ABREU, 2007). Portanto, as herdabilidades obtidas neste trabalho estão dentro deste intervalo, para o experimento com N na safra das águas, sem N na safra de inverno e para o índice de resposta (α). Já para o ambiente sob estresse de N na safra das águas e o experimento com N no inverno, as herdabilidades se mostraram um pouco acima deste intervalo o que indica que a seleção direta nestes experimentos, nas safras indicadas, pode resultar em maior sucesso.

Brancourt-Humel et al. (2005) relatam que as herdabilidades em ambientes sob condições de estresse, são menores que aquelas em ambientes sem estresse. Isso porque nas condições de maior produtividade, o controle da variação ambiental é mais eficiente e nessas condições ocorre maior precisão experimental. Esse fato foi observado nos experimentos na safra de inverno. Contudo, na safra das águas as estimativas de herdabilidade foram maiores na condição de estresse. Uma razão para esse resultado é que na safra das águas a precisão experimental com N foi inferior, o que provavelmente contribuiu para maior h^2 no experimento sem N.

Foi observado também o ganho esperado com a seleção (GS) em cada nível na safra das águas, considerando as 10% melhores progênies (Tabela 12). Pode-se observar que o ganho com a seleção foi diferente de zero para os dois níveis de N e nas duas safras, o que permite inferir que o sucesso seletivo pode ser alto independente da existência ou não de estresse. O ganho variou quando se

considerou o fornecimento ou não de adubação nitrogenada e foi maior no ambiente sem N para a safra das águas e no com N na safra de inverno. Isso porque esses experimentos apresentaram maiores herdabilidades.

Tabela 12 Estimativas de herdabilidade com seus respectivos intervalos de confiança e os ganhos esperados com a seleção (GS) considerando os dois níveis de adubação, nas safras das águas e de inverno

Variável	Safra	Níveis	Herdabilidade	LI	LS	GS (%)	GS (Kg/ha)
Produção	Águas	Sem N	0,65611	54,011	74,365	34,28%	418,29
		Com N	0,46036	27,832	59,773	26,83%	352,31
	Inverno	Sem N	0,265553	-0,095	0,499	10,37%	154,22
		Com N	0,72288	0,585	0,811	16,77%	461,25
Índice (α)	Médio		30,23	6,69	47,99	14,77%	3,834

Finalmente é importante salientar que nos cultivos onde não há possibilidade de uso de N, seria recomendável utilizar cultivares eficientes. Nesse caso, nota-se que 38 das progênies (48%) foram eficientes para o uso de N entre elas 23 (61%) foram derivadas das populações conduzidas na ausência de N e 15 (39%) foram derivadas das populações conduzidas com N (Tabela 9). Esse resultado salienta mais uma vez, o efeito da seleção natural para auxiliar na seleção daquelas mais eficientes ao uso de N.

Nos cultivos onde há possibilidade de uso de N deve-se optar por cultivar responsiva. Entre as progênies 35 (44%) foram responsivas e delas 20 (57%) originaram-se das populações conduzidas na presença de N e 15(43%) foram derivadas das populações conduzidas sem N. Observa-se também a tendência da seleção natural atuar favorecendo aquelas com adaptação específica. Para recomendação de uma cultivar para ambos ambientes,

evidentemente, o ideal é uma eficiente e responsiva, como a progênie 373 (Gráfico 7, Tabela 9)

4 CONCLUSÕES

A seleção natural atua em populações segregantes conduzidas tanto na presença, quanto na ausência de N, havendo a tendência de favorecer as progênies mais responsivas nas populações derivadas de ambiente com N e mais tolerantes, nas populações derivadas de ambientes sem N.

Há possibilidade de seleção de progênies tolerantes, responsivas e de alta produtividade de grãos.

Para se obter linhagens para condições de estresse de N, a seleção deve ser realizada nas mesmas condições, para aumentar a chance de sucesso aliado ao efeito da seleção natural para selecionar indivíduos mais adaptados para um ambiente particular.

REFERÊNCIAS

AGRAMA, H. A. S. et al. Identification of quantitative trait loci for nitrogen use efficiency in maize. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 5, n. 2, p. 187-195, May 1999.

BANZINGER, M.; BETRÁN, F. J.; LAFFITE, H. R. Efficiency of high-nitrogen selection environments for improving maize for low-nitrogen target environments. **Crop Science**, Madison, v. 37, n. 4, p. 1103-1109, July/Aug. 1997.

BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. Woodbury: Minesota, 2002. 368 p.

BINOTTI, F. F. S. et al. Manejo do solo e da adubação nitrogenada na cultura de feijão de inverno e irrigado. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 1, p. 121-129, 2007.

BLAIR, G. J. Nutrient efficiency: what to we really mean. In: RANDALL, P. J. et al. **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1993. p. 205-213.

BRANCOURT-HUMEL, M. et al. Indirect versus direct selection of winter wheat for low-input or high-input levels. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 4, p. 1427-1431, July/Aug. 2005.

CARGNELUTTI FILHO, A.; STORCK, L. Estatísticas de avaliação da precisão experimental em ensaios de cultivares de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 1, p. 17-24, jan. 2007.

COSTA, R. B. et al. Variabilidade genética e estimativas de herdabilidade para o caráter germinação em matrizes de *Hevea brasiliensis*. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 74-75, fev. 2005.

FIDELIS, R. R. et al. Fontes de germoplasma de milho para estresse de baixo nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 3, p. 147-153, jul./set. 2007.

FURTINI, I. V. **Implicações da seleção no feijoeiro efetuada em ambientes contrastantes em níveis de nitrogênio**. 2008. 68 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

FURTINI, I. V. et al. Natural selection for nitrogen use efficiency in common bean population. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Washington, v. 52, p. 130-131, 2009.

_____. Resposta diferencial de linhagens de feijoeiro ao nitrogênio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1696-1700, nov./dez. 2006.

GALLAIS, A. et al. Modelling post-silking N-fluxes in maize using ¹⁵N-labelling field experiments. **New Phytologist**, Cambridge, v. 172, n. 4, p. 696-707, Dec. 2006.

HIREL, B. et al. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. **Plant Physiology**, Washington, v. 125, n. 3, p. 1258-1270, Mar. 2001.

HUGGINS, D. R.; PAN, W. L. Key indicators for assessing nitrogen use efficiency in cereal-based agroecosystems. **Journal of Crop Production**, New Jersey, v. 8, n. 1/2, p. 157-186, Jan. 2003.

KNAPP, 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.

LAGO, F. J. et al. Frações nitrogenadas e eficiência nutricional em linhagens de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 440-447, mar./abr. 2009.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. San Diego: Academic, 1995. 889 p.

MORETO, A. L.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. de F. B. Estimação de componentes de variância fenotípica em feijoeiro utilizando o método genealógico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1035-1042, jul./ago. 2007.

MORRIS, C. F.; PAULSEN, G. M. Development of hard winter wheat after anthesis as affected by nitrogen nutrition. **Crop Science**, Madison, v. 25, n. 6, p. 1007-1010, Nov./Dec. 1985.

ORTIZ-MONASTERIO, J. I. et al. Genetic progress in wheat yield and nitrogen use efficiency under four nitrogen rates. **Crop Science**, Madison, v. 37, n. 3, p. 898-904, May/June 1997.

RAMALHO, M. A. P.; FERREIRA, D. F.; OLIVEIRA, A. C. **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 300 p.

RESENDE, M. D. V.; DUARTE, J. B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 3, n. 37, p. 182-194, set. 2007.

RODRIGUES, J. R. de M. et al. População de plantas e rendimento de grãos do feijoeiro em função das doses de nitrogênio e fósforo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1218-1277, nov./dez. 2002.

SALGADO, L. T.; VIEIRA, R. F. Macronutrientes na cultura do feijão. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 17, n. 178, p. 13-19, 1994.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

SOUZA, E. A.; GERALDI, I. O.; RAMALHO, M. A. P. Alternativas experimentais na avaliação de famílias em programas de melhoramento genético do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 9, p. 1765-1771, set. 2000.

THUNG, M. Phosphorus: a limiting nutrient in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) production in Latin America and field screening for efficiency and response. In: EL BASSAM, N.; DAMBROTH, M.; LOUGHMAN, B. C. (Ed.). **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Kluwer, 1990. p. 501-521.

TORGA, P. P. et al. Seleção de famílias de feijoeiro baseada na produtividade, no tipo de grão e informações de QTLs. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 95-100, jan./fev. 2010.

VIEIRA, C. Adubação mineral e calagem. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 115-142.

CAPÍTULO 3:

**Seleção natural em alelos de microssatélites do feijão em populações
conduzidas em diferentes níveis de N e identificação de QTLs**

RESUMO

Objetivou-se verificar se a seleção natural afeta a frequência dos alelos de microssatélite em populações de feijoeiro conduzidas na presença ou ausência de N e identificar QTLs que podem auxiliar na seleção assistida. Foram obtidas quatro populações a partir dos cruzamentos, Ouro Negro x CI-107 e VC-5 x IAPAR-81, conduzidas em bulk até a F₈ nos dois níveis de N. Ouro Negro e VC-5 são consideradas tolerantes ao estresse de nitrogênio e IAPAR-81 e CI-107 responsivas. Cada população foi representada por 100 progênies avaliadas na presença e ausência de N. Destas progênies, 194 foram avaliadas na safra das águas e 79 na safra de inverno baseada na produção de grãos. Dois experimentos distintos foram estabelecidos nos ambientes com e sem N, no delineamento látice 14 x 14 na safra das águas e 9 x 9 na safra de inverno. Foi extraído o DNA das 400 progênies, e posteriormente realizadas reações de microssatélite com primers polimórficos selecionados nos genitores. O estudo incluiu 35 pares de primers polimórficos, sendo 20 comuns aos dois cruzamentos. Desconsiderando-se o cruzamento e a sua origem a seleção natural atuou em 22 dos 35 locos. Foi observado também um elevado número de locos heterozigóticos, mesmo em gerações avançadas de autofecundação e podem estar relacionados a regiões genômicas que contribuem para maior adaptação ao estresse de N. Foram identificados QTLs para o índice de resposta ao N e para produção de grãos. Dentre os marcadores dois foram comuns para o índice de resposta e para produção de grãos, tanto nas análises considerando as progênies de origem sem N quanto considerando todas as progênies, independente da origem, sendo, portanto, potenciais para a seleção visando a eficiência no uso de N.

Palavras-chave: Eficiência no uso de N. *Phaseolus vulgaris*. Adaptação. Marcadores de microssatélites.

ABSTRACT

The objectives were to verify if natural selection affects the frequency of microsatellite alleles in common bean populations, conducted in the presence or absence of N, and to identify QTLs that can be used in the assisted selection. Four populations from the crossings Ouro Negro x CI-107 and VC-5 x IAPAR-81 and were obtained, conducted in bulk up to F₈ in two levels of N. Ouro Negro and VC-5 are considered tolerant to nitrogen stress and IAPAR-81 and CI-107 responsive. Each population was represented by 100 progenies evaluated in the presence and absence of N. From those progenies 194 were evaluated in the rainy season and 79 in the winter season based on grain yield. Two separate experiments were set up, with and without N in a 14 x 14 lattice design in the rainy season and a 9 x 9 lattice design in winter season. DNA was extracted from 400 progenies, and subsequently, PCR reaction was carried out using the selected polymorphic microsatellite primers in the parents. The study included 35 polymorphic primer pairs, with 20 common to the two crosses. Independent of the parents and the origin of progenies, natural selection acted in 22 out of 35 loci. We also observed a high number of heterozygous loci, even in advanced generations of self fertilization and may be related to genomic regions that contribute to greater stress adaptation to N. QTLs were identified for the index of response to N (α) and grain yield. Among the markers, two were common to the index of response and grain yield, in both analyses considering the progenies originated without N and considering all the progenies regardless of their origin, therefore, having potential for selection aiming at the use efficiency N.

Keywords: Nitrogen use efficiency. *Phaseolus vulgaris*. Adaptation. Allelic frequency. SSR markers.

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro é uma planta exigente em nitrogênio, um nutriente geralmente encontrado em níveis insuficientes, especialmente em se tratando da agricultura de subsistência. Assim, é importante a obtenção de cultivares que apresentem maior eficiência de uso deste nutriente, ou seja, torna-se interessante o desenvolvimento de genótipos produtivos mesmo em ambientes com baixa disponibilidade de nitrogênio mineral e também capazes de responder à adubação nitrogenada. Entretanto, é difícil avaliar e selecionar tais genótipos e uma alternativa para contornar este problema é o uso da seleção natural por meio da condução de populações segregantes de feijoeiro, na presença e na ausência de adubação nitrogenada. A avaliação de populações conduzidas nesses ambientes pode permitir a identificação de progênies menos exigentes no emprego de adubos nitrogenados, bem como as mais responsivas à adubação nitrogenada (FURTINI et al., 2009).

Dada a dificuldade de identificação dessas progênies o uso de marcadores como os microssatélites, pode contribuir para selecionar alelos para maior adaptação (ALLARD, 1999; LEITE, 2008; RODRIGUES; SANTOS, 2006), e alguns desses alelos podem estar relacionados à eficiência na utilização do nitrogênio, já que em solos pobres em nitrogênio, a eficiência no seu uso favoreceria a sobrevivência das populações.

A grande maioria dos estudos envolvendo a utilização de marcadores moleculares na identificação de genótipos eficientes no uso de N foi realizada com gramíneas, principalmente com as culturas do milho (AGRAMA et al., 1999; GALLAIS; HIREL, 2004; HIREL et al., 2001) e trigo (DIAGUO et al., 2006; LE GOUIS et al., 2008; MACCAFERRI et al., 2008; QUARRIE et al., 2005). No caso do feijoeiro as pesquisas nessa área ainda são escassas.

Como esse tipo de informação ainda é restrito para a cultura do feijoeiro, objetivou-se no presente estudo, verificar se a seleção natural afeta os alelos de microssatélite de forma específica, em populações conduzidas na presença ou ausência de N, visando identificar aqueles que podem auxiliar na seleção.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Extração do DNA e Reação de SSR (Simple Sequence Repeat)

A extração do DNA genômico e reação de SSR foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, de acordo com os procedimentos utilizados por Rodrigues e Santos (2006). Foi extraído o DNA de cerca de 2g de tecido foliar jovem de cada uma das 100 plantas que gerou as progênes obtidas de cada cruzamento, em cada ambiente.

As folhas foram maceradas com 10 ml de tampão de extração [2% de CTAB, 100 mM de TRIS (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 1,4M NaCl e 1% PVP (polivinilpirrolidona)] a 65°C em um almofariz. Ao material macerado foi adicionado 30 µl de β-mercaptoetanol, colocado em um tubo de centrifuga que foi fechado e invertido várias vezes para misturar bem o conteúdo, posteriormente foi centrifugado e Incubado por cerca de trinta minutos em banho-maria a 65°C. Após, foi realizada a primeira extração de DNA em uma mistura de clorofórmio: álcool isoamil, a proporção usada foi de 24:1 em um volume de 10 ml. Durante esta extração, as fases orgânicas e aquosas foram separadas por centrifugação e foi coletado o sobrenadante. Em seguida, os ácidos nucleicos foram precipitados, após colocar 30 ml da mistura de 6 álcool 95%: 1 acetato de amônia 7,5M, a mistura foi colocada no freezer por, pelo menos uma hora. Após a precipitação, os ácidos nucleicos foram transferidos para tubos de microcentrifuga. Em seguida, os ácidos nucleicos foram reidratados em tampão TE (1mM TRIS 0.1mM EDTA). Realizou-se uma segunda extração com clorofórmio-álcool isoamil e o sobrenadante foi precipitado pela adição de pelo menos, três volumes de uma mistura de 1 acetato de sódio 3M: 20 etanol 95% . Após a precipitação o DNA foi reidratado em

tampão TE e quantificado, usando-se o fluorímetro HOFFER TKO100. O material quantificado foi então diluído em água pura para a concentração de 10ng/μL para ser utilizado nas reações.

Para cada reação foram utilizados 20 ng de DNA, 100 μM de cada um dos dntps, 1U de taq DNA polimerase, tampão composto de 50 mM de TRIS pH 8,3, 20mM de KCl, 2mM de MgCl₂, 10μg de BSA, 0,25% de Ficol 400, 10mM de tartrazine e água de pura. O volume final para cada reação foi de 12μl. As reações foram realizadas utilizando 32 ciclos de desnaturação do DNA, anelamento do primer e alongação (RODRIGUES, 2004).

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese vertical por 2 horas a 120 volts em gel de poliacrilamida 6% corado em nitrato de prata e fotografado com câmera digital.

2.2 Pré-seleção de primers selecionados pela seleção natural

Preliminarmente, foram realizadas reações com os genitores VC-5, IAPAR-81, Ouro Negro e CI-107 para a seleção dos primers polimórficos. Foram testados 480 pares de primers de microssatélite, cujas sequências estão disponíveis em (BEAN IMPROVIMENT COOPERATIVE - BIC, 2007).

Os fragmentos de DNA amplificados por cada par de primers foram identificados em cada progênie como: 0, aquela banda que apresentar apenas o fragmento proveniente do genitor IAPAR-81 do primeiro cruzamento e CI-107, no segundo cruzamento; 1, a banda proveniente do genitor VC-5 no primeiro e Ouro negro do segundo cruzamento e 2, quando a progênie possui as bandas dos dois genitores.

2.3 Teste da alteração das frequências genotípicas nas populações Segregantes.

A fim de comparar as proporções genotípicas das duas populações de cada cruzamento, para cada primer e cada população, foi realizado o teste estatístico χ^2 que permite verificar se as frequências observadas se desviam casualmente ou não das esperadas. A expressão geral é representada por:

$$\chi^2 = \sum \frac{(FO - FE)^2}{FE}$$
, onde FO é a frequência observada e FE, a frequência esperada na ausência de seleção.

Nos genótipos “A¹” corresponde ao fragmento de DNA (alelo) proveniente do genitor CI-107 e “A²” o alelo proveniente do genitor Ouro negro do primeiro cruzamento e no segundo cruzamento “B¹” corresponde ao alelo proveniente do genitor IAPAR-81 e o alelo “B²” proveniente do genitor VC-5.

Considerando que a estimativa da taxa de cruzamento natural do feijão na região é de aproximadamente $T = 0,005$ (MARQUES JÚNIOR; RAMALHO, 1995), e a taxa correspondente de autofecundação $S = 1 - T = 0,995$, foram estimadas as frequências genotípicas para cada par de primer (loco). Assim, utilizando “A¹”, “A²”, como os alelos derivados de CI-107 e Ouro Negro, e “B¹”, “B²” como alelos derivados de IAPAR-81 e VC-5, respectivamente, em cada loco SSR, as frequências genotípicas esperadas na geração F_8 ($n+1$) são fornecidas pelas expressões (ALLARD; JAIN; WORKMAN, 1968):

$$\text{Freq (A}^1\text{A}^1\text{)/(B}^1\text{B}^1) = f_1^{(n+1)} = S[f_1^{(n)} + 0,25 f_2^{(n)}] + T[f_1^{(n)} + 0,5 f_2^{(n)}]^2$$

$$\text{Freq (A}^1\text{A}^2\text{)/(B}^1\text{B}^1) = f_2^{(n+1)} = S[0,5 f_2^{(n)}] + 2T[f_1^{(n)} + 0,5 f_2^{(n)}][f_3^{(n)} + 0,5 f_2^{(n)}]$$

$$\text{Freq}(A^2A^2)/(B^1B^1) = f_3^{(n+1)} = S[f_3^{(n)} + 0,25 f_2^{(n)}] + T[f_3^{(n)} + 0,5 f_2^{(n)}]^2$$

2.4 Estimativas dos coeficiente de adaptabilidade relativa acumulados

Considerando o coeficiente de adaptabilidade relativa sobre o genótipo A^1A^1 como ω_1 , sobre o genótipo A^2A^2 como ω_3 e sobre o genótipo A^1A^2 como $\omega_2 = 1,0$, foram estimados os coeficientes de adaptabilidade relativa acumulada de F_2 a F_8 por meio das expressões (ALLARD; HANSCHKE, 1964):

$$\omega_1 = \frac{O_1 [(0,5SH + 2T(P + 0,5H))(R + 0,5H)]}{O_2 [S(P + 0,25H) + T(P + 0,5H)^2]}$$

$$\omega_3 = \frac{O_3 [(0,5SH + 2T(P + 0,5H))(R + 0,5H)]}{O_2 [S(R + 0,25H) + T(R + 0,5H)^2]}$$

Onde: P e O_1 : proporções de A^1A^1 nas gerações n e n+1, respectivamente;

H e O_2 : proporções de A^1A^2 nas gerações n e n+1;

R e O_3 : proporções de A^2A^2 nas gerações n e n+1.

As proporções genótípicas da geração n são as esperadas em F_7 na ausência de seleção natural, considerando as taxas de 0,005 de cruzamento e 0,995 de autofecundação.

As mesmas expressões foram utilizadas para a população derivada de IAPAR 81 e VC-5 cujos alelos SSR foram representados por B^1 e B^2 , respectivamente.

1.5 Identificação de QTLs em feijoeiro

A análise de regressão linear múltipla utilizando os marcadores moleculares, os dados de EUN e produção de grãos, foi realizada conforme procedimentos utilizados por Torga et al. (2010), que consideraram os marcadores moleculares como variáveis independentes. A identificação de ligação entre QTLs e marcadores foi realizada utilizando o programa SAS, versão 8.0, utilizando o procedimento *backward*. Através desse procedimento, todos os marcadores foram colocados no modelo inicialmente e o marcador de menor F e que não apresentou significância, foi eliminado. Os marcadores remanescentes foram então submetidos ao mesmo processo de eliminação até que todos os marcadores do modelo apresentassem F parcial significativo (FERREIRA, 1995). Foram obtidas as estimativas de R^2_{aj} (coeficiente de determinação ajustado).

A partir dos dados obtidos no capítulo 2 foi realizada a identificação de QTLs, utilizando-se as médias da produção de grãos e os valores do índice de resposta (α) em cada safra, em cada ambiente, e também na conjunta, considerando todas as safras. As análises de regressão linear simples e múltipla foram realizadas considerando as 79 progênies avaliadas na safra de inverno, as 39 progênies de origem sem N e também as progênies com os índices de resposta (α) extremos, considerando as 12 com valores maiores e as 12 com menores.

Foi realizada ainda a análise por ponto para os marcadores identificados a partir dos valores extremos de α . Essa análise permite medir a variância genética do marcador, e ainda distinguir as variâncias de dominância e a aditiva, componentes da variância genética. Posteriormente, o valor de R^2 foi estimado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Emprego de microssatélites nas populações conduzidas em diferentes níveis de N

Foram identificados 35 pares de primers que detectaram polimorfismo nos genitores, sendo 20 pares de primers polimórficos nos genitores dos dois cruzamentos, doze polimórficos apenas para os genitores do cruzamento Ouro Negro x CI-107 e três polimórficos apenas para os genitores do cruzamento VC-5 x IAPAR-81. Em 15 primers, cuja posição nos cromossomos é conhecida, os fragmentos foram mapeados em oito cromossomos diferentes. Para os outros 20 primers, não se conhece a posição no genoma, ou esta ainda não foi publicada. Isso indica que a seleção natural provavelmente exerceu seu efeito em todo genoma. Podendo alguns desses locos afetados pela seleção natural estarem relacionados a eficiência no uso de nitrogênio, uma vez que as condições ambientais impostas, principalmente o estresse de N, teriam favorecido tal ocorrência.

Dentre os marcadores polimórficos para os dois cruzamentos, destaca-se o primer PvM-21, desenvolvido por Hanai et al. (2007). Para esse loco as progênies derivadas do cruzamento CI-107 x Ouro Negro de origem sem N, foram afetadas pela seleção natural (Figura 1).



Figura 1 Padrão de bandas dos genitores CI-107 x Ouro Negro e das progênies de 1 a 31, de origem sem N, para o primer PvM-21

Considerando para o cruzamento Ouro Negro x CI-107 o alelo A¹ proveniente do genitor CI-107 e o alelo A² proveniente do genitor Ouro negro e para o cruzamento VC-5 x IAPAR-81, o alelo B¹ proveniente do genitor IAPAR-81 e o alelo B² do genitor VC-5. Foram observadas as frequências genotípicas para as progênies dos dois cruzamentos, considerando àquelas conduzidas em ambiente com N e as conduzidas em ambiente sem N. Os valores das frequências genotípicas foram submetidos ao teste χ^2 para verificar se houve diferença significativa dos valores esperados, na ausência de seleção e o observado após a condução em bulk (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 Teste χ^2 para as duas populações conduzidas em ambiente com adubação nitrogenada

Marcadores	Frequência genotípica				Frequência genotípica			
	CI 107 x Ouro Negro			χ^2	IAPAR 81 X VC-5			χ^2
	A ¹ A ¹	A ¹ A ²	A ² A ²		B ¹ B ¹	B ¹ B ²	B ² B ²	
BM143L	53	4	43	7,16**	21	0	79	34,08**
BM210	82	0	18	42,74**	74	0	26	24,59**
BM184	30	0	70	17,47**	18	0	82	42,74**
BMd-33	18	10	72	91,67**	47	3	50	2,58 ^{ns}
BMd-20	67	0	33	12,97**	86	0	14	53,76**
BMd-15	34	7	59	33,17**	----	----	----	----
PV-atcc003	----	----	----	----	51	0	49	1,30 ^{ns}
PVBR93	47	3	50	2,58 ^{ns}	83	2	15	47,28**
PvESTBR_230	61	0	39	6,16*	38	0	62	7,10**
PvESTBR_6	41	2	57	3,05 ^{ns}	58	1	41	2,98 ^{ns}
BM143F	68	3	29	17,89**	18	3	79	40,17**
BM189	61	4	35	12,99**	64	0	36	9,20**
BM205 (Banda 1)	73	1	26	22,42**	43	0	57	3,25 ^{ns}
BM205 (Banda 2)	58	0	42	3,86*	60	0	40	5,31*
PvESTBR_233	51	0	49	1,30 ^{ns}	63	0	37	8,12**
PvESTBR_76	----	----	----	----	67	6	27	34,52**
PVBR67	88	0	12	59,75**	----	----	----	----
PVBR59	68	4	28	22,35**	60	4	36	11,98**
PvESTBR_10	92	0	8	72,72**	----	----	----	----
PvM21	46	1	53	0,55 ^{ns}	49	11	40	77,98**
PvESTBR_176	56	15	29	160,82**	----	----	----	----
BM156	30	21	49	320,19**	4	5	91	88,07**
BM151	80	5	15	54,20**	----	----	----	----
PVBR31	29	11	60	86,89**	48	9	43	49,01**
PvM13A	75	0	25	26,58**	----	----	----	----
BMd-10	53	0	47	1,63 ^{ns}	----	----	----	----
PVBR-145	78	13	9	160,27**	----	----	----	----
PVESTBR-72	27	5	68	28,44**	48	2	50	0,50 ^{ns}

“Tabela 1 conclusão”

Marcadores	Frequência genotípica				Frequência genotípica			
	CI 107 x Ouro Negro				IAPAR-81 x VC-5			
	A ¹ A ¹	A ¹ A ²	A ² A ²	χ^2	B ¹ B ¹	B ¹ B ²	B ² B ²	χ^2
AZ30156-1	67	11	22	97,67**	----	----	----	----
PVESTBR-98	67	15	18	177,75**	----	----	----	----
PvM13B	73	0	27	22,69**	----	----	----	----
PVBR218	34	12	54	97,85**	----	----	----	----
PVESTBR-279	46	7	47	26,85**	66	11	23	95,88**
PVBR-45	64	8	28	50,11**	71	10	19	89,53**
PVESTBR-71	----	----	----	----	75	7	18	59,74**

A¹A¹ homocigoto semelhante ao genitor CI-107, A¹A² heterocigoto com alelos do genitor CI-107 e Ouro Negro

A²A² homocigoto semelhante ao genitor Ouro Negro; B¹B¹ homocigoto semelhante ao genitor IAPAR-81

B¹B² heterocigoto com alelos do genitor IAPAR81 E VC-5

---- ausência de polimorfismo do marcador para o cruzamento em questão

Tabela 2 Teste χ^2 para as duas populações conduzidas em ambiente sem adubação nitrogenada

Marcadores	Frequência genotípica				Frequência genotípica			
	CI-107 x Ouro Negro			χ^2	IAPAR 81 X VC-5			χ^2
	A ¹ A ¹	A ¹ A ²	A ² A ²		B ¹ B ¹	B ¹ B ²	B ² B ²	
BM143L	53	12	35	97,08**	73	0	27	22,69**
BM210	73	0	27	22,69**	85	0	15	50,88**
BM184	35	0	65	10,38**	14	0	86	53,76**
BMd-33	32	2	66	12,16**	32	12	56	99,63**
BMd-20	86	0	14	53,76**	74	0	26	24,59**
BMd-15	22	3	75	30,93**	----	----	----	----
PV-atcc003	----	----	---	----	53	0	47	1,63 ^{ns}
PV BR93	58	0	42	3,86*	56	0	44	2,72 ^{ns}
PvESTBR_230	71	0	29	19,13**	67	4	29	17,58**
PvESTBR_6	62	0	38	7,10**	47	0	53	1,63 ^{ns}
BM143F	49	8	43	37,35**	29	4	67	20,78**
BM189	72	0	28	20,87**	47	0	53	1,63 ^{ns}
BM205 (Banda 1)	74	0	26	24,59**	34	0	66	11,63**
BM205 (Banda 2)	86	0	14	53,76**	47	0	53	1,63 ^{ns}
PvESTBR_233	73	0	27	22,69**	52	0	48	1,42 ^{ns}
PvESTBR_76	----	----	----	----	73	3	24	26,80**
PVBR67	90	0	10	66,07**	---	----	----	----
PVBR59	75	6	19	50,08**	60	4	36	11,98**
PvESTBR_10	86	0	14	53,76**	----	----	----	----
PvM21	76	3	21	33,12**	48	8	44	37,15**
PvESTBR_176	54	21	25	325,05**	----	----	----	----
BM156	73	14	13	168,39**	13	5	82	59,63**
BM151	28	0	72	20,87**	----	----	----	----
PVBR31	51	11	31	83,09**	58	11	31	84,54**
PvM13A	62	0	38	7,10**	----	----	----	----
BMd-10	42	0	57	3,53 ^{ns}	----	----	----	----
PVBR-145	71	13	16	142,69**	----	----	----	----
PVESTBR-72	37	2	61	6,29**	41	4	55	8,13**
AZ30156-1	70	6	24	39,7**	----	----	----	----

“Tabela 2, conclusão”

Marcador	Frequência genotípica				Frequência genotípica			
	CI-107 x Ouro Negro				IAPAR-81 x CI-107			
	A ¹ A ¹	A ¹ A ²	A ² A ²	χ^2	B ¹ B ¹	B ¹ B ²	B ² B ²	χ^2
PVESTBR-98	50	17	33	204,24**	----	----	----	----
PvM13B	85	0	15	50,88**	----	----	----	----
PVBR218	66	14	20	153,36**	----	----	----	----
PVESTBR-279	78	0	20	35,32**	76	0	24	28,64**
PVBR-45	60	2	38	5,36*	44	12	44	93,80**
PVESTBR-71	----	----	----	----	64	13	23	129,08**

A¹A¹ homozigoto semelhante ao genitor CI-107 A¹A² heterozigoto com alelos do genitor CI-107 e Ouro Negro

A²A² homozigoto semelhante ao genitor Ouro Negro B¹B¹ homozigoto semelhante ao genitor IAPAR-81

B¹B² heterozigoto com alelos do genitor IAPAR81 E VC-5

---- ausência de polimorfismo do marcador para o cruzamento em questão

Considerando a taxa de cruzamento $T = 0,005$ e a autofecundação $S = 0,995$ e de acordo com as expressões de Allard, Jain e Workman (1968), na ausência de seleção, as proporções genotípicas esperadas em F_8 , são de 0,4938 A¹A¹ e B¹B¹, sendo as mesmas para A²A² e B²B². Já para A¹A² e B¹B², essa proporção é de 0,0124.

Para o cruzamento Ouro Negro x CI-107, os genitores foram polimórficos em 32 locos SSR e para o cruzamento IAPAR-81 x VC-5, os genitores foram polimórficos em 23 locos. Do total de primers, 20 foram polimórficos nos quatro genitores (Tabelas 1 e 2).

O teste χ^2 permitiu observar alterações nas frequências genotípicas com relação às frequências esperadas para as populações obtidas dos dois cruzamentos e nos dois níveis de N. Na população segregante Ouro negro x CI-107, conduzida com N, 27 dos 32 locos polimórficos sofreram efeito da seleção

natural ($P \leq 0,005$ ou $P \leq 0,001$). O mesmo efeito foi observado na população conduzida sem N em 31 dos e 32 locos polimórficos. Nessa última população, o único loco onde os genótipos não sofreram desvio de segregação nas duas populações foi o Bmd-10.

Na população segregante IAPAR-81 x VC-5, conduzida com N, 18 dos 23 locos polimórficos sofreram efeito da seleção natural ($P \leq 0,005$ ou $P \leq 0,001$), enquanto que na população conduzida sem N, 17 dos 23 locos sofreram o mesmo efeito. Desses locos, quatro [PVBR 93, BM189, BM205 (banda 2) e PvESTBR_233] sofreram desvio somente na população conduzida com N e três [Bmd-33, BM205 (banda 1) e PvESTBR_72] na população conduzida sem N.

Como as populações foram conduzidas em bulk, a seleção natural deve ter atuado sobre todos os locos que apresentaram χ^2 significativo, como observado no trabalho de Leite (2008) e Rodrigues e Santos (2006). Essas progênies se originaram em ambiente com e sem N, o que pode ter feito com que a pressão de seleção mantivesse na população indivíduos que possuíam locos com maior valor adaptativo, principalmente para as condições de estresse de N, sendo, portanto, mais eficientes no uso do nutriente. A seleção natural também pode ter atuado mantendo na população indivíduos com maior capacidade de resposta a adubação nitrogenada.

Alguns dos locos que foram influenciados pela seleção natural neste trabalho também foram alvos de seleção no trabalho de Rodrigues e Santos (2006), dentre eles observam-se, BM143L, BM156, BM205, BM210 e PV-atcc003. Outros também se mostraram alvos da seleção natural no trabalho de Leite (2008), como Bmd-15, Bmd-20, Bmd-33 PvM-13, PvM-21 e AZ301561.1. Tais locos podem estar relacionados à capacidade adaptativa. Dentre estes locos, o BM156, foi um loco para QTL de pequeno efeito para produção, identificado na análise conjunta da geração F_{24} e o BM210 identificado na análise conjunta da F_8 e na geração F_{24} na safra da seca

(RODRIGUES et al., 2007). O Primer BM156 também foi identificado nas análises de QTLs para produção no trabalho de Pereira et al. (2008) e Torga et al. (2010). Esses marcadores devem ter sido selecionados pela seleção natural, devido a uma maior capacidade reprodutiva dos indivíduos que possuem tais marcas.

Outros marcadores também se mostraram relacionados a alguns genes de interesse como: o primer BM10 que está relacionado ao gene que codifica a glutamina sintetase. A atividade desta enzima é um dos componentes fisiológicos que tem sido proposto como critério auxiliar na seleção de cultivares eficientes no uso de nitrogênio, já que é considerada uma enzima chave na assimilação do carbono (HIREL et al., 2001; LE GOUIS et al., 2008). Os genótipos para esses marcadores sofreram desvios de segregação nas quatro populações (Tabelas 1 e 2).

Dentre os primers desenvolvidos por Blair et al. (2003) que detectaram polimorfismo nos genitores, o primer BMD-15 faz parte de uma família de genes que codifica para a lectina ou phytohemaglutinina (PH), que são glicoproteínas presentes nos cotilédones e endospermas das sementes. Os genótipos para esse primer sofreram desvios de segregação nas duas populações obtidas do cruzamento Ouro Negro x CI-107. O primer BMD20 codifica para uma endoquinase. As proteínas quinases estão relacionadas com os processos metabólicos e celulares da planta. Essas são utilizadas para a atuação de enzimas metabólicas, entre elas a acetil CoA-carboxilase (HALFORD et al., 2003). As quinases também atuam como reguladores, através de mecanismos pós traducionais de fosforilação e desfosforilação, da atividade da nitrato redutase (KAISER; WEINER; HURBER, 1999). Os genótipos das quatro populações também sofreram desvios de segregação para esse primer (Tabelas 1 e 2).

3.2 Estimativa das frequências alélicas

As frequências alélicas observadas nas populações de cada cruzamento, originadas nos ambientes sem N e com N e representadas pelas 100 progênies F_8 podem ser observadas na Tabela 3. Como cada população segregante é derivada de dois genitores, Ouro Negro x CI-107 e VC-5 x IAPAR-81, cada genitor contribuiu com a mesma frequência alélica. Assim, na ausência de seleção natural, a frequência de cada alelo do marcador é esperada ser 0,5 mesmo após a condução da população em bulk, ressalvando-se as alterações devido a amostragem as quais deve ter sido pequena, porque as populações conduzidas em bulk possuíam em torno de 2000 sementes.

Pode-se observar na tabela 3 que a seleção natural favoreceu as plantas portadoras de alelos dos quatro genitores. Para o cruzamento CI-107 x Ouro Negro, considerando as progênies de origem com N, as frequências alélicas praticamente não se alteraram, com relação ao esperado para oito locos. Porém, para 17 locos a seleção natural favoreceu alelos do genitor CI-107, e para sete locos a seleção natural favoreceu alelos do genitor Ouro Negro. Considerando o mesmo cruzamento, para as progênies de origem sem N, para seis locos as frequências alélicas não se alteraram, para 21 locos, os alelos provenientes do genitor CI-107 foram favorecidos, e apenas cinco alelos do genitor Ouro negro foram favorecidos. Pode-se observar, portanto, que os alelos do genitor CI-107 prevaleceram nos dois ambientes, apesar de tal linhagem ser considerada responsiva e a linhagem Ouro Negro tolerante. Esse resultado não era esperado. O que se esperava era uma maior frequência de alelos provenientes do genitor Ouro Negro na população conduzida sob estresse de N, uma vez que este genitor foi considerado tolerante. Contudo, foi observada uma maior proporção de alelos do genitor CI-107 nos dois ambientes.

Apesar de a linhagem CI-107 ter sido considerada responsiva em trabalhos anteriores, não se pode descartar a possibilidade de esta linhagem apresentar alelos de tolerância ao estresse, que poderiam aumentar suas frequências em condições de estresse, ou mesmo que muitos desses alelos afetados pela seleção natural podem não estar relacionados com a eficiência do uso de N. Outra informação relevante é que, durante a condução do experimento, foram selecionados apenas grãos do tipo carioca e, segundo Gepts e Debouck (1993) existem mais de 18 genes que estão envolvidos na cor do tegumento. Esse fato pode ter contribuído para reduzir a frequência do alelo do genitor Ouro Negro.

Considerando o cruzamento IAPAR-81 x VC-5 para as progênies que se originaram em ambiente com N, sete locos praticamente não apresentaram alteração das frequências alélicas com relação ao esperado. Contudo, para 10 locos, pode-se observar que a seleção natural favoreceu os alelos provenientes do genitor IAPAR-81 e, para seis locos, a seleção natural favoreceu alelos provenientes do genitor VC-5. Considerando as progênies que se originaram sob estresse de N, para nove locos as frequências alélicas não se alteraram com relação ao esperado e, para sete locos, as frequências dos alelos provenientes do genitor IAPAR-81 foram favorecidas pela seleção natural. Já para os alelos provenientes do genitor VC-5, a seleção natural favoreceu a manutenção destes em sete locos. Para o ambiente com N, a seleção natural favoreceu um maior número de alelos provenientes do genitor responsivo (IAPAR-81), o que era esperado, uma vez que as progênies neste ambiente podem ter herdado alelos deste genitor que também permitem resposta positiva à adubação nitrogenada. Seria esperada também uma maior proporção de alelos do genitor VC-5 favorecidos pela seleção natural, já que este é considerado tolerante ao estresse de N, mas o que ocorreu foi que as progênies herdaram o mesmo número de alelos favoráveis de cada genitor, o que sugere que ambos os genitores possuem

alelos que permitem maior adaptação ao ambiente sem N. Quando os dois ambientes são observados, pode-se notar também que os alelos do genitor VC-5 aumentaram suas frequências no ambiente sob estresse de N, quando comparado ao ambiente com adubação nitrogenada.

Tabela 3 Frequências alélicas para as populações dos dois cruzamentos, Ouro Negro x CI-107 e IAPAR-81 x VC-5, para o ambiente com N e sem N

PRIMERS	COM N				SEM N			
	CI-107x Ouro Negro		IAPAR-81 x VC-5		CI-107x Ouro Negro		IAPAR-81 x VC-5	
	A ¹	A ²	B ¹	B ²	A ¹	A ²	B ¹	B ²
BM143L	0,55	0,45	0,21	0,79	0,59	0,41	0,73	0,27
BM210	0,82	0,18	0,74	0,26	0,73	0,27	0,85	0,15
BM184	0,3	0,7	0,18	0,82	0,35	0,65	0,14	0,86
BMd-33	0,23	0,77	0,485	0,515	0,33	0,67	0,38	0,62
BMd-20	0,67	0,33	0,86	0,14	0,86	0,14	0,74	0,26
BMd-15	0,375	0,625	----	----	0,235	0,765	----	----
PV-atcc003	----	----	0,51	0,49	----	----	0,53	0,47
PVBR 93F	0,485	0,515	0,84	0,16	0,58	0,42	0,56	0,44
PvESTBR_230	0,61	0,39	0,38	0,62	0,71	0,29	0,39	0,61
PvESTBR_6	0,42	0,58	0,585	0,415	0,62	0,38	0,47	0,53
BM143F	0,695	0,305	0,195	0,805	0,53	0,47	0,31	0,69
BM189	0,63	0,37	0,64	0,36	0,72	0,28	0,47	0,53
BM205 (Banda 1)	0,735	0,265	0,43	0,57	0,74	0,26	0,34	0,66
BM205 (Banda 2)	0,56	0,44	0,6	0,4	0,86	0,14	0,47	0,53
PvESTBR_233	0,51	0,49	0,63	0,37	0,73	0,27	0,52	0,48
PvESTBR_76	----	----	0,7	0,3	----	----	0,75	0,255
PVBR67	0,88	0,12	----	----	0,9	0,1	----	----
PVBR59	0,7	0,3	0,38	0,62	0,78	0,22	0,38	0,62
PvESTBR_10	0,92	0,08	----	----	0,86	0,14	----	----
PvM21	0,465	0,535	0,545	0,455	0,775	0,225	0,52	0,48
PvESTBR_176	0,635	0,365	----	----	0,645	0,355	----	----
BM156	0,40	0,60	0,065	0,935	0,8	0,2	0,16	0,845
BM151	0,825	0,175	----	----	0,28	0,72	----	----
PVBR31	0,345	0,655	0,525	0,475	0,565	0,365	0,64	0,365
PvM13A	0,75	0,25	----	----	0,62	0,38	----	----
BMd-10	0,53	0,47	----	----	0,42	0,57	----	----
PVBR-145	0,845	0,155	----	----	0,775	0,225	----	----
PVESTBR-72	0,295	0,705	0,49	0,51	0,38	0,62	0,43	0,57

“Tabela 3, conclusão”

PRIMERS	Com N				Sem N			
	CI-107x Ouro Negro		IAPAR-81 x VC-5		CI-107 x Ouro Negro		IAPAR-81 x VC-5	
	A ¹	A ²	B ¹	B ²	A ¹	A ²	B ¹	B ²
AZ30156-1	0,725	0,275	----	----	0,73	0,27	----	----
PVESTBR-98	0,745	0,255	----	----	0,585	0,415	----	----
PvM13B	0,73	0,27	----	----	0,85	0,15	----	----
PVBR218	0,4	0,6	----	----	0,73	0,27	----	----
PVESTBR-279	0,495	0,505	0,715	0,285	0,78	0,2	0,76	0,24
PVBR-45	0,68	0,32	0,76	0,24	0,61	0,39	0,5	0,5
PVESTBR-71	----	----	0,785	0,215	----	----	0,71	0,295

A¹ - alelo proveniente do genitor CI-107, A² - alelo proveniente do genitor Ouro Negro

B¹ - alelo proveniente do genitor IAPAR-81, B² - alelo proveniente do genitor VC-5

---- ausência de polimorfismo do marcador para o cruzamento em questão

Efeitos variáveis da seleção natural em diferentes locos para diferentes caracteres podem ser observados em outros trabalhos como Allard (1999), Allard e Hansche (1964), Allard e Workman (1963), Leite (2008) e Rodrigues e Santos (2006). Segundo os autores, os alelos favorecidos pela seleção natural estão associados à maior adaptação a ambientes particulares, podendo tais alelos selecionados estarem associados à adaptação ao estresse de N.

3.3 Estimativas dos coeficientes de adaptabilidade relativa acumulados

Os coeficientes de adaptabilidade relativa foram estimados para os genótipos em homozigose, para cada par de primer selecionado, considerando cada cruzamento e cada nível de N estudado. Considerando os alelos A¹ e B¹ provenientes dos genitores CI-107 e IAPAR-81, considerados responsivos e os

alelos A^2 e B^2 provenientes dos genitores Ouro Negro e VC-5, considerados tolerantes, foram estimados ω_1 para os genótipos A^1A^1 e B^1B^1 e ω_3 para os genitores A^2A^2 e B^2B^2 . O coeficiente de adaptabilidade relativa do heterozigoto A^1A^2 e B^1B^2 , ω_2 foi considerado igual a 1,0 (ALLARD; HANSCH, 1964; ALLARD; WOLKMAN, 1963). As estimativas de ω_1 e ω_3 iguais a 1,0 indicam que não ocorreu seleção natural desses genótipos, ou seja, eles apresentaram mesma eficiência reprodutiva do heterozigoto (ALLARD; HANSCH, 1964). Para valores de ω_1 e ω_3 menores que 1,0 a seleção natural atuou reduzindo a frequência desse genótipo em relação ao heterozigoto e para valores de ω_1 e ω_3 maiores que 1,0 a seleção natural aumentou a frequência de homozigotos em relação ao heterozigoto, que é nesse caso o de menor adaptabilidade (HEDRICK, 1999).

As estimativas dos coeficientes de adaptabilidade relativa acumulado (ω_1 e ω_3) para o cruzamento IAPAR-81 x VC-5 variaram de 0,066 a 0,615 para ω_1 e de 0,036 a 0,423 para ω_3 , considerando as progênies originadas em ambiente sem adubação nitrogenada. Já para o mesmo cruzamento, as progênies originadas com N, os valores de ω_1 variaram de 0,020 a 1,46 e os valores de ω_3 variaram de 0,048 a 1,03. Considerando as estimativas dos coeficientes de adaptabilidade relativa (ω_1 e ω_3) para as progênies provenientes do cruzamento CI-107 x IAPAR-81 e originadas em ambiente sem N, os valores de ω_1 variaram de 0,065 a 0,758 e os valores de ω_3 variaram de 0,023 a 0,834. Já para o mesmo cruzamento, as progênies originadas em ambiente com adubação nitrogenada tiveram valores de ω_1 variando de 0,036 a 1,845 e valores de ω_3 variando de 0,03 a 1,34.

É importante lembrar que esses coeficientes acumulados referem-se ao efeito da seleção natural sobre os indivíduos com locos em homozigose da geração F_2 a F_7 , durante seis gerações. Os valores de adaptabilidade variaram muito de loco para loco, indicando que a intensidade de seleção para cada loco

também foi particular. Pode-se, notar na tabela 4, que os valores médios do coeficiente de adaptabilidade acumulado para o ambiente com N foram superiores àqueles obtidos no ambiente sem N, independente do cruzamento, o que indica que a ação da seleção natural foi mais intensa no ambiente sem N. Pode-se observar ainda que para os ambientes com adubação nitrogenada, os valores de adaptabilidade atingiram limites superiores bem maiores, tanto considerando ω_1 quanto considerando ω_3 , aparecendo ainda coeficientes maiores do que 1, o que significa que para alguns locos, como o PV 93, Pv ESTBR_6 e PvM-21 a adaptabilidade do homozigoto foi superior a do heterozigoto.

Nota-se ainda que os valores do coeficiente de adaptabilidade dos homozigotos provenientes de alelos dos genitores responsivos (ω_1) foram em média superiores aqueles provenientes de alelos dos genitores tolerantes (ω_3). Os maiores valores de ω_1 em relação a ω_3 , foram observados para alguns locos em todas as populações (PVBR31, PVBR59, PvM21 e PVBR45), para alguns locos para o cruzamento IAPAR-81 x VC-5 (PvESTBR_230, PvESTBR_76 e PV BR93) e também para o cruzamento CI-107 x Ouro Negro (BM143L, PvESTBR_176 e PVESTBR-98). Esse resultado indica que a seleção natural foi mais intensa sobre os homozigotos para os alelos provenientes dos genitores tolerantes, para as progênies originadas nos dois cruzamentos e nos dois níveis de N (Tabela 4).

Alguns locos homozigóticos provenientes dos genitores tolerantes também apresentaram maiores valores de adaptabilidade como BMd-33 e PVESTBR-72 para os dois cruzamentos e os dois níveis, os locos BMd-15 e PV BR93 para o cruzamento CI-107 x Ouro Negro e os locos BM143F e BM156 para o cruzamento IAPAR-81 x VC-5. No caso desses locos a seleção natural aparentemente foi mais intensa sobre os homozigotos com alelos provenientes do genitor responsivo.

Em função da ausência de indivíduos heterozigóticos, não foi possível estimar ω_1 e ω_3 acumulados para alguns primers nos dois cruzamentos e níveis de N, uma vez que o coeficiente de adaptabilidade relativa é calculado em comparação ao heterozigoto, cujo coeficiente (ω_2) é considerado um. Apesar de não terem sido detectados heterozigotos para alguns locos, a frequência esperada deste genótipo na ausência da seleção natural é de 0,0124, tal frequência se deve ao modo de reprodução do feijoeiro que é uma espécie tipicamente autógama. Portanto, as frequências de locos onde foram observados heterozigotos em uma amostra de 100 plantas para cada cruzamento e em cada nível, foram bastante elevadas, denotando a superioridade adaptativa do heterozigoto. A manutenção do heterozigoto na população é uma forma de reter a variabilidade genética na população, sendo nestes casos o genótipo heterozigótico favorecido pela seleção natural (ALLARD; WORKMAN, 1963). Pode-se inferir que o elevado número de locos heterozigóticos de microssatélites, em gerações avançadas de autofecundação, deve-se referir a regiões genômicas que contribuem para maior adaptação e, nesse caso em especial, alelos adaptativos ao estresse de N e também responsivos. Como se trata de heterozigotos, a princípio, pode estar relacionado a regiões genômicas cujos efeitos genéticos de dominância são importantes para adaptação.

Tabela 4 Estimativas por loco dos coeficientes de adaptabilidade relativa acumulados das populações originados dos dois cruzamentos e os dois níveis

Primer	Progênes sem nitrogênio				Progênes com nitrogênio			
	IAPAR 81 xVC-5		Ouro negro x CI 107		IAPAR 81 xVC-5		Ouro negro x CI 107	
	ω_1	ω_3	ω_1	ω_3	ω_1	ω_3	ω_1	ω_3
BM143L	----	----	0,112	0,074	----	----	0,335	0,272
BM210	----	----	----	----	----	----	----	----
BM184	----	----	----	----	----	----	----	----
BMd-33	0,067	0,118	0,404	0,834	0,396	0,421	0,045	0,182
BMd-20	----	----	----	----	----	----	----	----
BMd-15	----	----	0,185	0,632	----	----	0,123	0,213
PV-atcc003	----	----	----	----	----	----	----	----
PV BR93	----	----	----	----	1,049	0,190	0,396	0,421
PvESTBR_230	0,234	0,183	----	----	----	----	----	----
PvESTBR_6	----	----	----	----	1,466	1,036	0,518	0,720
BM143F	0,183	0,423	0,155	0,136	0,152	0,666	0,573	0,244
BM189	----	----	----	----	----	----	0,385	0,221
BM205(Banda 1)	----	----	----	----	----	----	1,845	0,657
BM205(Banda 2)	----	----	----	----	----	----	----	----
PvESTBR_233	----	----	----	----	----	----	----	----
PvESTBR_76	0,615	0,202	----	----	0,282	0,114	----	----
PVBR67	----	----	----	----	----	----	----	----
PVBR59	0,379	0,227	0,316	0,080	0,379	0,227	0,430	0,177
PvESTBR_10	----	----	----	----	----	----	----	----
PvM21	0,152	0,139	0,640	0,177	0,113	0,092	1,163	1,340
PvESTBR_176	----	----	0,065	0,030	----	----	0,094	0,049
BM156	0,066	0,415	0,132	0,023	0,020	0,460	0,036	0,059
PVBR31	0,133	0,071	0,117	0,071	0,135	0,121	0,067	0,138
PvM13A	----	----	----	----	----	----	----	----
BMd-10	----	----	----	----	----	----	----	----
PVBR145	----	----	0,138	0,031	----	----	0,152	0,017
PVESTBR-72	0,259	0,348	0,468	0,771	0,607	0,632	0,136	0,344
AZ30156-1	----	----	0,295	0,101	----	----	0,154	0,051
PVESTBR-98	----	----	0,074	0,049	----	----	0,113	0,030

“Tabela 4, Conclusão”

Primer	Progênes sem nitrogênio				Progênes com nitrogênio			
	IAPAR 81 xVC-5		Ouro negro x CI 107		IAPAR 81 xVC-5		Ouro negro x CI 107	
	ω_1	ω_3	ω_1	ω_3	ω_1	ω_3	ω_1	ω_3
PvM13B	----	----	----	----	----	----	----	----
PVBR218	0,119	0,036	0,119	0,036	----	----	0,072	0,114
PVESTBR-279	----	----	----	----	0,152	0,053	0,166	0,170
PVBR45	0,093	0,093	0,758	0,480	0,179	0,048	0,202	0,088
PVESTBR-71	0,124	0,045	----	----	0,271	0,065	----	----
BM151	0,404	0,076	----	----	----	----	----	----
ω média	0,217	0,183	0,276	0,246	0,400	0,317	0,351	0,275

3.4 Identificação de QTLs

A partir dos dados de genotipagem das 79 progênes, foram selecionados inicialmente alguns marcadores que não segregaram no grupo de progênes com os maiores índices de resposta ao uso de N (α) e no grupo de menores valores de α . Isso foi realizado porque valores médios para caracteres quantitativos, como o α , tendem a reduzir a correlação QTL marca. Foram selecionadas 12 progênes que possuíam os maiores valores de α e 12 progênes que possuíam os menores valores de α , e foi realizada a correlação e regressão linear simples entre as marcas e os índices. Observa-se que para quatro locos, o BMD-20, PVBR93, PvESTBR-230 e PvESTBR-233, os valores de F foram significativos, indicando que tais marcadores permitiram diferenciar os grupos, pelo menos parcialmente (Tabela 5). Ainda foi observada uma correlação relativamente alta, uma vez que o caráter é quantitativo, e também um R^2 alto, indicando que estes quatro marcadores, desconsiderando os valores intermediários, explicaram de 17,84% a 42,92 % da variação do caráter. Quando os quatro marcadores foram avaliados utilizando a regressão múltipla pelo método de *backward*, pode-se

observar que apenas dois locos foram selecionados o BMd-20 e o PvESTBR-230, obtendo se um R^2 de 59,11% uma vez que este método elimina os marcadores considerados redundantes (DRAPPER; SMITH, 1998).

Tabela 5 Resumo das análises de regressão linear e múltipla, para os indivíduos com valores extremos do índice de resposta ao N (α).

Primers	Média de α		Pr>F	r (%)	R ² (%)adj
	A ¹ A ¹	A ² A ²			
BMd-20	11,13	3,17	0,0004	65,52	42,92
PVBR 93	4,4	12,74	0,0118	48,06	23,1
PvESTBR- 230	4,74	10,85	0,0051	53,13	28,23
PvESTBR- 233	4,35	11,97	0,0253	42,23	17,84
BMd-20 + PvESTBR- 230			0,001	76,88	59,11

A¹A¹ genótipo do genitor responsivo (CI-107 e IAPAR-81) A²A² genótipo do genitor tolerante (Ouro Negro e VC-5)

À exceção do primer PvESTBR-230, quando todas as progênies foram consideradas na análise por ponto, percebe-se que os mesmos primers mostraram diferença significativa, confirmando que estes marcadores explicaram uma parcela da variação fenotípica observada (Tabela 6) . Nota-se também que os valores de R^2 foram menores que aqueles obtidos a partir dos valores extremos de α , já que os valores intermediários reduziram a correlação QTL marcador. Além disso, de acordo com Bernardo (2002), deve se considerar que é mais difícil identificar QTLs em populações pequenas, além do fato de que eles podem estar superestimados. Como a avaliação para os extremos de α utilizou apenas 24 indivíduos, os valores de R^2 podem estar superestimados neste caso, da mesma forma que aqueles obtidos com a utilização de todas as progênies, já que a população final avaliada constituiu-se de apenas 79 progênies.

Tabela 6 Resumo das análises por ponto para os índices de resposta de N (α), considerando as 79 progênies dos dois cruzamentos independente da origem

Primers	Média de α por ponto		F	R ² (%)
	A ¹ A ¹	A ² A ²		
BMd-20	8,44	5,4	21,91**	22,15
PVBR 93	5,72	8,7	8,66**	17,7
PvESTBR- 230	6,21	7,7	1,89 ns	11,2
PvESTBR- 233	6,02	8,42	4,89*	

*, ** significativo a 5% e 1%

Foram feitas também a regressão linear simples e a regressão linear múltipla pelo método de *backward*, para cada safra e cada nível de N, para o índice de resposta ao N (Tabelas 7 e 8), considerando todas as progênies avaliadas em campo no experimento de inverno de 2009, com o objetivo de verificar os marcadores identificados a partir dos valores extremos de α e pela análise por ponto.

Na tabela 7, pode-se notar que três dos marcadores identificados a partir dos valores extremos do índice de resposta (α) e na análise por ponto também foram identificados na regressão linear simples. Esses três foram significativos na safra de inverno e na conjunta. Apenas o PVBR93 foi significativo na safra das águas, lembrando que, nessa safra, a precisão experimental no experimento com N foi menor em função do grande desenvolvimento vegetativo das progênies, sendo, portanto, difícil identificar um QTL estável para tal ambiente. Outro fator que deve ser considerado é à incidência de doenças como a antracnose, que foi mais intensa na safra das águas, afetando também o desempenho das progênies. Os valores dos coeficientes de determinação (R^2_{adj}) para tais marcadores variaram de 3,84%, para o marcador PVBR93 na safra das águas, a 20,1% , para o marcador PvESTBR-233 na safra de inverno. Portanto, esses marcadores explicam uma parcela reduzida da variação fenotípica

observada. Contudo, os resultados foram semelhantes aos obtidos por Agrama (1999) para produção de grãos de milho com níveis altos e baixos de N, onde os QTLs identificados explicaram de 7,1% a 14,1% da variação fenotípica.

Tabela 7 Resumo das análises de regressão linear simples, considerando cada marcador separadamente, para o índice de resposta ao N (α) e estimativa do coeficiente de determinação ajustado (R^2_{adj}), considerando todas as progênies dos dois cruzamentos

Épocas	marcadores	F	Pr > F	R ² (%)	R ² adj(%)
Águas	PVBR 93	3,96	0,049	5,24	3,84
	BMd-20	10,5	0,0019	13,37	12,1
Inverno	PVBR 93	7,39	0,0083	9,8	8,47
	PvESTBR- 233	18,36	<.0001	21,26	20,1
Conjunta	BMd-20	10,93	0,0015	13,84	12,58
	PVBR 93	12,44	0,0008	15,47	14,22
	PvESTBR- 233	8,24	0,0055	10,81	9,49

Outra observação interessante é que para o marcador BMd-20, que mostrou uma associação com os valores de α em todas as análises, a frequência dos alelos dos genitores responsivos, que possuem altos índices, aumentou nas quatro populações (Tabela 3), indicando que a seleção natural atuou de forma a selecionar tais alelos, que podem estar relacionados com uma maior capacidade de resposta. Deve-se destacar que tal marcador foi construído a partir do cDNA de um gene que codifica para uma endoquinase. As quinases atuam como reguladoras, através de mecanismos pós traducionais de fosforilação e desfosforilação da atividade da nitrato redutase e a atividade desta enzima tem sido proposta como um critério auxiliar na seleção de cultivares eficientes no uso de N (KAISER; WEINER; HURBER, 1999). Portanto, este primer é um marcador em potencial para eficiência no uso de N.

Na tabela 8, na análise de regressão linear múltipla pelo método de seleção *backward* para o índice de resposta ao N, nota-se que o primer PVBR 93, identificado pela regressão linear nas duas safras e na conjunta, não apareceu no inverno, uma vez que tal método de seleção exclui marcadores considerados redundantes. Além disso, acrescentou marcadores não identificados na regressão linear simples, pois, na múltipla, com a eliminação dos redundantes, novos marcadores quando avaliados em grupo se mostram explicativos. Os valores do coeficiente de determinação variaram de 5,67%, quando apenas um marcador foi selecionado, a 35,6% no inverno, quando foram selecionados três marcadores. É importante enfatizar o marcador BMd 20 como o mais estável e sempre explicando uma parcela considerável do índice de resposta ao N. Vale destacar também o PvESTBR- 233, especialmente no inverno de 2009, quando as condições foram mais favoráveis para a avaliação do índice de resposta.

Tabela 8 Resumo das análises de regressão linear múltipla, pelo método de seleção *backward*, do índice de resposta ao N, em cada safra e em cada nível, para as progênies dos dois cruzamentos independente da origem

Épocas	Marcadores	F	Pr> F	R ²
Águas	PVBR 93	3,96	0,049	5,67
Inverno	BMd-20+PvESTBR-233+PVBR59	12,03	<.0001	35,36
Conjunta	BMd-20+ PVBR 93+BM205 ^{bl}	7,61	0,0002	25,69

As regressões linear simples e múltipla foram realizadas para observar se os locos identificados para todas as progênies independentemente de sua origem também foram identificados quando apenas as progênies de origem sem N foram consideradas. A partir da análise de regressão linear para o índice de

resposta ao uso de nitrogênio para as progênies de origem sem N, pode-se observar que os marcadores BMd-20 e PVBR 93F, identificados para todas as progênies, também foram significativos para as progênies de origem sem N, na safra de inverno e na conjunta (Tabela 9). Portanto, mais um indício de que tais locos podem estar diretamente relacionados à eficiência no uso de N.

Tabela 9 Resumo das análises de regressão linear considerando cada marcador, para o índice de resposta ao N, em cada safra para as progênies dos dois cruzamentos de origem sem N

Épocas	Marcadores	F	Pr, F	R ²	R ² adj
Águas	BM184	7,19	0,0123	21,04	18,11
Inverno	BMd-20	6,61	0,016	19,66	16,68
	PVBR 93F	3,75	0,05	12,2	8,95
	PvESTBR_233	4,2	0,048	13,46	10,26
	PvM21				
Conjunta	BMd-20	4,59	0,0387	11,05	8,64
	PVBR 93F	5,16	0,0313	16,05	12,94
	BM205 ^{bl}	5,65	0,0248	17,3	14,23

Observando também a análise de regressão linear múltipla pelo método de *backward*, para os índices de resposta ao N considerando apenas as progênies de origem sem N, nota-se que o marcador BMd-20, foi identificado novamente, apesar do PVBR 93 não ter sido identificado na safra de inverno, o que pode ter ocorrido devido a sua redundância com outro marcador (Tabela 10). Os valores de R² foram muito elevados. Contudo, um grande número de marcadores foi selecionado, indicando que as progênies derivadas de populações conduzidas em ambiente sem N, aliado ao uso de microssatélites também selecionados nessas populações contribuíram para a explicação de alta porcentagem da variação

fenotípica. Vale lembrar, no entanto, que populações pequenas também causam superestimativa dos valores de R^2 .

Tabela 10 Resumo das análises de regressão múltipla, pelo método de *backward*, considerando cada marcador, para o índice de resposta ao N, em cada safra, para as progênies dos dois cruzamentos de origem sem N

Épocas	Marcadores	F	Pr> F	R ²
Águas	BM143L + BM210 + BM184+ BMd-33 + PvESTBR_230+ PvESTBR_6+ BM189+ BM205 ^{bl} + PvESTBR_76+ PVBR67+ PVBR59+ PvESTBR_10	8,38	0,0001	87,9
Inverno	BMd-20+ BM189+ PvM21	7,35	0,0011	46,88
Conjunta	BM143L + BM210 + BM184+ BMd-33 + BMd- 20+ PVBR 93F + BM205 ^{bl}	13,25	<.0001	89,55

O ganho com a seleção assistida por marcadores moleculares será maior quando a proporção da variação explicada pelo marcador for maior que a herdabilidade do caráter (BERNARDO, 2002). Considerando a herdabilidade do índice de resposta ao N, obtida no capítulo anterior, igual a 30,23%, nota-se que valores dos coeficientes de determinação para a regressão linear múltipla foram maiores que a herdabilidade. Isso indica que a seleção assistida deve ser eficiente tanto para todas as progênies, principalmente para a safra de inverno, quanto para apenas as progênies com os valores extremos de (α) e as progknies de origem sem N.

Como o principal interesse da resposta do feijoeiro ao N refere-se à produtividade de grãos, também foram identificados os possíveis marcadores de QTLs desse caráter na presença e na ausência de N. Os resultados das análises

de regressão linear simples para cada marcador e para os dados de produção de grãos independente da origem estão apresentados na tabela 11.

Tabela 11 Resumo das análises de regressão linear considerando cada marcador, para produção de grãos, em cada safra e em cada nível, para as progêneses dos dois cruzamentos independente da origem

Épocas	Níveis	Marcadores	F	Pr> F	R ²	R ² adj
Águas	CN	BM210	4,28	0,0423	5,94	4,54
Águas	SN	BM184	6,16	0,0155	8,31	6,96
	SN	BM189	4,09	0,047	5,68	4,29
Inverno	CN	BMd-15	4,62	0,0351	6,36	4,99
	CN	PvESTBR-233	22,81	<.0001	25,12	24,01
	CN	PvM-21	4,82	0,0316	6,62	5,24
Inverno	SN	BMd-20	8,6	0,0046	11,23	9,92
	SN	PVBR 93	12,6	0,0007	15,63	14,39
Conjunta	CN	PvESTBR-233	7,22	0,0091	9,59	8,27
	SN	BMd-20	6,65	0,0121	8,9	7,56
Conjunta	SN	PVBR 93	8,63	0,0045	11,27	9,96
	SN	BM189	4,2	0,0442	5,82	4,44

CN: com nitrogênio SN: sem nitrogênio

Pode-se observar que alguns dos marcadores identificados para o índice de resposta ao N também foram significativos para produção de grãos como, por exemplo, BMd-20, PVBR 93 e PvESTBR-233, sendo o primeiro e o segundo identificados na safra de inverno e na conjunta dos experimentos sem N e o terceiro, identificado no inverno e na análise conjunta com N (Tabela 11). Pode-se notar que os valores dos coeficientes de determinação variaram de 4,54% a 24,01%. O primeiro que mais explicou a variação para produção de grãos para os experimentos com N foi o PvESTBR-233. Já para os experimentos sem N o mais explicativo foi o PVBR93. Ambos os primeiros apresentaram correlação com o índice de resposta ao N, evidenciando, mais uma vez, estarem relacionados à

eficiência do uso de N. Nota-se que os QTLs identificados para um mesmo nível não foram os mesmos nas duas safras, isso pode ter ocorrido devido à interação genótipo x ambientes, como aconteceu no estudo de Le Gouis et al. (2008) sobre a eficiência no uso de N em trigo, em que dos dezoito QTLs identificados para atividade da enzima glutamato desidrogenase, apenas um apareceu nos três ambientes avaliados e três deles foram identificados em dois ambientes, os outros dez foram identificados apenas em um ambiente. O fato de os QTLs não terem sido os mesmos nas duas safras pode ter ocorrido devido ao grande desenvolvimento vegetativo na safra das águas, o que teria afetado a produção de grãos e a resposta ao N (GRANT et al., 2001). A maior intensidade de doenças como a antracnose na safra das águas também pode ter influenciado nos resultados.

Quarrie et al. (2005), verificaram que, para produção, QTLs -- detectados sob baixa condição de fertilização de N -- podem ser utilizados para melhorar a estabilidade produtiva por combinação de QTLs relacionados à produção que são expressos em ambientes com baixo N.

Deve-se ressaltar que se o objetivo é obter cultivares que produzam bem em condições de estresse de N os marcadores de maior importância são aqueles obtidos para o mesmo ambiente, uma vez que possibilitaria selecionar linhagens mais produtivas dentro deste ambiente. Contudo, também é interessante obter linhagens que produzem mais em condições de adubação nitrogenada, sendo também interessante identificar QTLs para tal ambiente, pois permitiria recomendação de cultivares para uso mais amplo como vem sendo normalmente realizada.

Na tabela 12 estão apresentados os marcadores selecionados pela regressão linear múltipla, utilizando o método *backward*, para os dados de produção de grãos independente da origem. Os valores dos coeficientes de determinação obtidos variaram de 5,93%, quando foi selecionado apenas um

marcador no experimento com N na safra das águas, a 40,17%, quando foram selecionados quatro marcadores, no experimento com N na safra de inverno. Nas conjuntas, sem N e com N, observa-se que houve a seleção de três marcadores para os experimentos sem N e 5 marcadores para o experimento com N, com valores dos coeficientes de determinação de 23,55% e 29,58%, respectivamente, indicando uma pequena contribuição para cada primer selecionado. Nota-se que dos marcadores comuns ao índice de resposta ao N, apenas o BMd-20 que se mostrou importante na regressão linear simples do inverno e conjunta, não apareceu novamente na análise de regressão múltipla, uma vez que o método de seleção de modelos descarta aqueles considerados redundantes (DRAPER; SMITH, 1998). Entretanto, dada a estabilidade do BMd-20 para resposta ao N e também para a produtividade de grãos, ele também deve ser considerado na seleção assistida.

Tabela 12 Resumo das análises de regressão linear múltipla, pelo método de seleção *backward*, para produção de grãos, em cada safra e em cada nível, para as progênes dos dois cruzamentos independente da origem

Épocas	Níveis	Marcadores	F	Pr> F	R ² (%)
Águas	SN	BM184+BM189	6,82	0,002	16,91
Águas	CN	BM210	4,28	0,0423	5,93
Inverno	SN	PVBR93	12,6	0,0007	15,63
Inverno	CN	BM143L+PvESTBR-230+ PvESTBR- 233+PvESTBR-10	10,91	<.0001	40,17
Conjunta	SN	BM184+ PVBR93+ BM189	6,78	0,0005	23,55
Conjunta	CN	BM143L+BM210+ BM189+ BM205+ PvESTBR- 233+PvESTBR-10	4,41	0,0009	29,58

As progênies originadas em ambiente sem N, que sofreram ação da seleção natural, devem estar mais adaptadas a este meio, podendo com isso apresentarem maior capacidade reprodutiva a este meio que aquelas que originaram em ambiente com adubação nitrogenada. Apesar de terem sofrido ação da seleção natural essas progênies possuem alelos diferentes para adaptação e capacidade reprodutiva, apresentando, portanto, variabilidade suficiente para a distinção destas progênies. A identificação de QTLs para essas progênies é interessante e permite inferir se os QTLs úteis para tais progênies foram selecionados pela seleção natural e ainda, observar se estes QTLs são os mesmos identificados para todas as progênies independente da origem.

Pode-se observar na tabela 13 que os marcadores identificados para o experimento sem N, na safra de inverno, foram os mesmos identificados utilizando-se todas as progênies, e também considerando os índices de reposta (α). Contudo, na análise conjunta sem N, apenas o PVBR 93 se manteve para as progênies de mesma origem dos experimentos. Isso deve ter ocorrido por influência da safra das águas na qual o marcador BMd-20 não foi identificado. Dos marcadores úteis para a safra das águas sem N, o BM184 foi obtido tanto considerando todas as progênies, quanto considerando apenas as progênies de mesma origem. Para a safra de inverno com N o primer PvESTBR-233 também foi identificado considerando todas as progênies ou apenas as de origem sem N.

Os marcadores comuns considerando todas as progênies e apenas as de origem sem N, podem ter sido alvos da seleção natural neste último ambiente. Nota-se que para o marcador PvESTBR-233, que mostrou diferença significativa no cruzamento Ouro Negro x CI-107 o alelo do genitor responsivo, o CI-107, foi o de maior frequência (Tabela 3). Para o cruzamento IAPAR-81 x VC-5 não houve diferença significativa no teste χ^2 , não mostrando portanto ter sido influenciado pela seleção natural. O mesmo foi observado para o marcador PVBR 93. Para o marcador BM184 a seleção natural atuou nos dois

cruzamentos, favorecendo o alelo proveniente do genitor tolerante que pode estar relacionado à EUN.

Tabela 13 Resumo das análises de regressão linear considerando cada marcador, para produção de grãos, em cada safra e em cada nível, para as progênes dos dois cruzamentos de origem sem N

Épocas	Níveis	Marcadores	F	Pr > F	R ²	R ² adj
Águas	SN	BM184	12,09	0,0016	29,42	26,99
	SN	BMd-33	4,2	0,0495	12,66	9,65
Inverno	CN	BM143F	4,25	0,0482	12,79	9,79
	CN	PvESTBR-233	6,26	0,0183	17,75	14,91
	CN	PvM21	11,47	0,0021	28,33	25,86
Inverno	SN	BMd-20	4,52	0,0422	13,48	10,49
	SN	PVBR 93	10,1	0,0035	25,82	23,26
	CN	BM205 b1	6,39	0,0172	18,06	15,23
Conjunta	CN	PvM21	4,84	0,036	14,3	11,34
	SN	BM184	4,85	0,0355	14,36	11,41
Conjunta	SN	PVBR 93	5,93	0,0213	16,97	14,11

Para a análise de regressão linear múltipla (Tabela 14), pode se observar que principalmente para a safra das águas com N um grande número de marcadores foi selecionado pelo método de *backward*, isso faz com que os valores de R² sejam elevados e esses valores podem ainda estar superestimados devido ao número reduzido de progênes avaliadas, nesse caso apenas as 39 progênes de origem sem N (BERNARDO, 2002). Alguns marcadores comuns como o PVBR93 permaneceram, os redundantes como o BMd-20 foram retirados e outros foram inseridos. Observa-se mais uma vez que o BMd-20 teve suas frequências alélicas fortemente alteradas pela seleção natural (Tabelas 1, 2 e 3) tendo sido selecionados os alelos do CI-107 e IAPAR-81, que são

considerados responsivos, apesar dele ter se mostrado importante, principalmente no ambiente sem N. Nota-se mais uma vez que marcadores identificados apenas para as progênies de origem sem N e que foram explicativos para toda população podem estar relacionados com a eficiência no uso do N e devem ser utilizados na seleção assistida.

Considerando os valores de herdabilidade para produção de grãos obtidos no segundo capítulo, a seleção assistida para esse caráter não foi tão eficiente quanto para o índice de resposta, uma vez que na análise de QTLs para todas as progênies os valores de R^2 obtidos foram todos menores que a herdabilidade. Já para as progênies de origem sem N, percebe-se que no experimento com N da safra das águas e no experimento sem N da safra de inverno a parcela da variação explicada pelos marcadores foi maior que a herdabilidade, havendo nesses casos a possibilidade da seleção assistida ser mais eficiente.

Tabela 14 Resumo das análises de regressão múltipla, pelo método de *backward*, considerando cada marcador, para produção de grãos, em cada safra e em cada nível, para as progênies dos dois cruzamentos de origem sem N

Épocas	Níveis	Marcadores	F	Pr > F	R ²
Águas	SN	BM184	12,09	0,0016	29,42
Águas	CN	BM143L+BM210+ BM184+ PVBR 93 PvESTBR_6+ BM205 ^{b1} + PVBR-67 PvESTBR-76 + PvESTBR_10	4,09	0,0037	63,69
Inverno	SN	PVBR 93 vESTBR_6+ BM205 ^{b2}	6,47	0,0009	49,87
Inverno	CN	PvM21	11,47	0,0021	28,33
Conjunta	SN	BM184 + PVBR 93 + BM205 ^{b2}	6,93	0,0013	43,5
Conjunta	CN	BM205 ^{b1}	6,39	0,0172	18,06

4 CONCLUSÕES

A seleção natural atua em vários locos microssatélites que podem estar associados à regiões genômicas específicas para maior eficiência do uso de N;

Vários marcadores foram identificados como potenciais para seleção assistida, visando à eficiência ao uso de N, com destaque para o BMd-20 e PVBR-93 que foram mais estáveis.

REFERÊNCIAS

AGRAMA, H. A. S. et al. Identification of quantitative trait loci for nitrogen use efficiency in maize. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 5, n. 2, p. 187-195, May 1999.

ALLARD, R. W. **Principles of plant breeding**. 2. ed. New York: J. Wiley, 1999. 254 p.

ALLARD, R. W.; HANSCHKE, P. E. Some parameters of population variability and their implications in plant breeding. **Advances in Agronomy**, New York, v. 16, p. 281-325, 1964.

ALLARD, R. W.; JAIN, S. K.; WORKMAN, P. L. The genetics of inbreeding populations. **Advance in Genetics**, New York, v. 14, p. 55-131, 1968.

ALLARD, R. W.; WORKMAN, P. L. Population studies in predominantly selfpollinated species: IV., seasonal fluctuations in estimated of genetic parameters in lima bean populations. **Evolution**, Washington, v. 17, n. 4, p. 470-480, 1963.

BEAN IMPROVEMENT COOPERATIVE. **Genetics**: bean SSR primers. Washington, 2007. Disponível em: <<http://www.css.msu.edu/bic>>. Acesso em: 10 mar. 2010.

BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. Woodbury: Minesota, 2002. 368 p.

BLAIR, M. W. et al. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 107, n. 8, p. 1362-1374, Nov. 2003.

DIAGUO, A. et al. Mapping QTLs for nitrogen uptake in relation to the early growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 284, n. 1/2, p. 73-84, Nov. 2006.

DRAPER, N. R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. 3. ed. New York: J. Wiley, 1998. 736 p.

FERREIRA, D. F. **Eficiência de métodos de mapeamento de locos quantitativos (QTLs) e da seleção assistida por marcadores moleculares através de simulação**. 1995. 210 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1995.

FURTINI, I. V. et al. Natural selection for nitrogen use efficiency in common bean population. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Washington, v. 52, p. 130-131, 2009.

GALLAIS, A.; HIREL, B. An approach of the genetics of nitrogen use efficiency in maize. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 1, p. 295-306, Feb. 2004.

GEPTS, P.; DEBOUCK, D. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: SCHOONHOVEN, A. van; VOYSEST, O. (Ed.). **Common beans: research for crop improvement**. Cali: CAB International, 1993. p. 7-53.

GRANT, C. A. et al. A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 95, p. 1-11, set. 2001.

HALFORD, N. G. et al. Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 382, p. 467-475, Jan. 2003.

HANAI, L. R. et al. Development, characterization, and comparative analysis of polymorphism at common bean SSR loci isolated from genic and genomic sources. **Genome**, Ottawa, v. 50, n. 3, p. 266-277, Mar. 2007.

HEDRICK, P. W. **Genetics of populations**. 2. ed. Sudbury: J. Bartlett, 1999. 553 p.

HIREL, B. et al. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. **Plant Physiology**, Washington, v. 125, n. 3, p. 1258-1270, Mar. 2001.

KAISER, W. M.; WEINER, H.; HURBER, S. C. Nitrate reductase in higher plants: a case study for transduction for environmental stimuli into control of catalytic activity. **Physiology Plant**, Washington, v. 105, n. 2, p. 385-390, Feb. 1999.

LE GOUIS, J. L. et al. Genetic analysis of wheat nitrogen use efficiency: coincidence between QTL for agronomical and physiological traits. In: INTERNATIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM, 11., 2008, Sydney. **Proceedings...** Sydney: Sydney's University, 2008. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/2123/3217>>. Acesso em: 10 fev. 2010.

LEITE, M. E. **Efeito da seleção natural em alelos microssatélite do feijoeiro**. 2008. 50 p. Monografia (Graduação em Ciências biológicas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

MACCAFERRI, M. et al. QTLs for yield and adaptation to reduced water and nitrogen inputs in durum wheat. In: INTERNATIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM, 11., 2008, Sydney. **Proceedings...** Sydney: Sydney's University, 2008. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/2123/3356>>. Acesso em: 20 mar. 2010.

MARQUES JÚNIOR, O. G.; RAMALHO, M. A. P. Determinação da taxa de fecundação cruzada do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) nas diferentes épocas de semeadura em Lavras, MG. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 19, n. 3, p. 339-341, jul./set. 1995.

PEREIRA, H. S. et al. Informações fenotípicas e marcadores microssatélites de QTL na escolha de populações segregantes de feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 5, p. 707-713, maio 2007.

QUARRIE, S. A. et al. A high-density genetic map of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) from the cross Chinese Spring_SQ1 and its use to compare QTLs for grain yield across a range of environments. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 110, n. 5, p. 865-880, Mar. 2005.

RODRIGUES, T. B. **Efeito da seleção natural em alelos microssatélites (SSR) do feijoeiro e associação com QTL's de caracteres agronômicos**. 2004. 90 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

RODRIGUES, T. B. et al. Identificação de QTLs em feijoeiro por meio de marcadores SSR influenciados pela seleção natural. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1351-1357, set./out. 2007.

RODRIGUES, T. B.; SANTOS, J. B. dos. Effect of natural selection on common bean microsatellite (SSR) alleles. **Genetic and Molecular Biology**, Berlin, v. 29, n. 2, p. 345-352, Apr. 2006.

TORGA, P. P. et al. Seleção de famílias de feijoeiro baseada na produtividade, no tipo de grão e informações de QTLs. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 95-100, jan./fev. 2010.

ANEXOS

Tabela 1A Resumo das análises de variância individuais por nível de nitrogênio, em cada ambiente, para produtividade de grãos (Kg/ha), obtidos na avaliação das progênes dos cruzamentos Ouro Negro x IAPAR-81 e VC-5 x CI-107, nas safras das águas 2008/2009 e inverno 2009

FV	GL	QM		GL	QM	
		Águas 2008/2009			Inverno 2009	
		Com N	Sem N		Com N	Sem N
Tratamento	195	427164,08**	284858,53**	80	566125,68**	308715,36**
Erro	169	230514,02	97959,51	136	156881,19	226734,92
Média		1.313	1.220		2.760	1.486
Acurácia (%)		67,71	80,94		84,98	51,44
CV (%)		37	26		21	36
ER(%)		104	112		199	117

** significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de F

Tabela 2A Resumo das análises de variância conjunta dos níveis de nitrogênio, para as safras das águas 2008/2009 e de inverno 2009, obtidos na avaliação das progênes originadas com e sem N, para produtividade de grãos em Kg/ha

FV	ÁGUAS		INVERNO	
	GL	QM	GL	QM
Níveis (N)	1	1600361,02**	1	189182907,4**
Progênes (P)	193	476497,71**	78	404270,1**
Entre Origens	1	4548890,33**	1	503578,38**
Entre Progênes CN	97	475543,82**	39	303567,96*
Entre Progênes SN	95	434604,42**	38	505008,93**
P x N	193	228586,46**	79	399920,08**
Entre P x N (CN)	97	239407,7*	39	281687,94*
Entre P x N (SN)	95	217968,9*	38	522208,68**
Origens x N	1	187594,546 ns	1	763927,44*
Erro médio	338	164236,5	272	191808,054
Média		1261		2119
Acurácia (%)		80,94		72,37
CV		32,13		20,66

*,**significativos a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.