

**EFEITO DA SELEÇÃO NATURAL EM
ALELOS MICROSSATÉLITES (SSR)
DO FEIJOEIRO E ASSOCIAÇÃO COM
QTLs DE CARACTERES
AGRONÔMICOS**

TAISLENE BUTARELLO RODRIGUES

2004

TAISLENE BUTARELLO RODRIGUES

**EFEITO DA SELEÇÃO NATURAL EM ALELOS MICROSSATÉLITES
(SSR) DO FEIJOEIRO E ASSOCIAÇÃO COM QTLs DE CARACTERES
AGRONÔMICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. João Bosco dos Santos

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2004

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

Rodrigues, Taislene Butarello

Efeito da seleção natural em alelos microssatélites (SSR) do
feijoeiro e associação com QTLs de caracteres agronômicos /

Taislene Butarello Rodrigues. -- Lavras : UFLA, 2003.

90p. : il.

Orientador: João Bosco Santos.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Feijão. 2. *Phaseolus vulgaris*. 3. Seleção. 4. Característica
agronômica. 5. Melhoramento genético vegetal. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.65223

TAISLENE BUTARELLO RODRIGUES

**EFEITO DA SELEÇÃO NATURAL EM ALELOS MICROSSATÉLITES
(SSR) DO FELJÓEIRO E ASSOCIAÇÃO COM QTLs DE CARACTERES
AGRONÔMICOS**

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

APROVADA em 23 de julho de 2004

Dr. César Augusto Brasil Pereira Pinto UFLA

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho UFLA

Prof. João Bosco dos Santos
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

“Não é o desafio com que nos deparamos que determina quem somos e o que estamos nos tornando, mas a maneira com que respondemos ao desafio. Somos combatentes, idealistas, mas plenamente conscientes. Porque o ter consciência não nos obriga a ter teoria sobre as coisas. Só nos obriga a sermos conscientes. Problemas para vencer, liberdade para provar. E, enquanto acreditarmos no nosso sonho, nada é por acaso.”
(Henfil)

Aos meus pais, Bernadete e Djalma, que desde o princípio, me ensinaram a acreditar no valor do conhecimento.

Aos meus irmãos, Elber e Greici, pelos incentivos a prosseguir e lutar pelos meus objetivos.

Ao noivo, Alexandre, que com muito amor e compreensão compartilhou comigo essa conquista.

E aos amigos, pelos incentivos e momentos de descontração.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda graça recebida e por permitir mais essa conquista.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro concedido para a realização do curso.

Ao professor João Bosco dos Santos, pelas oportunidades, ensinamentos, confiança e por ter se tornado um ótimo amigo, a quem tenho uma grande admiração.

Ao Dr. César Augusto Brasil Pereira Pinto, pelos ensinamentos transmitidos durante o realização deste curso, pela colaboração e participação na banca.

À Dra. Édila Vilela Resende Von Pinho pela participação na banca e pelas valiosas contribuições apresentadas.

Aos professores Magno Antonio Patto Ramalho, Elaine Aparecida de Souza, Lizete Chamma Davide, João Candido de Souza, Giovana Augusta Torres e a pesquisadora Ângela de Fátima Barbosa Abreu, pelos ensinamentos e amizade.

Ao “Tio Lamartine”, pela amizade e otimismo durante a minha estadia no Laboratório de Genética Molecular.

À secretária “Tia Elaine”, pela amizade e dedicação durante todos estes anos.

Aos funcionários do Departamento de Biologia: Zélia, Rafaela, Magda, Irondina e Rosangela, pelo agradável companheirismo.

À grande amiga Mychelle Carvalho e a seu filho Raul, pelas horas sem dormir, pelo companheirismo e pelo apoio constante.

Ao Édson, pelas suas horas preciosas dedicadas as minhas análises de regressão.

À Nara, pela amizade e por conceder o material para a realização deste trabalho.

Aos amigos Lívia, Alexandre, Sílvia, Flávia, Breno, Zé Marcelo, Kaesel, e Ildon, com os quais pude contar.

Aos colegas do GEN, pelo convívio, amizade e ajuda.

A todos, que de certa forma contribuíram para o êxito desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO I	01
1 INTRODUÇÃO	02
2 REFERENCIAL TEÓRICO	04
2.1 Variabilidade na cultura do feijoeiro	04
2.2 Seleção natural.....	06
2.3 Melhoramento do feijoeiro e efeito da seleção natural em populações segregantes.....	08
2.4 Reação da polimerase em cadeia (PCR)	15
2.5 Marcadores de Sequência Simples Repetidas (SSR) ou microssatélites.....	15
2.6 Identificação de QTLs (Quantitative Trait Loci)	16
2.6.1 Procedimentos para obtenção de populações para o estudo de QTLs.....	16
2.6.2 Estratégias para detecção de poligenes	17
2.6.3 Identificação de QTLs em feijoeiro	19
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
CAPÍTULO II: Efeito da seleção natural em alelos de microssatélites (SSR) do feijoeiro	32
Resumo	33
Abstract.....	34
1 INTRODUÇÃO	35
2 MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1 Local de condução do experimento	36
2.2 Obtenção da população segregante.....	36
2.3 Extração de DNA.....	37

2.4 Reação de SSR (Simple Sequence Repeat)	38
2.5 Obtenção e análise dos dados	38
2.5.1 Pré-seleção dos pares de primers selecionados pela seleção natural	38
2.5.2 Teste da alteração das frequências genóticas nas populações segregantes.....	39
2.5.3 Estimativas das frequências genóticas e do coeficiente de adaptabilidade relativa nas gerações sucessivas da F_2 até F_{24}	40
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1 Frequências genóticas observadas em F_8 e F_{24}	44
3.2 Estimativas das frequências alélicas observadas e esperadas em F_8 e F_{24}	48
3.3 Estimativas dos coeficientes de adaptabilidade relativa.....	50
4 CONCLUSÕES	58
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
CAPÍTULO III: Identificação de QTLs em feijoeiro por meio de marcadores SSR selecionados pela seleção natural	63
Resumo	64
Abstract.....	65
1 INTRODUÇÃO	66
2 MATERIAL E MÉTODOS	68
2.1 Obtenção do material genético e características avaliadas	68
2.2 Identificação de QTLs por meio da regressão linear múltipla ...	68
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4 CONCLUSÕES	82
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
ANEXOS	86

RESUMO

RODRIGUES, Taislene Butarello. **Efeito da seleção natural em alelos microssatélites (SSR) do feijoeiro e associação com QTLs de caracteres agronômicos**. 2004. 90 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Objetivou-se identificar marcadores microssatélites (SSR) selecionados pela seleção natural em populações segregantes do feijoeiro, conduzidas pelo método da população (bulk) e verificar se alguns dos marcadores SSR estavam associados a genótipos de interesse agronômico, como: produtividade de grãos, reação à mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) e peso de 100 sementes. Foram avaliadas 107 famílias da geração F_8 e 107 famílias F_{24} , provenientes do cruzamento do Carioca MG x ESAL686, conduzidas pelo método da população (bulk). As famílias foram avaliadas para produtividade de grãos em três épocas: inverno de 2001 ($F_{8:9}$ e $F_{24:25}$), águas de 2001 ($F_{8:10}$ e $F_{24:26}$), e secas de 2002 ($F_{8:11}$ e $F_{24:27}$) em Lavras - Minas Gerais. A reação para mancha angular e peso de 100 sementes foram avaliadas somente na época da secas de 2002. A extração de DNA foi realizada nas famílias $F_{8:11}$ e $F_{24:27}$. Utilizou-se nas reações de SSR 30 pares de primers que identificaram polimorfismo nos pais e no bulk de DNA das famílias $F_{24:27}$. Vinte e nove dos 30 locos foram selecionados pela seleção natural favorecendo os alelos de SSR do Carioca MG; e um único alelo do ESAL 686 foi selecionado. A seleção natural afetou todas as gerações, e sua intensidade foi específica para cada loco e geração. Portanto, todos os alelos selecionados de cada loco devem ser importantes para a adaptação em um programa de melhoramento. Utilizando o procedimento de regressão linear múltipla (stepwise), foram identificados 10 QTLs pelos marcadores SSR para produtividade de grãos que explicaram uma variação fenotípica de 3,14% a 9,24%. Para mancha angular, foram identificados 6 QTLs, sendo que um de efeito maior (BM154) conseguiu explicar 17,5% da variação fenotípica. Cinco QTLs também foram identificados para peso de 100 sementes, sendo que o primer X61293 está associado a um de efeito maior (16,8%). A maioria dos QTLs expressou-se em um só ambiente e uma só população, o que leva a uma alta instabilidade, que pode ser devido às frequências genotípicas dos caracteres estudados e dos marcadores, em consequência da seleção natural.

*Orientador: João Bosco dos Santos – Universidade Federal de Lavras (UFLA)

ABSTRACT

RODRIGUES, Taislene Butarello. **Effect of natural selection on common bean SSR alleles and their association with agronomical QTLs**. 2004. Cap.1. 90 p. Dissertation (Master in Genetics and Plant Breeding) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The objectives of this study were to identify microsatellite (SSR) markers selected by natural selection, and their association with QTLs for grain yield, angular leaf spot reaction and 100 seed weight, in common bean (*Phaseolus vulgaris*) segregating populations. One hundred and seven families from the F₈ generation and 107 from the F₂₄, derived from the Carioca MG x ESAL 686 cross, were conducted by bulk method. The families were evaluated for grain yield in the fall/winter season of 2001 (F_{8:9} and F_{24:25}), spring/summer of 2001/2002 (F_{8:10} and F_{24:26}), and summer/fall of 2002 (F_{8:11} and F_{24:27}) in Lavras, MG State. Plant reaction to angular leaf spot (*Phaeoisariopsis griseola*) and 100 seed weight were evaluated only in the last season. DNA extraction was set up from F_{8:11} and F_{24:27} families, and used in the SSR reaction with 30 pair of primers that identified polymorphism in the parents and in a DNA bulk of the F_{24:27} families. In twenty nine out of 30 loci the allele from Carioca MG were selected by natural selection, and in only one locus was selected the allele from ESAL 686. The natural selection affected all generations, and its intensity was specific for each locus and generation. Therefore, the selected alleles of all loci should be important for improving adaptation. Using the multiple linear regression through the stepwise procedure, 10 grain yield QTLs were identified by the SSR markers which explained each one between 3.1% a 9.4% of the phenotypic variation. For angular leaf spot 6 QTLs were identified and the one with the largest effect (BM154) explained 17.5% of the phenotypic variation. Five QTLs were also identified for 100 seed weight, and the primer X61293 presented the largest effect and explained 16.8%. Most QTLs expressed in only one environment and population, showing their high instability, which might be due to the genotypic frequencies, both of the markers and the agronomical traits.

*Guidance Committee: João Bosco dos Santos – UFLA (Major Professor).

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A cultura do feijão é considerada uma fonte importante de alimento para alguns países, principalmente para o Brasil, por ser um produto básico da alimentação. No país, a cultura é realizada em quase todas as regiões, onde a cultivar predominante pertence ao grupo carioca. Estima-se que a produção nacional seja de dois milhões de toneladas, com cultivares pertencentes a esse grupo. Dada a importância do grupo Carioca e a amplitude de ambientes em que suas cultivares são usadas, é necessário que elas sejam adaptadas a toda essa diversidade de ambientes. Entretanto, a seleção para maior adaptação é praticamente impossível de ser realizada diretamente, devido à impossibilidade de avaliá-la, embora a seleção de cultivares com maior produtividade de grãos ou com resistência a doenças de uma dada região, indiretamente, deva contribuir para aumentar a adaptação.

Embora seja difícil selecionar plantas com maior adaptação, a seleção natural é muito eficiente neste aspecto. No melhoramento do feijoeiro, alguns métodos de condução da população segregante favorecem a atuação da seleção natural. Entre eles, o método da população ou “bulk” é muito utilizado, sobretudo pela sua facilidade e versatilidade de condução. Por este método, a partir da geração F_2 as plantas são colhidas, suas sementes são misturadas e uma amostra é utilizada para obter a geração seguinte. Esse processo repete-se até a geração F_5 , F_6 ou até mesmo em gerações mais avançadas, quando são retiradas famílias para serem avaliadas em experimentos com repetições.

Assim, com esse procedimento de condução da população segregante, há oportunidade de atuar a seleção natural e o melhorista pode se beneficiar de suas ações, como no aumento da produtividade de grãos (Corte, 1999). No entanto, nem sempre seu efeito é desejável, quando, por exemplo, se tem interesse por

plantas de hábito de crescimento arbustivo, precoces e com sementes grandes (Hamblin, 1977; Allard, 1988; Corte, 1999; Silva, 2003). Nesses casos, é então necessário realizar a seleção artificial.

Dada a impossibilidade de seleção direta para maior adaptação, com o advento dos marcadores moleculares, há a possibilidade de identificar alguns genes que estejam ligados às regiões genômicas onde ocorram os alelos de interesse (Allard, 1999). Nesse caso, embora seja inviável avaliar o caráter adaptação, pode-se ter idéia dos genótipos desejáveis e, conseqüentemente, selecionar os marcadores a eles associados, a partir da alteração das frequências alélicas dos mesmos, em uma população submetida a ação da seleção natural.

De posse dos marcadores selecionados, pode-se verificar a associação dos mesmos com alguns caracteres agronômicos e identificar aqueles associados com os alelos de interesse.

Com base nessas considerações, o objetivo do trabalho foi identificar alelos de microssatélites afetados pela seleção natural, em populações segregantes de feijoeiro conduzidas em bulk. Procurou-se também identificar se alguns marcadores estão associados a genótipos de interesse agronômicos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Variabilidade na cultura do feijoeiro

O gênero *Phaseolus* possui cerca de 50 espécies, as quais ocorrem em todo mundo (Singh, 1989; Singh et al., 1991; Gepts & Debouck, 1991). Dentro deste gênero, existem cinco espécies que possuem importância econômica, a *Phaseolus vulgaris*, *P. lunatus* L., *P. coccineus* L. subespécie *coccineus*, *P. coccineus* subespécie *polyanthus* e *P. acutifolius* A. Gray, sendo que todas diferem quanto ao sistema reprodutivo, ciclo de vida, distribuição geográfica dos ancestrais selvagens e grau de domesticação (Gepts, 1988; Santos & Gavilanes, 1998).

Com base em informações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, foram sugeridos três centros de origem para o feijoeiro: um no México e América Central (Mesoamericano), um segundo na região Andina, e um terceiro, de menor importância, na Colômbia (Singh et al., 1991, Gepts et al., 1986; Koenig et al., 1990; Gepts, 1988; Gepts & Bliss, 1986; Sprecher, 1988 e Koenig & Gepts, 1989). Para a determinação desses centros de origem, os autores se basearam em características como o tipo de faseolina, a principal proteína de reserva em sementes de feijoeiro cultivados e selvagens, bem como na relação desta com características morfológicas como o tamanho das sementes. Desta maneira, ficou estabelecido que no centro de origem Mesoamericano, as sementes de feijão são pequenas e com faseolina dos tipos S e M, no Centro Andino, estas são grandes e com faseolina dos tipos T, A, C e H, e, no centro Colombiano, são pequenas e com faseolina do tipo B.

Dentro dos centros de domesticação, os genótipos de feijão puderam ser divididos em seis raças, sendo três do centro Mesoamericano (Mesoamérica, Durango e Jalisco) e três do centro Andino (Nova Granada, Chile e Peru). Elas

foram constituídas também baseando-se em análises de características agrônômicas, morfológicas, bioquímicas e informações sobre adaptação (Singh et al., 1991; Santos & Gavilanes, 1998).

Koenig & Gepts (1989), estudando 83 acessos selvagens de *Phaseolus vulgaris*, concluíram que as duas principais regiões geográficas (Mesoamericana e Andina) podem ser delimitadas por acessos que exibiam padrões aloenzimáticos para as enzimas leucina amino-peptidase (Lap3), glicose 6-fosfato desidrogenase (Diap1) e xiquemato desidrogenase (Skdh). Os mesmos autores concluíram também que a variabilidade genética é mais elevada na região mesoamericana, mas por outro lado, os genótipos da região Andina apresentaram maior número de locos polimórficos para os 14 sistemas enzimáticos estudados, provavelmente por causa da ocorrência de alelos raros para as aloenzimas Gpis2 e Mdh1 das enzimas glicose fosfato isomerase e malato desidrogenase, respectivamente.

Estudos dos variantes aloenzimáticos também indicam a transferência de alelos de feijões selvagens para os cultivados da espécie *Phaseolus vulgaris*, e dividem o conjunto gênico Mesoamericano em cinco subgrupos e o Andino em quatro subgrupos (Singh et al., 1991).

Os tipos de faseolina S, T, C, H e A permaneceram nas espécies domesticadas, que correspondem às espécies cultivadas atualmente, por possuírem um elevado valor biológico, sendo assim favorecidas pela seleção. Outra razão que explica a permanência desses tipos de faseolina nas espécies cultivadas, é a provável existência de uma ligação gênica ou grupo de genes determinantes de aspectos essenciais às formas cultivadas como o atraso ou a diminuição na deiscência das vagens (Gepts et al., 1986).

As formas cultivadas se apresentam bastante modificadas em relação às formas silvestres graças ao processo de domesticação. As atuais plantas de feijão apresentam crescimento restrito e forma mais compacta, o que as torna de menor

altura e mais eretas, folhas maiores, caule mais robusto, flores, sementes e vagens maiores, menor número de sementes por vagem, sementes com maior permeabilidade à água, supressão do mecanismo de dispersão das sementes, grande número de cores das sementes, incluindo diversas manchas e estrias, diminuição do conteúdo de fibras nas vagens, ocorrência de neutralidade ao comprimento do dia, permitindo o cultivo do feijão desde as zonas temperadas até as tropicais (Santos & Gavilanes, 1998; Borém, 1997).

Houve um aumento da variabilidade no feijoeiro em relação às características morfológicas, por causa do processo de domesticação realizado pelos agricultores e a ampla variação no ambiente de cultivo (Gepts & Debouck, 1991; Santos & Gavilanes, 1998). Entretanto, esta mesma domesticação reduziu a variabilidade genética para a maioria dos outros caracteres, principalmente dos feijões de origem mesoamericana, o que é comprovado pelos estudos com faseolina em feijão selvagens e cultivados (Gepts et al., 1986).

Este aumento da variabilidade morfológica e diminuição da variabilidade genética pode ser explicado pelo fato de que as características morfológicas, que diferem feijões cultivados de feijões selvagens, serem controladas por um número limitado de genes, com exceção para a característica tamanho da semente (Gepts, 1991).

2.2 Seleção Natural

A seleção ocorre quando indivíduos com um genótipo específico produz um maior número de descendentes que indivíduos de outro genótipo. 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. Se a diferença de adaptabilidade estiver de algum modo associada à presença ou ausência de um determinado alelo, então a seleção atua sobre esse alelo. Quando um alelo está sujeito à

seleção, sua frequência nos descendentes não é a mesma da dos pais, uma vez que os pais contribuem desigualmente com alelos para a próxima geração. Deste modo, a seleção causa uma mudança na frequência alélica e conseqüentemente também na frequência genotípica (Falconer & Machay, 1996).

A seleção atua sobre um genótipo através de seu fenótipo. Assim, a efetividade da seleção dependerá do grau de dominância exibido pelo alelo sob ação da seleção. Para tanto, deve-se considerar os tipos de interação alélica para se ter idéia da adaptabilidade. A seleção pode atuar contra um determinado alelo, eliminando os genótipos que o possuem, ou então atuar a seu favor, preservando os genótipos indivíduos que os possuem.

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 $1-s$ (Falconer & Mackay, 1996; Hedrick, 1999). Essa expressão corresponde a adaptabilidade relativa (ω_i) do i genótipo 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 contra o qual a seleção atua (Falconer & Mackay, 1996).

A eficiência da seleção para alterar a frequência alélica depende do coeficiente de seleção e da frequência alélica inicial, além de variar em função do tipo de interação alélica presente. Portanto, deve-se levar em consideração que quando a frequência do alelo recessivo é baixa, a seleção é muito ineficiente.

Quando o heterozigoto é intermediário em relação aos homozigotos (ausência de dominância), a eficiência da seleção é melhorada porque parte desses indivíduos podem ser eliminados. Já quando a seleção favorece o

heterozigoto (sobredominância), a frequência alélica tende para um equilíbrio em um valor intermediário, de modo que os dois alelos permanecem na população (Allard & Workman, 1963; Falconer & Mackay, 1996).

A adaptabilidade média da população ($\bar{\omega}$) pode ser dada como a soma das contribuições relativas dos diferentes genótipos (Hedrick, 1999). Quando a frequência alélica é alterada pela seleção, alguns indivíduos são eliminados devido a sua incapacidade de sobreviverem ou de se reproduzirem, e a adaptabilidade média da população é reduzida. A proporção da população que é eliminada devido a causas genéticas é chamada carga genética e ela tem como consequência 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 – isso 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 comparadas aos acasalamento ao acaso (Hedrick, 1999).

2.3 Melhoramento do feijoeiro e efeito da seleção natural em populações segregantes

O feijoeiro é considerado uma espécie tipicamente autógama, devido à ocorrência da cleistogamia, tornando a autofecundação o sistema reprodutivo predominante (Marque Júnior & Ramalho, 1995). Contudo, ainda ocorre uma certa taxa de fecundação cruzada, inferior a 5%, devido principalmente à ação de insetos polinizadores, além das condições ambientais e também das cultivares

semeadas, ou seja, do tipo de suas flores e da maior ou menor coincidência dos períodos de floração (Vieira et al., 1999).

No melhoramento de plantas autógamas existem várias opções de métodos de melhoramento (Fehr, 1987; Ramalho et al., 1993; Borém, 1997). Atualmente, o mais amplamente utilizado é a hibridação, que visa à combinação em um mesmo indivíduo de dois ou mais fenótipos desejáveis que estão em indivíduos diferentes. Portanto, na condução de um programa de melhoramento por hibridação, há algumas decisões a serem tomadas, tais como: a escolha dos genitores (Baenziger & Peterson, 1991; Abreu, 1997), como combinar esses genitores e como conduzir as populações segregantes (Fehr, 1987; Ramalho et al., 1993; Borém, 1997; Vieira et al., 1999).

Em uma população segregante, nas suas sucessivas gerações de endogamia, é possível verificar que a cada geração de autofecundação, há uma redução de 50% na frequência dos locos em heterozigose. Desta forma, na geração F_2 , 50% dos locos estão em heterozigose e 50% estão em homozigose. Na F_3 , a frequência de heterozigotos passa a ser de 25%, enquanto que a de homozigotos passa para 75%, e assim, sucessivamente. O que necessita ser enfatizado, é 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 será apenas constituída de genótipos homozigóticos (BB e bb, considerando um gene com dois alelos), com frequência de 50% de cada.

Entre as vantagens do método da população, a mais evidente é a facilidade de condução, pois não são necessárias anotações, nem colheita individual de plantas. Uma outra vantagem é a flexibilidade, isto é, se numa dada safra o melhoramento tem grande número de famílias a serem avaliadas,

pode-se postergar a abertura do bulk por uma ou mais gerações sem alterar suas propriedades genéticas. Uma terceira vantagem é a ação da seleção natural, a qual pode atuar, contribuindo para a manutenção dos indivíduos mais adaptados, isto é, com maior produção de sementes (Gonçalves, 2000).

Por algum tempo, questionou-se se a ação da seleção natural se dava no sentido que os melhoristas desejavam. Um dos primeiros trabalhos para evidenciar a ação da seleção natural na mistura de plantas foi conduzido por Harlan & Martini (1938) com cevada. Eles verificaram grande variação na adaptação, em função da proporção de sementes colhidas de cada cultivar na mistura, nos diferentes locais e a rapidez com que uma ou mais cultivares se tornaram dominantes em certas localidades com a conseqüente eliminação das demais. Depreende-se que a seleção natural foi muito efetiva no avanço da mistura de linhas de cevada.

O que interessa, entretanto, é o efeito da seleção natural em uma população segregante, que é o que ocorre no método da população. Um trabalho de maior duração nesse aspecto também foi realizado com cevada, sendo conduzido desde 1929 (Allard, 1988; Soliman & Allard, 1991). Os autores iniciaram com um composto denominado CCII, proveniente de um dialelo de 28 cultivares, resultando em 387 híbridos F_1 , que foram misturados. Cerca de 15.000 sementes eram semeadas a cada geração em bloco isolado. Em torno de 400.000 sementes eram colhidas por geração, sendo uma parte armazenada e a outra parte misturada para ser utilizada na semeadura do ciclo seguinte.

Visando verificar as trocas que ocorreram com a seleção natural, após alguns anos de condução da população, foi avaliado o desempenho de todas as gerações até então obtidas nos anos de 1960/66, 1965/69 e 1976/82. Os resultados referentes às avaliações realizadas por mais de 50 gerações foram apresentados por Allard (1988), que relata o efeito das sucessivas gerações em vários caracteres, comparando-os com uma cultivar testemunha. Entre os

caracteres quantitativos, a maior ênfase foi dada à produtividade de grãos, peso de 1000 sementes e número de dias para o florescimento.

As produções de grãos das populações avaliadas por mais de cinquenta gerações apresentaram um ganho de aproximadamente 1% por geração. No caso do peso de 1000 sementes, os resultados acompanharam o da produtividade de grãos, especialmente até a vigésima geração, quando então se estabilizaram. A partir daí, o aumento no número de sementes por planta foi o que explicou os incrementos na produtividade de grãos. No que se refere ao ciclo, o efeito não foi muito pronunciado. Detectou-se um aumento de apenas três dias no número de dias para o início do florescimento nas sucessivas gerações. Allard (1988), salientou que a seleção natural atuou preferencialmente sobre indivíduos com maior estabilidade de produção, isto é, aqueles que mantiveram produtividade tanto em condições favoráveis quanto em condições menos favoráveis.

Outros caracteres foram avaliados, entre eles o peso de espiguetas, comprimento da espiguetas, densidade da espiguetas, comprimento da arista, número de grãos por espiguetas, tamanho do grão, altura de planta, largura e área da penúltima folha e diâmetro do colmo. Para isso, eram utilizadas 300 plantas ao acaso por geração. Nas avaliações constatou-se que os caracteres peso da espiguetas e número de sementes por espiguetas foram os que mais sofreram a ação da seleção natural, especialmente até a geração F_{20} . Pequenos acréscimos foram observados nas características comprimento da arista, largura e área da penúltima folha e diâmetro do colmo, decréscimo no comprimento da espiguetas e aumento na densidade de espiguetas ocorreram lentamente. As espiguetas foram quase 10% menores e mais compactadas na média das últimas gerações do que nas gerações iniciais. Mudanças na altura média das plantas foram pequenas até quase a geração F_{25} , quando então começou a aumentar, ocorrendo aí um acréscimo de 5% até a geração F_{53} . Assim, conclui-se que a seleção

natural atuou diferentemente sobre cada caráter, principalmente quanto à intensidade.

Hamblin & Morton (1977), estudando o controle genético dos caracteres: produção de sementes, número de sementes por planta, número de sementes por vagem e peso de sementes; utilizaram os cruzamentos das cultivares de *Phaseolus vulgaris*: Panameno x Cuarentano, Panameno x Masterpiece, Panameno x Tenderwhite e Masterpiece x Tenderwhite, cujas populações foram conduzidas pelo método da população. Concluíram que a condução da população em bulk resultou em pequenas alterações nas populações de alta produção e aumento dos valores fenotípicos nas populações de baixa produção.

O trabalho realizado por Corte (1999), visou verificar se a seleção natural atua na direção desejada pelos melhoristas, utilizando para isso seis populações segregantes de feijoeiro e as respectivas linhagens genitoras (ESAL 686, Mantegão Fosco, Carioca MG, Milionário e Ouro). Elas foram avaliadas em experimentos conduzidos da geração F₂ até a F₁₈, pelo método da população, em três locais de Minas Gerais, Lavras, Lambari e Patos de Minas e três épocas de semeadura durante o ano. Constatou-se que a seleção natural atuou em todas as populações segregantes, nos três locais, contribuindo com aumento na produtividade de grãos, em média de 2,4% por geração, em relação à média da população inicial avaliada.

Com o avanço das gerações, Gonçalves (2000) utilizando as mesmas populações segregantes de Corte (1999), observou que as plantas de hábito determinado, provavelmente por serem menos competitivas, foram sendo gradativamente eliminadas. Concluindo-se assim que, se o objetivo é obter linhagens de hábito determinado, em população que estiver segregando para esse caráter, o método do "bulk" não deve ser utilizado. No caso do peso de 100 grãos, os resultados foram semelhantes ao do hábito de crescimento, ou seja, a

proporção de grãos grandes foi drasticamente reduzida com o avanço das gerações, como relatado por Hamblin (1975). Relatou-se ainda que a seleção natural atuou no sentido de preservar as plantas com maior produtividade, em média de 5,2% por geração, em relação à população inicial.

Pirola et al. (2002), utilizando a população proveniente do cruzamento de ESAL 686 x Carioca MG, avançadas pelo método da população até F_{14} , em três locais do estado de Minas Gerais, Lavras, Lambari e Patos de Minas, constatou que a variância da interação famílias x locais foi de grande magnitude, e inclusive bem superior à variância genética entre as famílias. Ficou evidenciado que durante a condução das populações segregantes pelo método da população, a seleção natural atuou, preservando os indivíduos mais adaptados para o ambiente em que ocorreu o avanço das populações. Havendo, então, a necessidade dos melhoristas avançarem as populações segregantes em ambientes diferentes, visando à obtenção de linhagens que associem bom desempenho e maior adaptação aos ambientes de cultivo em que se destacaram.

Uma decisão importante do melhorista é com relação ao momento de se iniciar a avaliação das progênies, ou seja, a abertura do “bulk”. Silva (2003), avaliando famílias F_2 , F_8 e F_{24} , do cruzamento ESAL 686 x Carioca MG, em três épocas de semeadura diferentes (safra do inverno de 2001, safra das águas de 2001 e safra da seca de 2002), verificou que a maior produtividade média foi obtida, independente da safra, entre as famílias derivadas de plantas F_{24} e essa superioridade foi de 20% em relação às famílias derivadas de plantas F_2 . Constatou-se a ação da seleção natural, preservando os indivíduos que deram origem às famílias mais produtivas e que o efeito da seleção natural não se restringiu apenas às primeiras gerações de avanço da população pelo método do “bulk”.

Quando o método da população é comparado com outros métodos de melhoramento, é possível perceber que ele é mais eficiente, principalmente

quando se observam os ganhos para maior produtividade de grãos, devido somente à seleção natural, que variaram de 2,4% a 5,2% por geração (Corte, 1999; Gonçalves, 2000). Comparando com os ganhos obtidos com a seleção artificial, eles variaram de 1,9% a 2,6% por ciclo (Abreu et al., 1994; Ramalho et al., 2003).

Estudos realizados em alelos distintos, genótipos multilocos, aloenzimas, fragmentos de restrição e microssatélites permitem informar as inferências e também deduzir sobre as mudanças genéticas realizadas ao longo do processo de seleção natural das populações (Allard, 1999). Segundo esse autor, as análises de marcadores moleculares levam a importantes conclusões a respeito dos mecanismos genéticos envolvidos no processo de melhoramento e adaptação.

Descobriu-se que mudanças nas frequências dos alelos e dos genótipos multilocos detectados por eletroforese, tanto nos parentes selvagens quanto nas cultivares, permitem uma explicação mais precisa sobre a adaptação que estas plantas sofreram ao longo das gerações. Isso por um lado permite que a análise genética da evolução da adaptação inerente às características quantitativas sejam interpretadas na seleção (Allard, 1999).

A detecção de polimorfismo no feijão também foi feita, utilizando-se marcadores de DNA à base de PCR e correlaciona-se com o polimorfismo identificado pelas isoenzimas (Skroch et al., 1992). Além disso, quando se consideram vários caracteres morfológicos, de cultivares geneticamente muito contrastantes, há estreita associação da diversidade por eles gerada, com o polimorfismo de marcadores aleatórios de DNA (Duarte et al., 1999). Entretanto, quando as cultivares são menos contrastantes, essa associação fica reduzida (Machado et al., 2000).

2.4 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. A reação baseia-se no pareamento de pares de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples), utilizados como primers que delimitam as seqüências de DNA de fita dupla, alvo de amplificação. Esses primers são sintetizados artificialmente, de maneira que suas seqüências de nucleotídeos venham a complementar e permitir amplificar as seqüências específicas flanqueadas pelo par de primers (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Adicionalmente, quando o primer obtido é de seqüência 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.

2.5 Marcadores de Seqüências Simples Repetidas (SSR) ou microssatélites

Segundo Charlesworth et al. (1994), grande parte do genoma de eucariontes é constituída por seqüências de DNA repetitivas. O DNA repetitivo é composto por DNA satélite (DNA altamente repetitivo), as seqüências de DNA microssatélites e minissatélites (DNA moderadamente repetitivo) e os elementos transponíveis (DNA moderadamente repetitivo, móvel e de seqüências dispersas).

As seqüências de microssatélites consistem em pequenas seqüências com 1 a 4 nucleotídeos de comprimento, repetidas em fila (Ferreira & Gattapaglia, 1998). As seqüências de microssatélites são observadas em diversos organismos. De maneira geral, nas plantas, os sítios de microssatélites são distribuídos com

uma frequência de um a cada 50 mil pares de bases (Morgante & Olivieri, 1993; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A variabilidade do comprimento dessas regiões repetitivas podem ser analisadas por PCR usando pares de primers que flanqueiam essa região. Devido ao grande número de sítios (locos) repetitivos, o SSR é considerado marcador altamente polimórfico e multialélico. Entre as classes de marcadores existentes, o SSR é o que se aproxima mais do marcador ideal para o estudo de genética de populações (Rafalski et al., 1991). Segundo Scott et al. (2000), os locos simples dos marcadores de microssatélites são caracterizados pela sua hipervariabilidade, abundância e uniformidade, reprodutibilidade, multialélicos, e herança Mendeliana e do tipo codominante.

As maiores vantagens dos SSR é que as seqüências amplificadas são altamente estáveis e ideais para o uso de PCR. A sua distribuição, ao longo de todo o genoma, possibilita que um ou mais locos sejam identificados próximos ou mesmo dentro de genes de interesse, constituindo-se em um marcador ideal. Gepts et al. (1991) sugeriram o emprego desses marcadores para auxiliarem no melhoramento do feijão. Esta técnica vem sendo amplamente utilizada em avaliações de germoplasmas e também no mapeamento genético (Gaitán-Solís et al., 2002).

2.6 Identificação de QTLs (Quantitative Trait Loci)

2.6.1 Procedimentos para obtenção de populações para o estudo de QTLs

Um aspecto importante na detecção de QTLs (região genômica identificada por um ou mais marcadores e que contém um ou mais locos gênicos), por meio de marcadores genéticos, é a necessidade de que a população sob estudo esteja em desequilíbrio de ligação, ou seja, o desequilíbrio de ligação entre dois locos ocorre quando as frequências genotípicas dos gametas diferem

do produto das frequências dos alelos componentes, denotando a existência de uma associação significativa entre os dois locos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Caso contrário os alelos dos locos marcadores e dos poligenes ocorrem em combinações equivalentes à distribuição independente, e os poligenes não são detectados. Tanksley (1993) comenta que em virtude disso é necessário a geração de populações especiais, como retrocruzamentos, F_2 , F_3 e linhagens recombinantes. O problema é que, nos casos das autofecundações sucessivas, existe um menor desequilíbrio de ligação devido à maior oportunidade de recombinação meiótica (Burr & Burr, 1991). No entanto, Bearzoti (1998) comenta que, em espécies autógamas, o desequilíbrio de ligação dissipa-se com uma taxa lenta, tendo um limite diferente de zero. Este fato implica em uma vantagem no tocante à utilização de populações compostas de linhagens recombinantes, bem como à utilização de marcadores moleculares no melhoramento de plantas autógamas.

2.6.2 Estratégias para detecção de poligenes

Ainda que os delineamentos genéticos sejam relativamente simples, existem complexas metodologias estatísticas propostas ao longo de várias décadas para detectar a ligação entre os marcadores e os QTLs, utilizando as estratégias de um só ponto ou por intervalo (Law, 1967; Jayakar, 1970; Silver, 1985; Weller, 1986; Lander & Botstein, 1989 e Neumann, 1990).

Entre as estratégias para detectar os poligenes, sob delineamentos genéticos com cruzamentos controlados gerando o desequilíbrio de ligação necessário, a técnica mais simples é a da análise de um só ponto. Nessa aproximação para detectar os QTLs são analisados os dados de um único marcador a cada vez. As desvantagens desta análise são: (a) quanto mais distante se encontrar o QTL do marcador, menor a chance de ser detectado estatisticamente, devido às recombinações entre o poligene e o marcador serem

mais frequentes, podendo resultar em falhas de classificação; (b) a magnitude do efeito de um QTL detectado será geralmente subestimada, devido também à recombinação entre o marcador e o poligene. Ambos os problemas são minimizados com o aumento do número de marcadores no genoma, usualmente a intervalos menores que 15 cM (Tanksley, 1993).

Uma outra estratégia é a análise por intervalo (marcadores flanqueadores), ou seja, grupos de marcadores ligados são analisados simultaneamente com relação aos seus efeitos na característica quantitativa. Com o uso de marcadores ligados, é possível compensar a ocorrência de recombinação com o QTL, aumentando a probabilidade de detectá-lo e também de obter estimativas não tendenciosas dos seus efeitos genotípicos (Lander & Botstein, 1986, 1989). Um software amplamente empregado, que utiliza esse procedimento, é o MAPMAKER (Lander et al., 1987).

Embora o procedimento de identificação de QTLs por intervalo seja superior à análise por ponto, tem ainda a desvantagem de QTLs, situados fora do intervalo estabelecido pelos marcadores, influenciarem o efeito daqueles que ocorrem dentro do intervalo. Para sanar esse problema foi desenvolvido o procedimento de análise por intervalo composto, utilizando o programa QTL Cartographer para Windows (Jansen, 1993 e Zeng, 1994) e posteriormente esse software foi modificado para procedimento de análise por intervalo múltiplo que estima, além dos efeitos dos QTLs individuais, também a interação entre eles (Zeng et al., 1999).

Uma exigência de todos esses procedimentos é a segregação mendeliana de cada marcador livre dos efeitos de seleção. Caso a seleção atue sobre os marcadores, as alternativas para avaliar a associação dos mesmos com as expressões dos caracteres são a análise por ponto ou regressão linear múltipla (Ferreira, 1995).

Os métodos mais comuns encontrados na literatura são: diferença de valores fenotípicos médios das classes de marcadores de uma população F_2 ou gerações derivadas $F_{2:3}$ ou $F_{2:4}$ (análise por ponto); estimativas de máxima verossimilhança (MAPMAKER); regressão linear múltipla e regressão não linear múltipla (Ferreira, 1995).

2.6.3 Identificação de QTLs em feijoeiro

Em programas de melhoramento de plantas, geralmente, os caracteres de importância econômica são controlados por um grande número de genes de pequeno efeito, que são influenciados pelas condições ambientais, os quais são denominados de caracteres quantitativos ou poligênicos. A expressão desses caracteres freqüentemente não ocorre em classes distintas, pois há sobreposição entre as classes fenotípicas, originando uma distribuição contínua das medidas do caráter (Mather & Jinks, 1984; Falconer & Mackay, 1996).

Já no início do século passado, Sax (1923) associou marcadores morfológicos (coloração do grão de feijão) com caracteres quantitativos (tamanho do grão), porém o desenvolvimento destes estudos foi dificultado, devido ao pequeno número de marcadores morfológicos disponíveis, à dificuldade de obtenção de populações segregantes para estes marcadores e à herança dominante do marcador (Bearzoti, 2000). Somente com o desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas de marcadores moleculares é que o mapeamento destes caracteres voltou a receber atenção dos pesquisadores, com o intuito de entender melhor como os genes atuam no controle genético destes caracteres e como podem ser utilizados em programas de melhoramento de plantas.

Um método para integrar a genética molecular com a seleção artificial, com o objetivo de aumentar a eficiência do melhoramento, é conhecido como seleção assistida por marcadores. Índices que maximizam a taxa de

melhoramento em caracteres quantitativos sob diferentes esquemas de seleção assistida por marcadores, combinando informações de polimorfismos genético moleculares (locos marcados) com dados de variação fenotípica entre os indivíduos, já foram determinados (Lande & Thompson, 1990). Estes autores verificaram que a eficiência da seleção artificial pode ser aumentada substancialmente, embora sejam necessárias centenas de marcadores, como também a avaliação fenotípica de alguns milhares de indivíduos.

A seleção indireta, através de marcadores genéticos, tem sido sugerida para características com baixa herdabilidade, que requerem grandes populações para serem melhoradas (Zehr et al., 1992). Essas sugestões baseiam-se no fato de os marcadores serem distribuídos amplamente pelo genoma e de possuírem genótipos conhecidos, possibilitando o seu uso na identificação de indivíduos superiores de forma mais eficiente, principalmente com redução nos custos.

Para o feijoeiro, inicialmente foi desenvolvido um mapa de ligação rudimentar, com a maioria dos marcadores sendo morfológicos e alguns poucos marcadores isoenzimáticos (Basset, 1991). Análises eletroforéticas da proteína de reserva mais comum das sementes do feijoeiro (faseolina) e algumas isoenzimas identificaram dois grandes grupos: Mesoamericano e o Andino (Gepts et al., 1986). Estudos com marcadores RFLP mostraram que algumas sondas podem ser usadas para diferenciar esses dois grupos de feijoeiros, pois apesar de detectarem baixos níveis de polimorfismo dentro de cada grupo, essas sondas conseguiram detectar polimorfismo entre os grupos (Chase et al., 1991). Após a construção desse primeiro mapa, um novo mapa de ligação baseado principalmente em marcadores RFLP foi construído usando famílias de retrocruzamento de um material de origem mesoamericana (XR-235-1-1) com outro material andino (Calima) (Valejos et al., 1992). Esse mapa molecular envolveu 227 locos de marcadores moleculares RFLP, dois locos de proteínas das clorofilas a/b, um loco de pigmentação, nove isoenzimas e nove proteínas de

sementes. Foi também utilizado neste mapa dois marcadores RAPD, sendo um deles mapeado no cromossomo D e o outro no cromossomo F. Portanto, esse mapa molecular do feijoeiro inclui 250 marcadores, compreendendo 980cM, que representam aproximadamente 82% do genoma (Vallejos et al., 1992).

Nodari et al. (1993), apresentaram um mapa genético do feijoeiro, construído a partir da geração F₂, derivada do cruzamento entre uma cultivar brasileira de origem Andina (Jalo) e uma linhagem desenvolvida no CIAT de origem Mesoamericana (BAT 93). Esses genitores diferem em relação à origem evolutiva, tipo de faseolina e a várias características agronômicas. Eles analisaram a segregação de 152 marcadores, incluindo 115 locos de RFLP, 7 isoenzimáticos, 8 RAPD e outros marcadores morfológicos e de resistência a doenças. Identificaram-se 143 marcadores para 15 grupos de ligação, sendo que 9 marcadores não se ligaram a nenhum grupo de ligação. O intervalo médio entre marcadores foi de 6,5 cM, e somente um intervalo entre os marcadores mapeados foi maior que 30 cM, sendo que esse mapa cobriu uma região de 827cM, que representa, aproximadamente, 69% do genoma do feijoeiro.

Segundo Burr et al. (1988), a aplicação de marcadores moleculares, utilizando linhagens recombinantes, por meio de cruzamento entre linhagens contrastantes, poderá ajudar na identificação dos fatores genéticos que afetam a produtividade e as respostas desses fatores a diferentes ambientes.

Melo (2000), visando mapear e identificar marcadores RAPD ligados a QTLs controladores da produtividade de grãos, peso de 100 sementes, época de florescimento e reações ao oídio (*Erysiphe polygoni*) e a mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*), utilizou uma população de linhagens recombinantes provenientes do cruzamento das cultivares Mesoamericanas Carioca e Flor de Mayo. A população segregante de feijoeiro foi avaliada em diferentes ambientes e permitiu avaliar a existência de interação QTLs por locais e por época de plantio para os mesmos caracteres. O autor utilizou em seus estudos os

procedimentos de mapeamento por intervalo composto e de regressão linear múltipla (Stepwise). Constatou que há a possibilidade de identificar marcadores moleculares ligados a QTLs de características de importância agrônômica em feijoeiro, por meio de ambos procedimentos de análise. Utilizando a regressão linear múltipla, o autor relata a identificação de 23 marcadores para produtividade e grãos, 18 para peso de sementes, 8 para época de florescimento, 12 para reação ao oídio e 10 para mancha angular. Com esse método, foi possível explicar 62,5% da variação para florescimento por meio de QTLs, 16,6% para peso de sementes, 41,67% para reação a oídio, 40,0% para mancha angular e 8,70% para produtividade de grãos, considerando a média de todos os ambientes. Para o processo de mapeamento por intervalo composto, identificaram-se oito para produtividade de grãos, quatro para peso de sementes, três para florescimento, 10 para reação a oídio e dois para mancha angular. Esses marcadores, se utilizados em um programa de seleção assistida por marcadores, podem contribuir para o aumento da eficiência de seleção.

Tar'na et al. (2002), usando os marcadores RFLP, SSR, AFLP e RAPD, identificaram 29 QTLs associados com caracteres agrônômicos no feijoeiro comum. Foram identificados QTLs para hábito de crescimento, dias para o florescimento, dias de maturação, acamamento de plantas e produtividade de grãos, mostrando a possibilidade de identificar marcadores moleculares úteis ao processo de melhoramento do feijoeiro.

O efeito das dimensões experimentais tais como o tamanho da amostra e o número de ambientes testados, a capacidade de detecção de QTL bem como a exatidão e a precisão da estimativa de QTL têm sido investigados em estudos de simulação, geralmente com a hipótese de poucos (≤ 10) QTL segregantes. Schön et al. (2004) utilizaram-se de simulações computacionais para testar a utilidade das estimativas imparciais do efeito de QTL. Para isso, utilizaram 976 progênies F_5 do cruzamento teste de milho, avaliados em 19 ambientes

diferentes. Em estudos de simulação, é conhecido que a distribuição de recursos experimentais tem um efeito crucial na capacidade de detectar QTL como também na precisão de estimativas de QTL. Eles verificaram, através desse estudo, que a máxima discrepância genotípica explicada por QTL foi de 52,3% para unidade de grãos, apesar do número grande de QTLs detectados. Em dados simulados e experimentais, o efeito do tamanho da amostra, na capacidade de detecção de QTL como também na exatidão e precisão de estimativas de QTL, foi grande. O número de QTL detectados e a proporção da discrepância genotípica geralmente explicada por QTL aumentou mais com o aumento do tamanho da amostrado do que com o aumento do número de ambientes testados.

Em consequência das avaliações experimentais para a detecção de QTLs terem incluídos números inferiores de indivíduos segregantes e de marcadores, em relação aos recomendados nos estudos de simulação, em geral, parcelas relativamente pequenas da variação fenotípica dos caracteres são explicadas pelos QTLs. Em razão desse fato e da interação genótipos por ambientes, as informações dos QTLs ainda são pouco utilizadas para auxiliar na seleção (Schön et al., 2004).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, A. de F. B. **Predição do potencial genético de populações segregantes do feijoeiro utilizando genitores inter-raciais**. 1997. 79 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- ABREU, A. de F. B.; RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; MARTINS, L. A. Progresso do melhoramento genético do feijoeiro nas décadas de setenta e oitenta nas regiões Sul e Alto Paranaíba em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 105-112, jan. 1994
- ALLARD, R. W. Genetic changes associate with the evolution of adaptedness in cultivated plants and their wild progenitors. **Journal of Heredity**, Baltimore, v. 79, n. 4, p. 225-238, Jun./Aug. 1988.
- ALLARD, R. W. **Principles of plant breeding**. 2. ed. John Wiley & Sons, 1999. 254 p.
- ALLARD, R. W.; WORKMAN, P. L. Population studies in predominantly self-pollinated species. IV seasonal fluctuations in estimated of genetic parameters in lima bean populations. **Evolution**, Washington, v. 17, n. 4, p. 470-480. 1963.
- BAENZIGER, P. S.; PETERSON, C. J. Genetic variation: its origin and use for breeding self-pollinated species. In: STALKER, H. T.; MURPHY, J. P. **Plant breeding in the 1990's**. Raleigh: North Carolina State Universty, 1991. p. 69-100.
- BASSET, M. J. A revised linkagem map of common bean. **Hort Science**, Alexandria, v. 26, n. 7, p. 834-836, July 1991.
- BEARZOTI, E. Mapeamento de QTL. In: JORNADA EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2000, Goiânia. **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia: UFG, 2000. 232 p.
- BEARZOTI, E. **Simulação de seleção recorrente assistida por marcadores moleculares em espécies autógamas**. 1998. 230 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 1997. 547 p.
- 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.
- BURR, B.; BURR, F. A.; TONPSON, K. H.; ALBERTSEN, M. C.; STUBER, C. W. Gene mapping with recombinant inbreds in maize. **Genetics**, Bethesda, v. 118, n. 3, p. 519-526, Mar. 1988.
- CHARLESWORTH, B.; SIIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, London, v. 371, n. 6494, p. 215-220, Sept. 1994.
- CHASE, C. D.; ORTEGA, V. M.; VALLEJOS, C. E. DNA restriction fragment length polymorphisms correlate with isozyme diversity in *Phaseolus vulgaris* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 81, n. 6, p. 806-811, 1991.
- CORTE, H. R. **Comportamento de populações segregantes de feijão, avançadas pelo método do “bulk”, por dezessete gerações**. 1999. 95 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- DUARTE, J. M.; SANTOS, J. B.; MELO, L. C. Genetic divergence among common bean cultivars from different races based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 3, p. 419-426, Sept. 1999.
- FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4. ed. Essex, England: Longman, 1996. 464 p.
- FERH, W. R. **Principles of cultivar development**. New York: Macmillan, 1987. 525 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 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. p. 220.

GAITÁN-SOLÍS, E.; DUQUE, M. C.; EDWARDS, K. J.; TOHME, J. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, e cross-species amplification in *Phaseolus* ssp. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 6, p. 2128-2136, Nov./Dec. 2002.

GEPTS, P. Biotechnology sheds light on bean domestication in Latin America. **Diversity**, Bethesda, v. 7, n. 1/2, p. 49-50, 1991.

GEPTS, P. Phaseolin as an evolutionary markers. In: **Genetics resources of Phaseolus beans**. Dodrecht: Kluwer, 1988. p. 215-241.

GEPTS, P.; BLISS, F. A. Phaseolin variability among wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Colombia. **Economic Botany**, New York, v. 40, n. 4, p. 469-478, Oct./Dec. 1985.

GEPTS, P.; DEBOUCK, D. G. Origin, domestication and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: VAN SCHOONHOVEN, A.; VOYSEST, O. **Common bean: research for crop improvement**. Cali: CIAT, 1991. v. 1, p. 7-53.

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

GONÇALVES, F. M. A. **Seleção natural em populações segregantes do feijoeiro**. 2000. 98 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

HAMBLIN, J. Effect of environment, seed size and competitive ability on yield and survival of *phaseolus vulgaris* L. genotypes in mixtures. **Euphytica**, Wageningen, v. 24, n. 3, p. 435- 335, June 1975.

HAMBLIN, J. Pant breeding interpretations of the effects of bulk breeding on four populations of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, Wageningen v. 26, n. 1, p. 157-168, Feb. 1977.

HAMBLIN, J.; MORTON, J. R. Genetic interpretations of the effects of bulk breeding on four populations of beans (*phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 26, n. 1, p. 75-83, Feb. 1977.

HARLAN, H. V.; MARTINI, M. L. The effect of natural selection in a mixture of barley varieties. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 57, n. 3, p. 189-199, Aug. 1938.

HEDRICK, P. W. **Genetics of populations**. 2 ed. Sudbary: Jones and Bartlett Publishers, 1999. 553 p.

JANSEN, R. C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. **Genetics**, Bethesda, v. 135, n. 1, p. 205-211, Sept. 1993.

JAYAKAR, S. D. On the detection and estimation of linkage between a locus influencing a quantitative character and a marker locus. **Biometrics**, Raleigh, v. 26, n. 3, p. 451-464, Sept. 1970.

KOENIG, R.; GEPTS, P. Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centers of genetic diversity. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 78, n. 6, p. 809-817, 1989.

KOENIG, R.; SINGH, S. P.; GEPTS, P. Novel phaseolin types in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, New York, v. 44, n. 1, p. 50-60, 1990.

LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in improvement of quantitative traits. **Genetics**, Baltimore, v. 124, n. 3, p. 743-756, Mar. 1990.

LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping complex genetic traits in humans: new methods using a complete RFLP linkage map. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, Bungtown, v. 51, n. 1, p. 49-62, 1986.

LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, Baltimore, v. 121, n. 1, p. 185-189, Jan. 1989.

LANDER, E. S.; GREEN, P.; ABRAHANSON, J. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomic**, San Diego, v. 1, p. 174-181, 1987.

LAW, C. N. The location of genetic factors controlling a number of quantitative characters in wheat. **Genetics**, Baltimore, v. 56, n. 3, p. 445-461, 1967.

MACHADO, C. F.; SANTOS, J. B.; NUNES, G. H. S.; DUARTE, J. M. Efficiency of genetic distance based on RAPD markers for choosing parents of common bean. **Journal Genetic & Breeding**, Rome, v. 54, n. 4, p. 251-258, Dec. 2000.

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.

MATHER, K.; JINKS, J. L. **Introdução à genética biométrica**. Trad. De J. F. M. Duarte, F. M. Sene, H. A. Rothschild et al. Ribeirão Preto: sociedade Brasileira de Genética, 1984. 242 p.

MELO, L. C. **Mapeamento de QTLs em feijoeiro, por meio de marcadores RAPD, em diferentes ambientes**. 2000. 148 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR- Amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 175-182, Jan. 1993.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific Synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzimology**, Oxford, v. 55, p. 335-350, 1987.

NEUMANN, P. E. Two-locus linkage analysis using recombinant inbred strains and Bayes theorem. **Genetics**, Baltimore, v. 126, n. 1, p. 277-284, Sept. 1990.

NODARI, R. O.; TSAI, S. M.; GILBERTSON, R. L.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean, 2. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, n. 5, p. 513-520, 1993.

PIROLA, L. H.; RAMALHO, M. A. P.; CARNEIRO, J. E. de S.; ABREU, A. de F. B. Natural selection and family x location in the common (dry) bean plant. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 3, p. 343-347, Sept. 2002.

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**, v. 3, p. 645-648, 1991

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B.; SANTOS, J. B. Genetic progress in common bean after four cycles of recurrent selection. **Bean improvement cooperative**, Amsterdam, v. 46, p. 47-48, 2003.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; ZIMMERMANN, M. J. de O. **Genética quantitativa em plantas autógamas; aplicações ao melhoramento do feijoeiro**. Goiânia: UFG, 1993. 271 p.

SAIKI, R. K.; SHCARF, S. J.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. 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.

SANTOS, J. B. dos; GAVILANES, M. L. Botânica. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão: Aspectos Gerais**. Viçosa: UFV, 1998. p. 55-81.

SAX, K. The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. **Genetics**, Bethesda, v. 8, p. 552-560, 1923.

SCHÖN, C. C.; FRIEDRICH UTZ, H.; GROH, S.; TRUBERG, B.; OPENSHAW, S.; MELCHINGER, A. E. Quantitative trait locus mapping based on resampling in a vast maize testcross experiment and its relevance to quantitative genetics for complex traits. **Genetics**, Bethesda, v. 167, n. 1, p. 485-498, May 2004.

SCOTT, K. D.; EGGLE, P.; SEATON, G.; ROSSETTO, E. M.; LEE, L. S.; HENRY, R. J. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 5, p. 723-726, Mar. 2000.

SILVA, N. O. **Seleção natural e a decisão do melhorista sobre o melhor momento de abrir o “bulk” na cultura do feijoeiro**. 2003. 56 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SILVER, J. Confidence limits for estimates of gene linkage based on analysis of recombinant inbred strains. **The Journal of Heredity**, Baltimore, v. 76, n. 6, p. 436-440, Nov./Dec. 1985.

SINGH, S. P. Patterns of variation in cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Economic Botany**, New York, v. 43, n. 1, p. 39-57, Mar. 1989.

- SINGH, S. P.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D. G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, New York, v. 45, n. 3, p. 379-396, July/Sept. 1991
- SKROCK, P.; TIVANG, J.; NIENHUIS, J. Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. In: APPLICATIONS OF RAPD TECHNOLOGY TO PLANT BREEDING, Minneapolis, 1992. **Proceedings...** Minneapolis: Crop Science Society of America, 1992. p. 26-30.
- 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.
- SPRECHER, S. L. Isozyme genotypic differences between the large seed and small seed gene pools in *Phaseolus vulgaris* L. . **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 31, p. 36-37, 1988
- TANKSLEY, S. D. Mapping polygenes. **Annual Reviews of Genetic**, Palo Alto, v. 27, p. 205-233, 1993.
- TAR'AN, B.; MICHAELS, T. E.; PAULS, K. P. Genetic mapping of aronomic traits in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 2, p. 544-556, Mar./Apr, 2002.
- VALLEJOS, C. E.; SAKIYAMA, N. S.; CHASE, C. D. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. **Genetics**, Bethesda, v. 131, n. 3, p. 733-740, July 1992.
- VIEIRA, C.; BORÉM, A.; RAMALHO, M. A. P. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 273-349.
- WELLER, J. I. Maximum likelihood techniques for the mapping and analysis of quantitative trait loci with the aid of genetic markers. **Biometrics**, Raleigh, v. 42, n. 3, p. 627-640, Sept. 1986.
- ZEHR, B. E.; DUDLEY, J. W.; CHOJECKI, J. Some practical considerations for using RFLP markers to aid in selection during inbreeding for maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 84, n. 5/6, p. 704-708, Aug. 1992.
- ZENG, Z. B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, Bethesda, v. 136, n. 4, p. 1457-1468, Apr. 1994.

ZENG, Z. B.; KAO, C. H.; BASTEN, C. J. Estimating the genetic architecture of quantitative traits. **Genetical Research**, New York, v. 74, n. 3, p. 279-289, Dec. 1999.

CAPÍTULO II

EFEITO DA SELEÇÃO NATURAL EM ALELOS DE MICROSSATÉLITES (SSR) DO FEJJOEIRO

RESUMO

RODRIGUES, Taislene Butarello. Efeito da seleção natural em alelos de microssatélites (SSR) do feijoeiro. In: _____. **Efeito da seleção natural em alelos de microssatélites(SSR) do feijoeiro e associação com QTLs de caracteres agronômicos**. 2004. Cap. 2. p. 32-62. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Visando identificar o efeito de seleção natural em alelos de microssatélites (SSR – Simple Sequence Repeat), utilizaram-se duas populações segregantes de feijão (F_8 e F_{24}), provenientes do cruzamento do Carioca MG x ESAL686. A população segregante F_2 foi conduzida até as gerações F_8 e F_{24} pelo método da população (bulk), e foram amostradas 107 plantas de cada uma das duas populações. Cada planta deu origem à uma família, que foi conduzida pelo método bulk até $F_{8:11}$ e $F_{24:27}$. A extração de DNA foi realizada nas famílias $F_{8:11}$ e $F_{24:27}$, utilizaram-se nas reações de SSR, 30 pares de primers que identificaram polimorfismo nos pais e no bulk das famílias $F_{24:27}$. Vinte e nove dos 30 locos foram selecionados pela seleção natural, favorecendo os alelos de SSR do Carioca MG; e um único alelo do ESAL 686 foi selecionado. A seleção natural afetou todas as gerações e sua intensidade foi específica para cada locos e geração. Portanto, todos os alelos selecionados de cada loco devem ser importantes para a adaptação em um programa de melhoramento.

*Orientador: João Bosco dos Santos – Universidade Federal de Lavras (UFLA).

ABSTRACT

RODRIGUES, Taislene Butarello. Effect natural selection on common bean SSR alleles. In: _____. **Effect of natural selection on common bean SSR alleles and their association with agronomical QTLs.** 2004. Cap.2. p. 32-62. Dissertation (Master in Genetics and Plant Breeding) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Aiming at identifying the effect of natural selection on microsatellite (SSR – Simple Sequence Repeat) markers, two segregating populations (F_8 and F_{24}) of common bean (*Phaseolus vulgaris*), from the Carioca MG x ESAL686 cross were used. The F_2 population were conducted up to F_8 and F_{24} through the bulk method, and 107 plants were sampled in each of those two populations. Each plant derived one family that was conducted through the bulk within family procedure up to $F_{8:11}$ and $F_{24:27}$. DNA extraction was set up from each family and used in the SSR reaction with 30 pair of primers that identified polymorphism in the parents and in a DNA bulk of the $F_{24:27}$ families. The SSR alleles from Carioca MG were selected by natural selection in 29 out 30 loci; and in only one was selected the allele from ESAL 686. The natural selection affected all generations, and its intensity was specific for each locus and generation. Therefore, the selected alleles of all loci should be important for improving adaptation in breeding programs.

* Guidance Committee : João Bosco dos Santos - (Major Professor)

1 INTRODUÇÃO

Durante a condução de uma população segregante, a seleção natural atua de forma a selecionar os indivíduos mais adaptados. Resta saber se essa seleção atua na direção desejada pelos melhoristas ou não. Sabe-se que, para certos caracteres, como hábito de crescimento e ciclo, nem sempre ela ocorre na direção almejada. Contudo, para produtividade de grãos, tem sido comprovado que a seleção natural contribui para manter indivíduos mais produtivos (Hamblin, 1977; Allard, 1988 e Corte, 1999). Em populações segregantes de feijoeiro, submetidas aos efeitos da seleção natural por mais de sete gerações, constatou-se aumento acentuado na produtividade de grãos. Para outros caracteres, como hábito de crescimento e peso de 100 grãos, a seleção natural contribui de modo a manter predominantemente indivíduos com hábito de crescimento indeterminado e com sementes menores (Gonçalves, 2000).

Por meio de estudos com isoenzimas e marcadores moleculares, realizados por Allard (1988), foi observada a ocorrência de mudanças nas frequências alélicas na maioria dos locos devido à ação da seleção natural.

Para determinar o efeito da seleção natural sobre os genótipos de uma população autógama, Allard & Workman (1963); Allard & Hansche (1964); Allard et al. (1968) e Hedrick (1999), propuseram a determinação dos coeficientes de adaptabilidade relativa sobre cada genótipo de um dado gene. Verificaram que esses coeficientes flutuavam ao longo das gerações de autofecundação, e que a variabilidade nos coeficientes de seleção é devida a mudanças na composição genotípica das populações.

Esse trabalho teve por objetivo identificar alelos de microssatélites afetados pela seleção natural em populações segregantes de feijão, conduzidas por meio do método da população (bulk).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de condução do experimento

Os experimentos foram conduzidos na área experimental e no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, município de Lavras, localizada na Região Sul do Estado de Minas Gerais, a 910 metros de altitude, 21^o 58' S de latitude e 45^o 22' W de longitude.

2.2 Obtenção da população segregante

Foi utilizada uma população segregante proveniente do cruzamento dos genitores Carioca MG e ESAL 686. A Carioca MG é uma cultivar proveniente da Universidade Federal de Lavras que possui hábito de crescimento indeterminado tipo II, com grãos pequenos, tegumento creme com estrias marrons, portadora do alelo *Co.2* de resistência a algumas raças do fungo causador da antracnose e de ciclo normal. A ESAL 686 é uma linhagem proveniente da Universidade Federal de Lavras com hábito de crescimento indeterminado tipo I, com grãos grandes, tegumento amarelo, de ciclo precoce (80 dias) e resistente à mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*).

O cruzamento entre esses dois genitores e o avanço das gerações de F₂ até F₁₈, foram realizados por Corte (1999). Dando continuidade, Gonçalves (2000) avançou as gerações de F₁₉ à F₂₄. As populações segregantes foram avançadas pelo método da população (bulk). Em cada geração, após a colheita, uma amostra das sementes de cada população foi utilizada para obter a geração seguinte.

No presente estudo foram utilizadas 107 famílias descendentes da geração F₈ (F_{8:11}) e 107 da F₂₄ (F_{24:27}), também utilizados por Silva (2003), além

dos dois genitores. Quinze sementes de cada família, foram semeadas em bandeja para a extração de DNA.

2.3 Extração de DNA

A extração de DNA foi feita de acordo com o procedimento semelhante ao usado por Nienhuis et al. (1995), da seguinte forma: foram usadas cerca de 2g de folhas jovens das 15 plantas de cada família, que foram maceradas com 10 ml de tampão de extração a 65°C em um almofariz. O tampão de extração contém 2% de CTAB, 100 mM de TRIS (pH8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 1.4M NaCl e 1% PVP (polivinilpirrolidona). O material triturado foi colocado em um tubo de centrífuga juntamente com 30 µL de β-mercapto-etanol, encubados por cerca de 30 minutos em banho-maria a 65°C. Após, foi realizada a primeira extração de DNA com 10ml de mistura clorofórmio: álcool isoamil (24:1).

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 30ml da mistura álcool 95%: acetato de amônia (6:1). Essa mistura foi colocada no freezer por, pelo menos, uma hora. Após a precipitação, os ácidos nucleicos foram transferidos para tubos de microcentrífuga. 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 acetato de sódio: etanol 95% (1:20). 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 TE para a concentração de 10ng/µL para ser utilizado nas reações.

2.4 Reação de SSR (Simple Sequence Repeat)

A reação de microssatélite ocorreu em termociclador Mastercycler Gradient 5331 eppendorf versão 2.22 31-09. Ela iniciou-se com a desnaturação do DNA a 95°C por dois minutos, seguido de 32 ciclos. Cada ciclo foi representado pela desnaturação a 94°C por 20s, a fase de anelamento variou entre 46 a 68°C de acordo com o primer utilizado, por 20s, e uma fase de alongamento a 72°C por 20s e, por fim, uma fase de alongamento a 72°C por 10 min.. Para cada reação foram utilizados 5,94µL de água de pura, 1,65µL de tampão, 0,66µL de dNTPs (2,5mM), 1,65µL de cada par de primer (4mM), 3,3µL de DNA (10ng/µL), 1,44µL de taq diluente e 0,2µL de enzima taq polimerase. Depois da amplificação, os produtos da reação foram separados por eletroforese em gel de agarose, variando de 2,0% a 2,5%, corado com brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta com câmera digital.

2.5 Obtenção e análise dos dados

2.5.1 Pré-seleção dos pares de primers selecionados pela seleção natural

Utilizaram-se 105 pares de primers SSR, dos quais 37 SSR desenvolvidos por Yu et al. (2000) para *P. vulgaris* e 68 pares desenvolvidos por Gaitán-Solís et al. (2002). Dos 37 pares citados por Yu et al. (2000), 12 apresentaram polimorfismo e apenas 18 dos 68 pares mencionados por Gaitán-Solís et al. (2002) foram polimórficos. Portanto, dos 105 pares de primers avaliados, 30 (28,57%) apresentaram locos polimórficos e 75 (71,43%) apresentaram locos monomórficos (Tabela 1A).

Foi efetuado preliminarmente reações com os genitores Carioca MG, ESAL 686 e um "bulk", constituído por uma mistura equitativa de DNA das 107 famílias F_{24:27}. Os primers polimórficos selecionados foram utilizados para a avaliação das 107 famílias F_{24:27} e das 107 famílias F_{8:11}.

Os fragmentos de DNA amplificados por cada par de primers foram identificados em cada família como: 0, aquela banda que apresentou apenas o fragmento proveniente do genitor Carioca MG, 1, a banda proveniente do genitor ESAL 686 e 2, a família heterozigótica portadora dos fragmentos dos dois genitores.

As temperaturas de anelamento, porcentagem de agarose e o tempo de eletroforese variaram de acordo com os pares de primers SSR. Para os 30 pares de primers polimórficos, apenas um apresentou temperatura de anelamento equivalente a 68-60 °C, 19 anelaram a 58-60°C, 8 anelaram a uma temperatura de 55°C e apenas um par de primer a 46°C. As concentrações dos géis a base de agarose, também variaram de acordo com o tamanho do fragmento amplificado para cada par de primers (2,0 a 2,5%). A duração da eletroforese, nos géis de agarose foi de 2:30 à 3:30 horas, de acordo com cada primer estudado, à uma potência de 100 Watts (Tabela 2A).

A estimativa do tamanho de cada fragmento de DNA foi realizada por meio do procedimento sugerido por Sambrook et al. (1989). O tamanho das bandas (pb) relativas aos genitores Carioca MG, ESAL 686 e o ‘bulk’ das 107 famílias F_{24:27}, estão representadas no Tabela 3A.

2.5.2 Teste da alteração das freqüências genótípicas nas populações segregantes

As proporções genótípicas das duas populações foram comparadas para cada primer por meio do teste de χ^2 , cuja expressão geral é:

$$\chi^2 = \sum \frac{(FO - FE)^2}{FE}, \text{ onde FO é a freqüência observada e FE a freqüência}$$

esperada. Seja “A¹” o fragmento de DNA (alelo) proveniente do genitor Carioca MG e “A²” o alelo proveniente do genitor ESAL 686, ambos amplificados por um dos primers utilizados. Assim, na j-ésima população segregante, sendo j = 1

correspondente a F_8 e $j = 2$ correspondente a F_{24} , ocorrem os i -ésimos genótipos, sendo $i = 1$ correspondente a A^1A^1 , $i = 2$ correspondente a A^1A^2 e $i = 3$ correspondente a A^2A^2 . Representando por n_{ij} o número observado do i -ésimo genótipo na j -ésima geração, o número esperado correspondente é dado por:

$$e_{ij} = \frac{(n_{i.} \cdot n_{.j})}{n_{..}}, \text{ em que } n_{i.} = \sum_{j=1}^2 n_{ij}, n_{.j} = \sum_{i=1}^3 n_{ij} \text{ e } n_{..} = \sum_{ij} n_{ij} \text{ (Steel \& Torrie, 1980).}$$

Para essas condições, tem-se então a estimativa do χ^2 , em que

$$\chi^2 = \sum_{ij} \frac{(n_{ij} - e_{ij})^2}{e_{ij}}, \text{ com dois graus de liberdade, isto é, o produto do número}$$

de populações menos um pelo número de genótipos por família menos um.

2.5.3 Estimativas das freqüências genóticas e do coeficiente de adaptabilidade relativa nas gerações sucessivas da F_2 até F_{24}

Considerando que a estimativa da taxa de cruzamento natural do feijão na região é de aproximadamente $T = 0,005$ (Pereira Filho & Cavariani, 1994; Marques Júnior & Ramalho, 1995), e a taxa correspondente de autofecundação $S = 1-T = 0,995$, foram estimadas as freqüências genóticas para cada par de primer (loco).

Assim, sendo “ A^1 ” e “ A^2 ” as freqüências alélicas em cada loco, as freqüências genóticas estimadas nas gerações n e $n+1$ são fornecidas pelas expressões (Allard et al., 1968):

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

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

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

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 e de F_8 a F_{24} por meio das expressões (Allard & Hansche, 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 genotípicas da geração n, são as esperadas em F_7 na ausência de seleção natural. Já em F_{23} , são as esperadas a partir das proporções observadas em F_8 , também admitindo-se a ausência de seleção natural.

As estimativas dos coeficientes médio de adaptabilidade relativa ($\overline{\omega_1}$ e $\overline{\omega_3}$) foram obtidas de modo iterativo, de F_2 a F_8 e de F_8 a F_{24} (Jain & Allard, 1960). O ajuste das estimativas foi realizado por meio do teste de χ^2 , envolvendo as frequências genotípicas esperadas de F_2 a F_8 e de F_8 a F_{24} , que foram estimadas por meio das expressões (Allard & Hansche, 1964 e Allard et al., 1968):

$$\text{Freq}(A^1A^1) = f_1^{(n+1)} \propto \omega_1 \{ [S(f_1^{(n)} + 0,25f_2^{(n)})] + T[f_1^{(n)} + 0,5f_2^{(n)}]^2 \}$$

$$\text{Freq}(A^1A^2) = f_2^{(n+1)} \propto \omega_2 \{ 0,5Sf_2^{(n)} + 2T[f_1^{(n)} + 0,5f_2^{(n)}][f_3^{(n)} + 0,5f_2^{(n)}] \}$$

$$\text{Freq}(A^2A^2) = f_3^{(n+1)} \propto \omega_3 \{ [S(f_3^{(n)} + 0,25f_2^{(n)})] + T[f_3^{(n)} + 0,5f_2^{(n)}]^2 \}$$

Nessas expressões, as proporcionalidades podem ser transformadas em igualdades pela divisão da soma dos termos à direita do sinal de proporcionalidade para cada genótipo (geração n) pela soma do termo do lado direito dos três genótipos, isto é, o somatório das frequências dos três genótipos na geração n.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 está ilustrada a pré-seleção dos pares de primers SSR. Nela pode-se diferenciar as bandas do Carioca MG (C), ESAL 686 (E) e do “bulk” das 107 famílias $F_{24:27}$ (B). Nesse exemplo, nota-se que o primeiro primer e o último, X74919 e JO1263, respectivamente, apresentaram polimorfismo do mesmo modo que os outros 28 pares de primers utilizados no estudo. Portanto, aparentemente todos os fragmentos de DNA polimórficos foram selecionados pela seleção natural, pois no bulk somente foi identificada predominantemente a banda de um dos genitores. No caso dos 12 primers desenvolvidos por Yu et al. (2000), os fragmentos foram mapeados em cinco cromossomos diferentes, indicando que a seleção natural provavelmente exerceu seu efeito ao longo de todo o genoma do feijão. Isso é confirmado pelo seu efeito em todos os 30 locos segregantes.

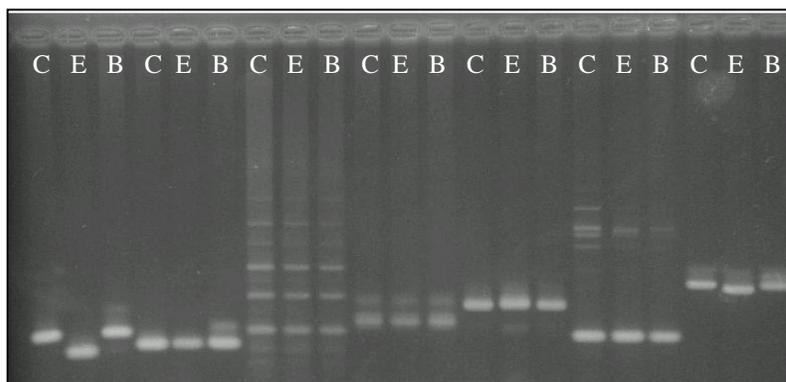


FIGURA 1 – Padrão de bandas das cultivares Carioca MG (C), ESAL 686 (E) e do “bulk” das 107 famílias $F_{24:27}$ (B).

O tamanho das bandas (pb), de acordo com Sambrook et al. (1989), está apresentado na Tabela 3A, onde pode ser visualizado o tamanho de cada fragmento de DNA relativo aos genitores Carioca MG, ESAL 686 e o “bulk” das 107 famílias $F_{24:27}$. Como pode ser observado, na maioria dos locos polimórficos o tamanho das bandas do “bulk” é equivalente ao do parental Carioca MG. Isso já era esperado, uma vez que o Carioca MG é mais adaptado do que o genitor ESAL 686 (Ramalho & Abreu, 1998; Singh, 1992). Apenas uma exceção foi encontrada quanto ao loco X60000, cujo tamanho de sua banda no “bulk” equivaleu ao do ESAL 686, indicando para esse loco maior adaptabilidade dessa região genômica.

É importante salientar que o fragmento de DNA, amplificado pelo primer SSR BM154 foi observado apenas no genitor ESAL 686. Como nenhuma banda foi observada no genitor Carioca MG e nem no bulk, há a possibilidade dele ser um marcador dominante (Liu et al., 2001; Silva, 2003). Além disso, a ausência do marcador no bulk, como na maioria dos casos, implica que a presença do fragmento, amplificado na linhagem ESAL 686 confere menor adaptação do que a sua ausência no genitor Carioca MG (Tabela 3A).

3.1 Frequências genotípicas observadas em F_8 e F_{24}

A partir do cruzamento das linhagens Carioca MG x ESAL 686, a população segregante F_2 foi conduzida em bulk até a geração F_8 , de onde foi tomada uma amostra de 107 plantas. A população continuou sendo avançada em bulk até F_{24} , onde novamente foi tomada outra amostra de 107 plantas.

Considerando como “A¹” o alelo do genitor Carioca MG em todos locos e como “A²” o alelo do genitor ESAL 686, os números observados dos genótipos em F_8 e F_{24} estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 – Números observados dos genótipos para os fragmentos amplificados de microssatélites em F₈ e F₂₄ e comparação das duas populações por meio do χ^2 .

Primer	Geração F ₈			Geração F ₂₄			χ^2 ^{a/}
	A ¹ A ¹	A ¹ A ²	A ² A ²	A ¹ A ¹	A ¹ A ²	A ² A ²	
BM139	81	14	12	103	3	1	19,0558***
BM141	63	8	36	87	20	0	44,9829***
BM143	56	32	19	82	8	17	19,4097***
BM149	86	0	21	106	1	0	24,0833***
BM152	77	21	9	103	3	1	23,6556***
BM154	54	0	53	105	0	2	63,6494***
BM156	32	40	35	93	3	11	74,1269***
BM157	95	7	5	91	15	1	5,6618*
BM160	81	13	13	107	0	0	29,5957***
BM164	79	24	4	107	0	0	32,2151***
BM165	61	5	41	85	0	22	14,6754***
BM172	69	29	9	92	14	1	14,9183***
BM175	60	18	29	107	0	0	60,2275***
BM201	92	3	12	78	0	29	11,2017***
BM205	83	0	24	98	0	9	8,0613**
BM210	81	4	22	99	1	7	11,3586***
BM211	81	0	26	96	0	11	7,3523**
GATS91	38	19	50	69	12	26	18,1409***
JO1263	90	0	17	107	0	0	18,4670***
JO4555	67	21	19	82	0	25	23,3282***
K03289	70	20	17	99	5	3	23,7763***
M75856	74	0	33	105	0	2	32,8259***
U18349	72	0	35	107	0	0	41,8436***
U77935	88	0	19	96	4	7	9,8863**
X52626	88	0	19	107	0	0	20,8513***
X57022	77	0	30	103	1	3	26,8465***
X60000	14	0	93	15	0	92	0,0399 ^{ns}
X61293	48	2	57	100	2	5	61,8832***
X74919	53	41	13	97	4	6	45,9078***
X96999	85	0	22	104	0	3	16,3501***

a/ ns = P = 0,84; * = P ≤ 0,05; ** = P ≤ 0,01; *** = P ≤ 0,001.

Na ausência de seleção, as proporções esperadas de F_8 , considerando $T = 0,005$ e $S = 0,995$ e de acordo com as expressões de Allard et al. (1968) são de $0,4938 A^1A^1$; $0,0124 A^1A^2$ e $0,4938 A^2A^2$ e, em F_{24} são de $0,4975 A^1A^1$; $0,0050 A^1A^2$ e $0,4975 A^2A^2$. Portanto, constata-se que a seleção natural atuou em todos os locos de microssatélites. Observa-se na Tabela 1, que o efeito da seleção natural ocorreu tanto nas primeiras gerações de autofecundação até F_8 como também nas gerações mais avançadas, pois elas diferiram em 29 dos 30 locos, isso porque, considerando os números esperados de genótipos em F_8 e F_{24} , na ausência da seleção natural, as diferenças entre eles são tão pequenas que não são detectadas estatisticamente ($\chi^2 = 0,3400$; $P = 0,8437$).

Entre os primers que identificaram polimorfismo nos genitores e desenvolvidos por Yu et al. (2000), o SSR JO4555 está relacionado com o gene que codifica a proteína kinase-1. O SSR K03289 faz parte de uma família de genes que codificam para a lectina ou phytohemaglutinina (PHA) e o SSR U77935 para os genes que codificam para *sn*-glicerol-3-posfato aciltransferase, tal como a proteína DNAJ-like e a chalcone sintase.

As proteínas kinase 1 estão relacionadas com os processos metabólicos e celulares da planta, para a atuação de enzimas metabólicas, entre elas a Acetil CoA-carboxilase (Halford et al., 2003). As lectinas ou phytohemaglutinina (PHA) são glicoproteínas presentes nos cotilédones e endospermas das sementes (Díaz et al., 1999). Estudos realizados por Fritz et al. (1995), demonstraram que a proteína *sn*-glicerol-3-fosfato aciltransferase, é responsável pela tolerância ao frio. A proteína DNAJ-like é similar ao gene ARG1, que está relacionado à transdução de sinais em sementes de *Arabidopsis*. Esta proteína também está relacionada a efeitos luminosos que atuam nas raízes dessa planta (Guan et al., 2003).

A Chalcone sintase (CHS) é responsável pela formação primária dos flavonóides, os quais estão presentes em várias funções fisiológicas da planta, e

principalmente na absorção dos raios ultra-violetas, nas folhas. O acúmulo de flavonóides e isoflavonoides em resposta ao ataque de patógenos tem sido verificado em muitas espécies e sua importância como fitoalexina antiobiotica é bem conhecida (Christensen et al., 1998)

Gaitán-Solís et al. (2002) observaram que os microssatélites flanqueiam seqüências que mostram homologia a nível de nucleotídeos para quatro seqüências de microssatélites de *P. vulgaris* isolados em clones MADS. Em plantas, as proteínas MADS box parecem estar principalmente relacionadas com o controle genético do desenvolvimento das flores (revisão Greco et al., 1997). Isto tem sido fortemente sugerido para o controle da cadeia regulatória do desenvolvimento de flores, que foi conservada durante a evolução das plantas (Ma, 1994; Theissen & Saedler, 1995).

Constatou-se que cinco dos 19 pares de primers polimórficos, citados por Gaitán-Solís et al. (2002), apresentaram essa homologia (Tabela 2).

TABELA 2 - Ácido nucléico e proteína homologas de *P.vulgaris* de clones microssatélites usados no estudo de seqüência em GenBank (Gaitán-Solís et al., 2002).

Primer	CIAT Acesso ao GenBank	DNA homólogo	Proteína homóloga	Organismos marcados
BM139	AF483857	Microssatélite DNA, clone MADS	-	<i>P. vulgaris</i>
BM152	AF483868	<i>Glycine max</i> clone cDNA	-	<i>Glycine max</i>
BM160	AF483876	-	Proteína hipotética	<i>A. thaliana</i>
BM175	AF483886	<i>Glycine max</i> clone cDNA	-	<i>Glycine max</i>
BM210	AF483902	-	Contém similaridade a ácido graxo de ciclopropano sintase	<i>A. thaliana</i>

As informações de associações de vários microssatélites com diferentes genes, cujos produtos participam de diferentes vias metabólicas da planta, permitem inferir que os produtos das mesmas são afetados pela seleção natural e refletiram nas alterações das frequências genotípicas dos locos SSR.

3.2. Estimativas das frequências alélicas observadas e esperadas em F_8 e F_{24}

Como as duas populações originaram-se de um cruzamento biparental, deduz-se que as frequências alélicas em todos locos segregantes eram de 0,5 na geração F_2 e elas deveriam permanecer inalteradas na ausência da seleção natural. Observa-se na F_8 (Tabela 3) que em 25 locos de microssatélites houve um aumento da frequência do alelo proveniente do genitor Carioca MG, indicando que a seleção natural favoreceu as plantas portadoras desses alelos. Em quatro locos, X61293, GATS91, BM154 e BM156 as frequências alélicas não se alteraram ou houve um leve efeito da seleção natural favorecendo os alelos provenientes do genitor ESAL 686. Apenas no loco X60000, a seleção favoreceu acentuadamente o alelo proveniente do ESAL 686.

Na população F_{24} (Tabela 3), todos os 30 locos foram afetados pela seleção natural. Em 29 locos, o alelo proveniente do genitor Carioca MG foi o favorecido pela seleção e apenas o X60000 manteve as frequências alélicas observadas em F_8 .

Comparando as populações F_8 e F_{24} , elas exibiram frequências alélicas diferentes em 29 locos, indicando que a seleção natural atuou não só até a geração F_8 , mas também de F_8 até a geração F_{24} , favorecendo em diferentes intensidades os alelos do genitor Carioca MG. Apenas a região genômica, amplificada pelo primer X60000 no genitor ESAL 686, foi selecionada e apenas nas primeiras gerações segregantes até F_8 .

TABELA 3 – Estimativas das frequências alélicas observadas em F_8 e F_{24}

Primer	Frequência observada – F_8		Frequência observada – F_{24}	
	Alelo	Alelo	Alelo	Alelo
	Carioca MG	ESAL 686	Carioca MG	ESAL 686
BM139	0,8224	0,1776	0,9766	0,0234
BM141	0,6262	0,3738	0,9065	0,0935
BM143	0,6729	0,3271	0,8037	0,1963
BM149	0,8037	0,1962	0,9953	0,0047
BM152	0,8178	0,1822	0,9766	0,0234
BM154	0,5047	0,4953	0,9813	0,0187
BM156	0,4860	0,5140	0,8832	0,1168
BM157	0,9206	0,0794	0,9206	0,0794
BM160	0,8178	0,1822	1,0000	0,0000
BM164	0,8505	0,1495	1,0000	0,0000
BM165	0,5935	0,4065	0,7944	0,2056
BM172	0,7804	0,2196	0,9252	0,0748
BM175	0,6449	0,3551	1,0000	0,0000
BM201	0,8738	0,1262	0,7290	0,2710
BM205	0,7757	0,2243	0,9159	0,0841
BM210	0,7757	0,2243	0,9299	0,0701
BM211	0,7570	0,2430	0,8972	0,1028
GATS91	0,4439	0,5561	0,7009	0,2991
JO1263	0,8411	0,1589	1,0000	0,0000
JO4555	0,7243	0,2757	0,7664	0,2336
K03289	0,7477	0,2523	0,9486	0,0514
M75856	0,6916	0,3084	0,9813	0,0187
U18349	0,6729	0,3271	1,0000	0,0000
U77935	0,8224	0,1776	0,9159	0,0841
X52626	0,8224	0,1776	1,0000	0,0000
X57022	0,7196	0,2804	0,9673	0,0327
X60000	0,1308	0,8692	0,1402	0,8598
X61293	0,4579	0,5421	0,9439	0,0561
X74919	0,6869	0,3131	0,9252	0,0748
X96999	0,7944	0,2056	0,9720	0,0280

Efeitos variáveis da seleção natural, em diferentes locos gênicos para diferentes caracteres e em diferentes gerações, foram observados por Jain & Allard (1960), Allard & Workman (1963), Allard & Hansche (1964) e Allard et al. (1968). Utilizando marcadores isoenzimáticos, o efeito da seleção natural também foi notado (Allard, 1975; Allard, 1990; Allard et al., 1992; Allard 1999a e Allard 1999b). Segundo os autores, os alelos favorecidos pela seleção natural estão associados à maior adaptação a ambientes particulares.

A predominância da seleção natural, favorecendo alelos do genitor Carioca MG, está de acordo com o fato da maioria da área cultivada com feijão no Brasil ser com as cultivares desse tipo e indica não só a sua maior aceitação, como também a sua maior adaptabilidade (Ramalho & Abreu, 1998). A alta produtividade do Carioca se estende também a vários outros países e, particularmente no caso do Brasil, pela sua maior tolerância aos solos ácidos (Singh, 1992).

3.3 Estimativas dos coeficientes de adaptabilidade relativa

Os coeficientes de adaptabilidade relativa (ω_i) foram estimados para os genótipos homozigóticos relativos à cada par de primer. Por exemplo, considerando “A¹” o alelo proveniente do genitor Carioca MG e “A²” o alelo proveniente do ESAL 686, foram estimados o ω_1 para o A¹A¹ e o ω_3 para A²A². O coeficiente de adaptabilidade relativa do heterozigoto A¹A², ω_2 foi considerado igual a 1,0 (Allard & Workman, 1963; Allard & Hansche, 1964 e Allard et al., 1968). As estimativas de ω_1 e ω_3 iguais a 1,0 indicam que não ocorreu seleção natural desses genótipos, ou seja, eles apresentaram a mesma eficiência reprodutiva do heterozigoto (Allard & Hansche, 1964). As estimativas de ω_1 e ω_3 menores do que 1,0 indicam que a seleção natural atuou, reduzindo a frequência desses genótipos em relação ao heterozigoto, o qual possui a maior

adaptabilidade e, inversamente, estimativas maiores do que 1,0 indicam que a seleção aumentou a frequência dos homozigotos em relação ao heterozigoto, que é nesse caso o de menor adaptabilidade (Hedrick, 1999).

Os valores dos coeficientes de adaptabilidade relativa acumulados (ω_1 e ω_3) de F₇ a F₈ variaram de 0,0202 a 0,7732 para o coeficiente de adaptabilidade relativa ω_1 , e de 0,0042 a 0,7186 para o coeficiente de adaptabilidade relativa ω_3 (Tabela 4).

É importante lembrar que esses coeficientes acumulados referem-se ao efeito da seleção natural sobre os homozigotos da geração F₂ até F₇, durante seis gerações. Embora as amplitudes sejam semelhantes para ambos, indicando intensidade muito variáveis de seleção sobre cada loco de microssatélite, nota-se que o coeficiente acumulado médio ω_1 foi superior a ω_3 (Tabela 4), indicando que a seleção natural foi mais intensa sobre o homozigoto para o alelo proveniente da linhagem ESAL 686 (A²A²). Observando cada loco, nota-se que para apenas cinco (27,8%) a seleção do A²A² foi menos intensa do que do A¹A¹. No entanto, para todos locos, as estimativas de ω_1 e ω_3 foram inferiores a 1,0; denotando a superioridade da combinação heterozigótica. Sobretudo essas estimativas confirmam a maior adaptação da maioria dos homozigotos para alelos provenientes do genitor Carioca MG.

Devido à ausência de indivíduos heterozigóticos, não foi possível estimar ω_1 e ω_3 acumulado para os seguintes primers: JO1263, BM211, U18349, X52626, X57022, X60000, U77935, BM205, M75856, X96999, BM149 e BM154.

TABELA 4 – Estimativas por loco dos coeficientes de adaptabilidade relativa acumulados (ω_1) e médios (ω_i) de F₈ e F₂₄

Primers	Coeficiente acumulado		Coeficiente médio - F ₈			Coeficiente acumulado		Coeficiente médio - F ₂₄		
	ω_1	ω_3	ω_1	ω_3	χ^2 *	ω_1	ω_3	ω_1	ω_3	χ^2 *
BM139	0,1459	0,0216	0,640	0,400	0,0192	0,1216	0,0055	0,560	0,290	0,0336
BM141	0,0216	0,1135	0,680	0,610	0,0259	0,0325	0	0,480	0,010	0,2771
BM143	0,0441	0,0150	0,480	0,350	0,0361	0,0667	0,0287	0,535	0,482	0,0408
BM149	-	-	1,310	1,020	0,8631	0,4129	0	0,500	0,458	1,8440
BM152	0,0925	0,0108	0,580	0,320	0,0167	0,1243	0,0055	0,575	0,316	0,0491
BM154	-	-	1,300	1,290	1,1877	-	-	0,579	0,615	0,1711
BM156	0,0202	0,0221	0,390	0,400	0,0030	0,3176	0,0357	0,600	0,530	0,0455
BM157	0,3422	0,018	0,760	0,390	0,0269	0,0096	0,0012	0,480	0,120	0,0315
BM160	0,1571	0,0252	0,653	0,428	0,0444	-	-	0,768	0,253	0,0261
BM164	0,0830	0,0042	0,560	0,210	0,0482	-	-	0,768	0,253	0,0441
BM165	0,3076	0,2068	0,730	0,675	0,0469	-	-	0,600	0,703	0,6109
BM172	0,0600	0,0078	0,525	0,285	0,0440	0,0287	0,0011	0,513	0,125	0,0330
BM175	0,0840	0,0406	0,572	0,482	0,0442	-	-	0,768	0,253	0,0437
BM201	0,7732	0,1009	0,867	0,576	0,0482	-	-	0,582	0,759	0,4006
BM205	-	-	1,229	0,985	0,9359	-	-	0,503	0,631	0,6169
BM210	0,5106	0,1387	0,810	0,621	0,0486	0,4410	0,1089	0,555	0,543	0,1635
BM211	-	-	1,310	1,066	0,9521	-	-	0,505	0,642	0,6628
GATS91	0,0504	0,0664	0,514	0,543	0,1328	0,0637	0,0192	0,510	0,486	0,0456
JO1263	-	-	1,255	0,925	0,8638	-	-	0,768	0,690	0,0434
JO4555	0,0804	0,2280	0,560	0,400	0,0495	-	-	0,615	0,677	0,9626
K03289	0,0882	0,0214	0,570	0,400	0,0044	0,0993	0,0090	0,556	0,368	0,0465
M75856	-	-	1,305	1,130	1,0148	-	-	0,575	0,637	0,1288
U18349	-	-	1,350	1,189	1,0674	-	-	0,768	0,600	0,0199
U77935	-	-	1,198	0,909	0,9316	0,0846	0,2890	0,416	0,449	0,0474
X52626	-	-	1,198	0,909	0,9316	-	-	0,768	0,600	0,0109
X57022	-	-	1,227	1,036	0,9893	0,5737	0,0433	0,490	0,524	0,0433
X60000	-	-	0,835	1,179	0,9251	-	-	0,710	1,170	0,0305
X61293	0,6051	0,7186	0,809	0,831	0,2537	0,5399	0,0229	0,548	0,507	0,0494
X74919	0,0326	0,0080	0,450	0,280	0,0064	0,1511	0,0207	0,575	0,435	0,0467
X96999	-	-	1,265	0,995	0,8909	-	-	0,625	0,759	0,0415
Médias			0,864	0,694				0,600	0,496	
Sem Het.	-	-	1,232	1,053		-	-	0,660	0,616	
Com Het.	0,1944	0,0982	0,619	0,456		0,2045	0,0394	0,540	0,376	

* significativo a 5% de probabilidade

Para os coeficientes de adaptabilidade relativa acumulados de F_{23} a F_{24} ocorreu uma variação de 0,0096 a 0,5737 para ω_1 e uma variação de 0 a 0,2890 para o coeficiente de adaptabilidade relativa ω_3 (Tabela 4). Nesse caso, as estimativas ω_1 e ω_3 incluem o efeito da seleção natural sobre os homozigotos da geração F_8 até a F_{23} , durante 16 gerações, portanto, 2,67 vezes o número de gerações em comparação com as estimativas de F_8 . Nota-se uma menor amplitude das estimativas de ω_3 (0,2890) em comparação com as de ω_1 (0,5641), o que implica em menor oscilação dos coeficientes de adaptabilidade relativa de A^2A^2 nos diferentes locos. Comparando-se as médias de ω_1 e ω_3 de ambas populações, observa-se o mesmo efeito da seleção natural, embora com menor intensidade, provavelmente em função das frequências genotípicas mais extremas.

Considerando as duas gerações, o efeito da seleção natural foi mais acentuado nas primeiras gerações segregantes, em acordo com as observações de Allard et al. (1968), e também porque as frequências genotípicas eram mais similares, em consequência das maiores frequências dos alelos desfavoráveis.

Também em F_{24} , devido à ausência dos heterozigotos, não foi possível estimar os coeficientes de adaptabilidade relativa, acumulados para os seguintes primers: JO1263, JO4555, BM211, BM160, U18349, X52626, BM164, BM175, X60000, BM165, BM205, M75856, BM201, X96999 e BM154. Apesar de não terem sido detectados heterozigotos em 12 locos em F_8 e em 15 em F_{24} a frequência esperada do heterozigoto na ausência de seleção natural é de 0,0124 em F_8 e de 0,005 em F_{24} , no feijoeiro. Tais frequências devem-se ao sistema de reprodução da espécie, predominantemente por autofecundação, nas condições ambientais onde as populações foram avaliadas. Portanto, as frequências de locos onde foram observados heterozigotos em uma amostra de 107 plantas, ainda foram muito elevadas, especialmente em F_{24} , denotando a superioridade

adaptativa do heterozigoto. Segundo Allard & Workman (1963), o efeito da seleção natural, favorecendo a manutenção de heterozigotos, contribui para reter a variabilidade genética na população. Em acordo com os presentes resultados e com a sugestão de Allard & Workman (1963), a população utilizada no presente trabalho foi avaliada quanto à produtividade de grãos das famílias em diferentes gerações, e constatou-se um ganho com a seleção natural muito superior ao da seleção normalmente praticada pelos melhoristas (Corte, 1999 e Gonçalves, 2000 e Silva, 2003). Portanto, o aumento de produtividade, devido ao efeito da seleção natural, mesmo em gerações muito avançadas de autofecundação, é o resultado do maior valor adaptativo de locos em heterozigose para esse caráter. Conseqüentemente, pode-se inferir que o elevado número de locos heterozigóticos de microssatélites, nas gerações avançadas de autofecundação, também devem-se referir a regiões genômicas que contribuem para maior adaptação e em especial, os alelos do genitor Carioca MG.

Em razão de se dispor apenas das populações F_8 e F_{24} , não foi possível estimar os coeficientes de adaptabilidade relativa ω_1 e ω_3 por geração. Porém, utilizando-se de um procedimento iterativo e utilizando-se o teste de χ^2 para ajustarem as frequências genóticas esperadas com as observadas em F_8 e F_{24} , foram estimados os coeficientes médios de adaptabilidade relativa ($\overline{\omega_1}$ e $\overline{\omega_3}$) para as duas populações (Jain & Allard, 1960). Foram observados grandes flutuações nas estimativas (Tabela 4). Para as famílias $F_{8:11}$, constatou-se uma variação entre 0,390 a 1,350 para o $\overline{\omega_1}$ e de 0,210 a 1,290 para o $\overline{\omega_3}$. Notam-se amplitudes semelhantes das estimativas de ω_1 e ω_3 , que implica intensidades particulares de seleção sobre cada loco e em cada genótipo por loco. Considerando a média das estimativas de $\overline{\omega_1}$ (0,864) e de $\overline{\omega_3}$ (0,694), nota-se que a seleção natural foi mais intensa no homozigoto para o alelo do ESAL 686

(A²A²) do que no A¹A¹. Porém, ambos tiveram suas frequências reduzidas em comparação com o heterozigoto, confirmando a superioridade adaptativa do mesmo em todos os locos onde ele foi detectado. Considerando cada loco, nota-se que o homozigoto A¹A¹ foi mais preservado pela seleção natural em 14 dos 18 locos onde ocorreram também o heterozigoto. Nos quatro restantes o efeito da seleção foi similar nos dois homozigotos.

Nos 12 locos onde não foram detectados heterozigotos em F₈, nota-se que os coeficientes $\overline{\omega}_1$ e $\overline{\omega}_3$ assumiram valores em torno ou ligeiramente maiores do que 1,0; indicando ausência de seleção natural nos homozigotos ou mesmo um favorecimento deles em detrimento dos heterozigotos. As maiores estimativas de $\overline{\omega}_1$ e $\overline{\omega}_3$ ocorreram porque o heterozigoto não exibiu vantagem adaptativa e foram eliminados devido ao sistema predominantemente de autofecundação da espécie, não sendo detectado entre as 107 plantas tomadas nessa geração. Observa-se nas Tabelas 3 e 4 que os alelos provenientes do genitor Carioca MG foram selecionados em 10 locos, do genitor ESAL 686 apenas no loco amplificado pelo primer X60000, enquanto que no loco amplificado pelo primer BM 154, aparentemente não houve efeito da seleção natural até a geração F₈.

Na população F₂₄ as estimativas de $\overline{\omega}_1$ variaram de 0,416 a 0,768 e as de $\overline{\omega}_3$ 0,010 a 1,170. As médias dessas estimativas mostraram no geral um efeito semelhante da seleção natural manifestado até a geração F₈, porém, aparentemente com maior intensidade, especialmente nos locos onde os heterozigotos foram observados. Entretanto, essas estimativas devem conter maiores erros de amostragem, principalmente porque foram obtidas utilizando-se como referência as frequências observadas. Entre elas, os genótipos heterozigóticos e os homozigóticos para o alelo do genitor ESAL 686 ocorreram com frequências muito baixas e certamente não representam a realidade na

população de 107 plantas F_{24} (Tabela 3 e 4). Um indicativo da maior ocorrência de erros nas estimativas dos coeficientes de adaptabilidade relativa em F_{24} é também evidenciado pela menor associação entre ω_1 e $\overline{\omega_1}$ ($r = 0,37^*$) e ω_3 e $\overline{\omega_3}$ ($r = 0,76^{**}$). Já as estimativas de F_8 são muito mais confiáveis pois elas mostraram associações muito mais elevadas, isto é, entre ω_1 e $\overline{\omega_1}$ ($r = 0,86^{**}$) e entre ω_3 e $\overline{\omega_3}$ ($r = 0,91^{**}$).

É importante mencionar que, embora os coeficientes médios da adaptabilidade relativa expliquem as proporções fenotípicas observadas em F_8 e F_{24} , provavelmente os coeficientes que ocorreram em cada geração segregante oscilaram em torno dos valores médios. As razões para essas oscilações foram principalmente as diferentes condições ambientais onde as populações foram utilizadas. Essas condições corresponderam a três locais do Estado de Minas Gerais e três épocas de cultivo: inverno, águas e secas, durante um período de oito anos e que representam as condições de cultivo do feijão. Nessa fase de avanço das gerações, a população foi conduzida em bulk, utilizando-se cerca de 1000 plantas por geração/ambiente, reduzindo assim as oscilações devidas a amostragem. Acentuadas oscilações nos coeficientes de adaptabilidade relativa por ciclo foram observadas por Allard & Workman (1963) em feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), por Jain & Allard (1960) em cevada e por Allard & Hansche (1964) em feijão lima. Todas essas espécies são autógamas e semelhantes ao *P. vulgaris* quanto ao sistema reprodutivo.

Finalmente, é também importante salientar que os fragmentos SSR selecionados pela seleção natural, por constituírem regiões genômicas associadas à maior adaptação, podem ser utilizados como marcadores pelo melhorista, para se fazer seleção assistida, como sugerido por Allard (1999a). Assim, espera-se que a seleção de genótipos em populações segregantes, homocigóticos para os alelos selecionados pela seleção natural, contribua para

aumentar a adaptação das linhagens a serem selecionadas, em face da impossibilidade de avaliação direta da adaptabilidade.

4 CONCLUSÕES

A seleção natural afetou todos os locos segregantes de microssatélites e os alelos do genitor mais adaptado tiveram suas frequências aumentadas em 29 dos 30 locos.

A intensidade da seleção natural e as gerações, em que ela ocorreu, foram particulares em cada loco.

Com a atuação da seleção natural ao longo de todo genoma, infere-se que 30 ou mais locos devem afetar a adaptação.

Os alelos de microssatélites selecionados pela seleção natural devem ser usados na seleção assistida para se aumentar a adaptabilidade.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARD, R. W. Genetic changes associated with the evolution of adaptedness in cultivated plants and their wild progenitors. **Journal of heredity**, Baltimore, v. 79, n. 4, p. 225-238, July/Aug. 1988.

ALLARD, R. W. History of plant population genetics. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 33, p. 1-27, 1999b

ALLARD, R. W. **Principles of plant breeding**. 2. ed. John Wiley & Sons, 1999a. 254 p.

ALLARD, R. W. The Genetics of host-pathogen coevolution: Implications in genetic resource conservation. **Journal of Heredity**, Bethesda, v. 81, n. 1, p. 1-6, Jan./Feb. 1990.

ALLARD, R. W. The mating system and microevolution. **Genetics**, Austin, v. 79, p. 115-126, 1975. Supplement.

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.; QIFA ZHANG; SAGHAI MAROOF, M. A.; MUONA, O. M. Evolution of Multilocus Genetic Structure in an Experimental Barley Population. **Genetics**, Austin, v. 131, n. 4, p. 957-969, Aug. 1992.

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

CHRISTENSEN, A. B.; GREGERSEN, Per L.; SCHRÖDER, J.; COLLINGE, D. B. A chalcone synthase with an unusual substrate preference is expressed in barley leaves in response to UV light and pathogen attack. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 37, n. 5, p. 849-857, 1998.

CORTE, H. R. **Comportamento de populações segregantes de feijão, avançadas pelo método do “bulk”, por dezessete gerações.** 1999. 95 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DÍAZ, P. H.; GONZÁLEZ, O. M.; PABLOS, Y. R. V.; BÁEZ, C. F. A. G. Aplicaciones de las lectinas. **Revista Cubana Hematología Inmunología Hemoterapia**, La Habana, n. 15, v. 2, p. 91-95, 1999.

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

FRITZ, M.; HEINZ, E.; WOLTER, F. P. Cloning and Sequencing of a Full-Length cDNA Coding for *sn*-Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, n. 3, p. 1039-1040, Mar. 1995.

GAITÁN-SOLÍS, E.; DUQUE, M. C.; EDWARDS, K. J.; TOHME, J. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, e cross-species amplification in *Phaseolus* ssp. **Crop Science** Madison, v. 42, n. 6, p. 2128-2136, Nov./Dec. 2002.

GONÇALVES, F. M. A. **Seleção natural em populações segregantes do feijoeiro.** 2000. 98 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GRECO, R.; STAGI, L.; COLOMBO, L.; ANGENENT, G. C.; SARI-GORLA, M.; PE, M. E. MADS Box genes expressed in developing inflorescences of rice and sorghum. **Molecular General Genetics**, New York, v. 253, n. 5, p. 615-623, Feb. 1997.

GUAN, C.; ROSEN, E. S.; BOONSIRICHA, K.; POFF, K. L.; MASSON, P. H. The ARG1-LIKE2 gene of Arabidopsis functions in a gravity signal transduction pathway that is genetically distinct from the PGM pathway. **Plant Physiology**, Rockville, v. 133, n. 1, p. 100-112, 2003.

HALFORD, N. G.; HEY, S.; JHURREEA, D.; LAURIE, S.; MCKIBBIN, R. S.; PAUL, M.; ZHANG, Y. 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.

- HAMBLIN, J. Pant breeding interpretations of the effects of bulk breeding on four populations of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 26, n. 1, p. 157-168, Feb. 1977.
- HEDRICK, P. W. **Genetics of populations**. 2. ed. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 1999. 553 p.
- JAIN, S. K.; ALLARD, R. W. Population studies in predominantly self-pollinated species, I. Evidence for heterozygote advantage in a closed population of barley. **Proceedings of the National Academic of Science**, Washington, v. 46, n. 10, p. 1371-1377, 1960.
- LIU, X. M.; SMITH, C. M.; GILL, B. S.; TOLMAY, V. Microsatellite markers linked to six Russian wheat aphid resistance genes in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 102, n. 4, p. 504-510, Dec. 2001.
- MA, H. The unfolding drama of flower development: recent results from genetic and molecular analices. **Genes Development**, Bungstown, v. 8, n. 7, p. 745-726, Apr. 1994
- 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.
- NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SCKROCH, P.; SANTOS, J. B. dos. Genetic relationships among cultivars and lines of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD marker. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 120, n. 2, p. 300-306, Mar. 1995.
- PEREIRA FILHO, T. A.; CAVARIANI, C. Taxa de hibridação natural do feijoeiro comum em Patos de Minas, Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 9, p. 1181-1183, set. 1994.
- RAMALHO, M. A. P.; ABREU, F. B. Cultivares. In: VIEIRA, C. V.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão: aspectos gerais**. Viçosa: UFV, 1998. p. 435-450.
- SAMBROOK, J.; FRETSCHE, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SILVA, G. F.; SANTOS, J. B.; RAMALHO, M. A. P. Identification of SSR – and RAPD markers linked to a resistance allele for angular leaf spot in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) line ESAL 550. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 3, p. 459-463, Sept. 2003.

SILVA, N. O. **Seleção natural e a decisão do melhorista sobre o melhor momento de abrir o “bulk” na cultura do feijoeiro**. 2003. 56 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SINGH, S. P. Common bean improvement in the traces. **Plant Breeding Reviews**, New York, v. 10, p. 199-269, 1992.

THEISSEN, G.; SAEDLER, H. MADS box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's ‘biogenetic law’ revisited. **Current Opinion in Genetics Development**, Cleveland, v. 5, n. 5, p. 628-639, Oct. 1995.

YU, K.; PARK, S. J.; POYSA, V.; GEPTS, P. Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Heredity**, Oxford, v. 91, n. 6, p. 429-434, Nov./Dec. 2000.

CAPÍTULO III

IDENTIFICAÇÃO DE QTLs EM FEIJOEIRO POR MEIO DE MARCADORES SSR SELECIONADOS PELA SELEÇÃO NATURAL

RESUMO

RODRIGUES, Taislene Butarello. Identificação de QTLs em feijoeiro por meio de marcadores SSR selecionados pela seleção natural. In: _____. **Efeito da seleção natural em alelos de microssatélites(SSR) do feijoeiro e associação com QTLs de caracteres agronômicos**. 2004. Cap. 3, p. 63-85. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Teve-se por objetivo verificar se alguns dos marcadores microssatélites (SSR – Simple Sequence Repeat), afetados pela seleção natural, estavam associados a genótipos de interesse agronômicos em feijão (*Phaseolus vulgaris*), como: produtividade de grãos, reação à mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) e peso de 100 sementes. Foram avaliadas 107 famílias da geração F₈ e 107 famílias F₂₄, provenientes do cruzamento do Carioca MG x ESAL686, conduzidas pelo método da população (bulk). As famílias foram avaliadas para produtividade de grãos em três épocas: inverno de 2001 (F_{8:9} e F_{24:25}), águas de 2001 (F_{8:10} e F_{24:26}), e secas de 2002 (F_{8:11} e F_{24:27}) em Lavras - Minas Gerais. A reação para mancha angular e peso de 100 semente foram avaliadas somente na época da secas de 2002. A extração de DNA foi realizada nas famílias F_{8:11} e F_{24:27}. Utilizaram-se nas reações de SSR, 30 pares de primers que identificaram polimorfismo nos pais e no bulk de DNA das famílias F_{24:27}. Utilizando o procedimento de regressão linear múltipla (stepwise), foram identificados 10 QTLs pelos marcadores SSR para produtividade de grãos que explicaram uma variação fenotípica de 3,14% a 9,24%. Para mancha angular foram identificados 6 QTLs, sendo que um de efeito maior (BM154) conseguiu explicar 17,48% da variação fenotípica. Cinco QTLs também foram identificados para peso de 100 sementes, sendo que o primer X61293 está associado a um de efeito maior (16,78%). A maioria dos QTLs expressou em um só ambiente e uma só população, o que leva a uma alta instabilidade, que pode ser devido as frequências genotípicas dos caracteres estudados e dos marcadores, em consequência da seleção natural.

*Orientador: João Bosco dos Santos – Universidade Federal de Lavras (UFLA).

ABSTRACT

RODRIGUES, Taislene Butarello. QTLs identification in common bean by SSR markers selected by natural selection. In: _____. **Effect of natural selection on common bean SSR alleles and their association with agronomical QTLs.** 2004. Cap. 3, p. 63-85. Dissertation (Master in Genetics and Plant Breeding) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The objective was to identify microsatellite (SSR- Simple Sequence Repeat) markers, selected by natural selection, associated with common bean (*Phaseolus vulgaris*) QTLs for grain yield, angular leaf spot reaction and 100 seed weight. One hundred and seven families from F₈ generation and 107 from F₂₄ were derived from the Carioca MG x ESAL686 cross, that was conducted by bulk method. The families were evaluated for grain yield in the fall/winter season of 2001 (F_{8:9} and F_{24:25}), spring/summer of 2001/2002 (F_{8:10} and F_{24:26}), and summer/fall of 2002 (F_{8:11} and F_{24:27}) in Lavras, MG State. The reaction to angular leaf spot (*Phaeoisariopsis griseola*) and 100 seed weight were evaluated only in the last season. DNA extraction was set up also from F_{8:11} and F_{24:27} families, and used in the SSR reaction with 30 pair of primers that identified polymorphism in the parents and in a DNA bulk of the F_{24:27} families. Using the multiple linear regression through the stepwise procedure, 10 grain yield QTLs were identified by the SSR markers which explained each one between 3.1% to 9.2% of the phenotypic variation. For angular leaf spot 6 QTLs were identified and the one with the largest effect (BM154) explained 17.5% of the phenotypic variation. Five QTLs were also identified for 100 seed weight, and the primer X61293 is associated to the one of largest effect 16.8%. Most QTLs expressed in only one environment and population, showing their high instability, which might be due to the genotypic frequencies, both of the markers and of the agronomical traits.

*Guidance Committee: João Bosco dos Santos – UFLA (Major Professor)

1 INTRODUÇÃO

A grande maioria das características herdáveis de importância econômica resulta da ação conjunta de vários genes, e geralmente é influenciada pelas condições ambientais. Estas características são denominadas poligênicas, quantitativas ou de herança complexa. O fenótipo resultante apresenta variação contínua em vez de classes fenotípicas discretas. Entre os vários caracteres quantitativos de interesse para o melhoramento alguns, como a produtividade de grãos em feijão, expressam nas populações segregantes baixas herdabilidades, porque a maior parte da variação fenotípica não é de natureza genética. Conseqüentemente, os ganhos obtidos com a seleção são proporcionalmente menores.

Com o desenvolvimento das técnicas dos marcadores moleculares, há perspectivas para uma análise mais detalhada dos caracteres quantitativos, permitindo detectar, mapear e estimar os efeitos de regiões genômicas que os controlam e suas interações com ambientes. Tais regiões genômicas são referidas como QTLs (Quantitative trait loci). Cada QTL pode incluir um ou mais poligenes do caráter quantitativo. Assim, dificuldades da análise fenotípica podem ser reduzidas por meio da identificação direta de QTLs. Isso se torna possível quando se utilizam marcadores moleculares que segregam conjuntamente com os mesmos.

Na maioria dos procedimentos que identificam marcadores ligados a QTLs exige-se que os marcadores candidatos tenham herança mendeliana e não sofram efeito de seleção (Lander & Botstein, 1989; Jansen, 1993 e Zeng, 1994; Melo et al., 2002a e 2002b). No entanto, a identificação de marcadores moleculares, selecionados pela seleção natural e sua associação com maior adaptação (Allard, 1999) aliado, simultaneamente, ao efeito pronunciado da

seleção natural para aumentar a produtividade de grãos (Corte, 1999 e Silva, 2003), pode-se inferir na possibilidade de alguns desses marcadores estarem associados a QTLs de interesse.

Procurou-se, então, verificar se alguns marcadores de microssatélites (SSR), afetados pela seleção natural, estão associados a genótipos de interesse agrônômicos, como: produtividade de grãos, reação à mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) e peso de 100 sementes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material genético e características avaliadas

Foram utilizados 107 famílias F_8 e 107 famílias F_{24} provenientes do cruzamento entre os genitores Carioca MG e ESAL 686.

As famílias foram avaliadas para a produção de grãos, a reação ao agente causal da mancha angular e peso de 100 sementes. A produtividade de grãos foi avaliada por Silva (2003) em três épocas: inverno de 2001 ($F_{8:9}$ e $F_{24:25}$), águas de 2001 ($F_{8:10}$ e $F_{24:26}$) e secas de 2002 ($F_{8:11}$ e $F_{24:27}$). A mancha angular foi avaliada pela mesma autora, apenas na secas de 2002. O peso de 100 sementes foi avaliado nas mesmas famílias $F_{8:11}$ e $F_{24:27}$, utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado com duas repetições.

A reação ao patógeno foi avaliada por meio da nota média atribuída por dois avaliadores, na época de severidade máxima da doença (secas de 2002). As notas variaram de 1 (suscetibilidade máxima) a 9 (resistência completa), segundo Rezende et al. (1999).

2.2 Identificação de QTLs por meio da regressão linear múltipla

A análise de regressão linear múltipla, envolvendo os marcadores e os caracteres avaliados, foi realizada conforme procedimento descrito por Edwards et al. (1987), que consideraram os marcadores moleculares como variáveis independentes e as características fenotípicas como variáveis dependentes. Nas análises, foi utilizada a produção de grãos média de cada família, avaliada por ambientes, de $F_{8:9}$ a $F_{8:11}$ e de $F_{24:25}$ a $F_{24:27}$. Além dessas, foi utilizada também a produtividade média dos três ambientes de cada família F_8 e de cada F_{24} . Além da produção de grãos foram utilizadas também as avaliações de reação à mancha angular e peso de 100 sementes das 107 famílias F_8 e 107 famílias F_{24} . Em

relação aos marcadores foram utilizados 30 locos polimórficos nos genitores e um dos alelos de cada loco teve sua frequência aumentada pela seleção natural e o outro teve a sua frequência reduzida, como se nota na Tabela 3 (capítulo anterior) estimadas a partir das proporções fenotípicas (genotípicas) observadas. Considerando como “A¹” o alelo proveniente do genitor Carioca MG e “A²” o proveniente do ESAL 686, o genótipo A¹A¹ foi representado por 0, o A²A² por 1 e A¹A² por 2, para se realizar a análise de regressão linear múltipla.

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

No processo de Stepwise, inicialmente, coloca-se no modelo de regressão, somente o marcador com maior valor de F parcial que tenha sido significativo. Em seguida, testa-se o marcador, dentre os candidatos a entrar no modelo, que tem o valor mais alto de F parcial, na presença do primeiro marcador. Dentre os marcadores do modelo recém formado, aqueles que apresentarem teste F não significativo são retirados do modelo e os que apresentarem teste F significativo são mantidos. Esses testes são efetuados um por um, a cada passo. O processo continuará até que todos os marcadores candidatos a entrar no modelo sejam testados e até que todos os marcadores do modelo tenham F parcial significativo (Ferreira, 1995 e Melo, 2000).

Para identificar qual dos alelos de microssatélite é marcador do QTL de interesse, foi realizada a análise por ponto, semelhante ao procedimento usado por Ferreira (1995).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em um programa de melhoramento do feijoeiro, a produtividade de grãos é uma das características mais importantes, embora seja a mais complexa, pois é dependente de vários outros caracteres e de inúmeros fatores ambientais.

Os resultados de produtividade de grãos, analisados por Silva (2003), exibiram diferenças altamente significativas entre as famílias, em cada uma das gerações, de $F_{8:9}$ a $F_{8:11}$ e de $F_{24:25}$ a $F_{24:27}$. Na análise conjunta, a autora detectou a mesma diversidade genética das famílias, bem como a interação significativa famílias por ambientes.

A análise de regressão linear múltipla, considerando produtividade de grãos (Tabela 1) para a família F_8 na safra de inverno, identificou um marcador (BM157) ligado a um QTL, no sentido de reduzir a expressão fenotípica. Esse marcador explicou 5,21% da variação fenotípica para esse caráter. Para a produtividade no período das águas foram identificados dois marcadores ligados a QTLs, sendo que ambos contribuíram também para reduzir a produtividade de grãos. O marcador BM143 foi o que explicou a maior parte da variação fenotípica (8,69%) desse caráter, sendo que os dois marcadores em conjunto foram capazes de explicar 12,46% dessa variação. Para o experimento realizado na safra das secas, foi identificado um marcador (JO1263) ligado a um QTL, sendo que ele explicou 6,90% da variação fenotípica referente a essa época e, nesse caso o QTL expressou um efeito para aumentar a produtividade.

A análise de regressão linear múltipla conjunta, considerando as médias das três épocas de semeadura, identificou quatro marcadores ligados a QTLs que controlam a produtividade de grãos, sendo que três deles no sentido de reduzir a expressão do caráter e um de aumentar.

TABELA 1 – Resumo das análises de regressão linear múltipla para produtividade de grãos utilizando o processo de Stepwise para a seleção dos marcadores em F₈ e F₂₄.

Marcadores	Estimativas dos Parâmetros	R ² parcial	Erro padrão	Teste de F*
Família F ₈ – Inverno de 2001				
Intercepto	4.754,25		94,64	2.523,40
BM157	-409,29	0,0521	170,42	5,77
Família F ₈ – Águas de 2001				
Intercepto	1.477,09		61,72	572,82
BM143	-122,68	0,0869	55,22	10,00
BM152	-128,20	0,0377	60,56	4,48
Família F ₈ – Secas de 2002				
Intercepto	2.269,98		55,15	1694,15
JO1263	385,99	0,0690	138,36	7,78
Família F ₈ – Conjunta				
Intercepto	3.028,38		65,47	2.139,60
BM154	-232,99	0,0577	80,41	8,40
BM157	-175,53	0,0581	74,84	5,50
BM210	196,73	0,0423	75,43	6,80
BM152	-99,58	0,0314	50,12	3,95
Família F ₂₄ – Inverno de 2001				
Intercepto	4.846,84		85,29	3.229,44
BM143	370,98	0,0762	126,03	8,66
Família F ₂₄ – Águas de 2001				
Intercepto	1.860,77		170,16	119,58
BM165	801,98	0,0417	375,27	4,57
Família F ₂₄ – Secas de 2002				
Intercepto	2.636,47		36,04	5351,94
BM210	272,37	0,0530	112,40	5,87
Família F ₂₄ – Conjunta				
Intercepto	3.209,53		39,72	6.527,35
BM156	226,28	0,0924	70,34	10,35
U77935	-232,31	0,0638	70,50	10,86
BM201	-175,75	0,0490	69,78	6,34

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste de F.

O marcador BM157 foi o que explicou maior parte da variação fenotípica (5,81%). Esse marcador já tinha sido identificado no experimento conduzido na safra de inverno. Portanto, entre os marcadores, esse pode ser o mais útil para auxiliar nos processos seletivos, devido a sua maior estabilidade. Entretanto, deve ser selecionado para a sua ausência, visto que sua presença está ligada à redução da produtividade de grãos.

O BM152 também identificou QTL nas águas de 2001 e na análise conjunta, embora seja de menor efeito. Entre os marcadores de QTLs, que aumentam a produtividade de grãos, o BM210 é o mais favorável, embora ele tenha detectado QTL apenas na análise conjunta. Considerando os quatro marcadores em conjunto, pode-se verificar que eles conseguiram explicar 18,95% da variação fenotípica para esse caráter. Isso porque na cultura do feijão não é viável a obtenção de uma cultivar destinada a apenas uma época. Na verdade, apenas cerca de 10% dos agricultores adquirem sementes (Ramalho & Abreu, 1998) e as utilizam em todas as épocas. No entanto, os QTLs, que se expressaram em apenas uma época também devem ser considerados na seleção, pois devem contribuir para aumentar o ganho em épocas específicas.

Na população F₂₄ foi identificado, um QTL diferente por época de avaliação e todos com efeito positivo para aumento da produtividade (Tabela 1). Entre eles, o QTL identificado pelo primer BM210, também mostrou-se importante em F₈ e com o mesmo efeito positivo, confirmando o seu valor. Infelizmente, no entanto, ele não foi identificado na média dos três ambientes e inclusive, os QTLs que se expressaram nessa condição o fizeram pela primeira vez, salientando no geral, a instabilidade de expressão dos QTLs. Vale salientar que os três marcadores identificados na média das três épocas de semeadura, conseguiram explicar 20,52% da variação fenotípica para esse caráter, e sugerir que eles devem ser utilizados no início do programa de melhoramento, assim como os demais marcadores identificados nas diferentes épocas.

As mudanças nas proporções genóticas com as gerações, tanto as relacionadas à produtividade de grãos, quanto dos marcadores, devido ao efeito da seleção natural, podem também explicar, pelo menos em parte, a aparente instabilidade dos QTLs em F_8 e F_{24} .

As magnitudes e instabilidades dos QTLs detectados estão de acordo com os observados por Melo (2000), mostrando que é realmente muito difícil conseguir identificar um marcador estável para a produtividade de grãos, visto que é uma característica complexa e que sofre grandes influências ambientais.

Uma das características que influenciam na produtividade de grãos é a ocorrência de doenças. No caso do feijoeiro, a mancha angular vem sendo considerada uma doença de grande importância econômica, visto que, nos últimos anos, as perdas atribuídas a ela chegaram a mais de 70%, dependendo da suscetibilidade das cultivares, da patogenicidade das raças prevalentes e das condições ambientais como temperatura em torno de 24°C, associada a alta umidade alterada de baixa umidade (Sartorato & Rava, 1994). Dessa forma, o cultivo, na época das secas com irrigação, faz com que essa doença tenha maior importância econômica, e por isso a reação das famílias à mancha angular foi avaliada somente nessa época de cultivo.

Embora não se dispusesse de dados com repetições para se realizar a análise de variância para mancha angular, as notas médias por família variaram de 2,23 a 7,69, sugerindo também ampla variação fenotípica.

A análise de regressão para mancha angular (Tabela 2) para a população F_8 , identificou dois marcadores ligados a QTLs que participaram do controle genético do caráter, sendo ambos no sentido de reduzir a ocorrência da doença. O marcador BM154 foi o que explicou a maior parte da variação fenotípica (17,46%), e os dois marcadores em conjunto conseguiram explicar 22,42% dessa variação.

Para a população F_{24} foram identificados quatro marcadores ligados a QTLs para a mancha angular, sendo dois no sentido de reduzir e dois no sentido de aumentar a ocorrência da doença. O marcador JO4555 foi o que explicou a maior parte da variação fenotípica (9,65%), sendo que os marcadores em conjunto explicaram 23,94% dessa variação.

Segundo Yu et al. (2000), o marcador SSR JO4555 está relacionado com o gene que codifica a proteína kinase-1, e essa proteína está relacionada com processos metabólicos de transdução de sinais que levam à reação de defesa da planta (Halford et al., 2003). Um outro marcador (K03289), identificado para mancha angular, porém em F_8 , foi também citado por Yu et al. (2000), o qual faz parte de uma família de genes que codificam para a lectina ou phytohemaglutinina (PHA), essas são glicoproteínas que estão presentes nos cotilédones (Díaz et al., 1999).

Novamente observou-se a instabilidade dos QTLs nas duas populações e que pode ser consequência das alterações nas proporções genotípicas da reação e dos marcadores, em consequência da seleção natural, como se verificou com a produtividade de grãos.

Porém, deve-se salientar que, em um programa de melhoramento visando plantas resistentes à mancha angular, os marcadores identificados, tanto em F_8 quanto em F_{24} , podem ser de utilidade para auxiliar o melhorista no início do processo de seleção.

TABELA 2 – Resumo das análises de regressão múltipla para mancha angular, utilizando o processo de Stepwise, para seleção dos marcadores em F₈ e F₂₄.

Marcadores	Estimativas dos Parâmetros	R ² parcial	Erro padrão	Teste de F*
Família F ₈				
Intercepto	4,77		0,11	1.749,58
K03289	-0,26	0,0496	0,10	6,25
BM154	-0,65	0,1746	0,16	16,89
Família F ₂₄				
Intercepto	5,31		0,11	2.219,46
JO4555	0,64	0,0965	0,21	9,18
BM156	-0,49	0,0431	0,20	5,78
U77935	-0,53	0,0439	0,20	7,22
M75856	1,64	0,0559	0,65	6,33

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste de F.

Uma outra característica de grande importância no melhoramento é o tamanho da semente, por estar relacionada à aceitação comercial da cultivar. Geralmente, utiliza-se o peso de 100 sementes como indicador do tamanho. Ramalho et al. (1993), comentam que essa característica é controlada por poucos genes e é pouco influenciada pelo ambiente, conseqüentemente, a herdabilidade é geralmente alta e facilita a seleção. No entanto, a disponibilidade de marcadores pode também auxiliar na seleção, principalmente na condução das populações segregantes pelo método da população, em que a seleção natural exerce grande efeito para reduzir o tamanho da semente.

Para essa característica, os genitores que participaram dos cruzamentos são bem divergentes. O genitor Carioca MG possui sementes de tamanho pequeno, cerca de 18 a 20g por 100 sementes, enquanto que o genitor ESAL 686 apresenta sementes grandes, acima de 35g por 100 sementes.

Na Tabela 3 encontra-se o resumo da análise de variância para peso de 100 sementes, com a decomposição do efeito de tratamentos para se avaliar a

TABELA 3 – Resumo da análise de variância para o peso de 100 sementes de famílias provenientes de plantas F_{8:11} e F_{24:27}.

Fontes de variação	GL	QM
Tratamentos	213	27,887**
Entre Famílias F _{8:11}	106	35,876**
Entre Famílias F _{24:27}	106	8,386**
F _{8:11} vs F _{24:27}	1	1.248,20**
Erro efetivo	212	0,132
Média em F _{8:11}		26,145
Média em F _{24:27}		22,729
Média geral		24,437
CV		1,49

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

variação entre famílias em F_{8:11} e F_{24:27}. O coeficiente de variação salienta a alta precisão experimental de avaliação do caráter (Melo et al., 2002b).

Constatou-se ampla variação fenotípica ($P \leq 0,01$), entre as famílias de ambas as gerações e também a maior média da geração F₈ em comparação com a F₂₄, confirmando o efeito da seleção natural no sentido de reduzir o peso da semente. Na verdade, o efeito da seleção natural é principalmente para aumentar o número de sementes por planta e há uma compensação, reduzindo o seu tamanho.

A análise de regressão linear múltipla para o peso de 100 sementes (Tabela 4) na família F₈, identificou quatro marcadores ligados a QTLs, que participaram do controle genético desse caráter, sendo que todos eles contribuem para aumentar sua expressão. O marcador X61293 foi o que explicou a maior parte da variação fenotípica (16,78%) e todos os marcadores em conjunto conseguiram explicar 31,78%. Portanto, os marcadores SSR conseguiram explicar praticamente um terço de toda a variação fenotípica, mostrando que podem ser ferramentas importantes no processo de seleção.

TABELA 4 – Resumos das análises de regressão múltiplas para peso de 100 sementes, utilizando o processo de Stepwise, para seleção dos marcadores em $F_{8:11}$ e $F_{24:27}$.

Marcadores	Estimativas dos Parâmetros	R^2 parcial	Erro padrão	Teste de F*
Família $F_{8:11}$				
Intercepto	23,17		0,56	1709,66
X61293	2,98	0,1678	0,65	20,80
X52626	2,64	0,0689	0,92	8,31
U77935	2,22	0,0444	0,92	5,78
X96999	2,01	0,0367	0,86	5,49
Família $F_{24:27}$				
Intercepto	22,57		0,20	12.234,80
BM211	1,59	0,0561	0,64	6,24

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste de F.

Esse resultado está de acordo com os observados por Melo et al. (2002b), para peso de 100 sementes.

Já para a família F_{24} , foi encontrado apenas um marcador (BM211), ligado a QTL para peso de 100 sementes, contribuindo também para aumentar a expressão do caráter, explicando 5,61% da variação fenotípica.

Considerando que o tamanho pequeno da semente é indesejável, os QTLs identificados pelos marcadores foram favoráveis ao melhoramento, para se obter sementes de maior tamanho, especialmente para serem usados quando se utiliza o método da população, em que a seleção natural atua no sentido de reduzir o peso da semente.

Novamente notam-se QTLs diferentes, expressando-se nas gerações F_8 e F_{24} . Certamente para esse caráter, que é muito afetado pela seleção natural, a aparente e inesperada instabilidade de expressão dos QTLs deveram-se às mudanças nas proporções genotípicas para o peso de 100 sementes e também

para alguns marcadores, em consequência da seleção, que atuou para originar as duas gerações avaliadas.

Considerando todos os caracteres avaliados, três marcadores identificaram QTLs em dois ou mais caracteres. Nesse caso, é necessário avaliar se a seleção de um QTL para um caráter é favorável ou desfavorável a outro. Por exemplo, o marcador BM156 identifica um QTL que é favorável para aumentar a produção de grãos e também para identificar plantas mais resistentes à mancha angular. No entanto, na maioria dos casos isso não acontece, como o BM154 que identifica um QTL favorável e de efeito relativamente pronunciado (17,46%) para aumentar a resistência à mancha angular, porém, contribui para reduzir a produtividade de grãos (5,77%). Nesse caso, considerando o efeito mais pronunciado do QTL para resistência, é compensador o seu uso. No caso do marcador amplificado pelo primer U77935, nota-se que ele identificou QTLs que afetam os três caracteres, favoravelmente ao peso de 100 sementes e para resistência à mancha angular, porém contribui para reduzir a produtividade de grãos. Segundo Yu et al. (2000), este marcador (U77935) codifica para *sn-glicerol-3-fosfato-aciltransferase*, e essa proteína é responsável pela tolerância ao frio (Fritz et al., 1995).

As médias de cada classe genotípica por marcador relativas à produtividade de grãos, mancha angular e peso de 100 sementes, de F_8 e F_{24} , estão representados na Tabela 5. No geral, observa-se que os alelos do genitor carioca MG contribuíram para aumentar a produtividade de grãos em F_8 com exceção do JO1263. Porém, esse marcador foi identificado na época das secas, período em que a incidência da mancha angular é maior, portanto uma possível explicação para maior produtividade está no alelo proveniente do genitor ESAL 686, que apresenta resistência a essa doença. Surpreendentemente, em F_{24} observou-se o oposto. Entretanto, os resultados dessa geração devem ser considerados com cautela, isto é, em razão das frequências de todos os alelos do

ESAL 686 serem muito baixas, implica que um pequeno número de famílias contribuíram para a média. Já a alta frequência dos alelos do Carioca MG implica que um grande número de famílias contribuíram para a média e, entre elas, as de baixa produtividade devido a outros locos, resultando na redução das médias. Conseqüentemente, devem ser considerados principalmente os QTLs identificados em F₈.

No caso da resistência à mancha angular e do maior peso de sementes a maioria dos QTLs de interesse foram identificados no ESAL 686, como esperado, tanto em F₈ quanto em F₂₄. Portanto, o efeito das menores frequências alélicas em F₂₄ não interferiram na identificação dos QTLs, como na produtividade de grãos, provavelmente porque aqueles dois caracteres são de controle genético mais simples (Mendonça et al., 2003).

TABELA 5 – Médias de cada classe genotípica por marcador das famílias F₈ e F₂₄.

Família F ₈				
Primers	Época / Caráter	Média A ¹ A ¹	Média A ² A ²	Média A ¹ A ²
BM157	Inverno (i) / produção	4.770,06	3.744,09	4.150,25
BM143	Águas (a) / produção	1.447,38	1.293,40	1.115,63
BM152	Águas (a) / produção	1.405,76	1.219,96	1.052,62
JO1263	Secas (s) / produção	2.269,98	2.655,97	-
BM152	(i)+(a)+(s) / produção	2.831,62	2.724,63	2.610,27
BM154	(i)+(a)+(s) / produção	2.882,30	2.674,11	-
BM157	(i)+(a)+(s) / produção	2.806,75	2.709,67	2.454,57
BM210	(i)+(a)+(s) / produção	2.821,97	2.671,58	2.504,51
BM154	Secas / mancha angular	4,68	3,94	-
K03289	Secas / mancha angular	4,58	3,49	4,07
U77935	Secas / 100 sem.	25,57	28,79	-
X61293	Secas / 100 sem.	24,13	27,82	26,83
X52626	Secas / 100 sem.	25,62	28,56	-
X96999	Secas / 100 sem.	25,68	27,94	-
Família F ₂₄				
BM143	Inverno (i) / produção	4.853,44	5.154,19	5.656,41
BM165	Águas (a) / produção	1.860,77	2.662,75	-
BM210	Secas (s) / produção	2.630,42	3.079,92	2.582,42
BM156	(i)+(a)+(s) / produção	3.120,35	3.479,46	3.406,34
BM201	(i)+(a)+(s) / produção	3.196,77	3.080,60	-
U77935	(i)+(a)+(s) / produção	3.201,00	2.854,14	2.852,59
BM156	Secas / mancha angular	5,41	4,65	4,75
JO4555	Secas / mancha angular	5,16	5,91	-
M75856	Secas / mancha angular	5,30	7,27	-
U77935	Secas / mancha angular	5,41	4,95	4,40
BM211	Secas / 100 sem.	22,57	24,16	-

É importante considerar que existe a possibilidade dos marcadores, que identificam QTLs, serem independentes das regiões genômicas identificadas. Nesse caso, eles podem ter detectado os QTLs simplesmente pelo efeito da seleção natural, simultaneamente, sobre o QTL e o marcador. Há assim, a necessidade de confirmação da validade dos marcadores identificados.

4 CONCLUSÕES

Utilizando o processo de regressão linear múltipla (Stepwise), foi possível identificar 10 marcadores para produtividade de grãos, sendo 6 identificados na família F₈ e 4 na família F₂₄, 6 marcadores para mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*), sendo 2 identificados na família F₈ e 4 na família F₂₄ e 5 marcadores para peso de 100 sementes, sendo 4 identificados na família F₈ e 1 na família F₂₄.

Observou-se a instabilidade dos QTLs nas duas populações que pode ser consequência das alterações nas proporções genótípicas dos caracteres estudados e dos marcadores, em consequência da seleção natural.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARD, R. W. **Principles of plant breeding**. 2. ed. John Wiley & Sons, 1999. 254 p.

CORTE, H. R. **Comportamento de populações segregantes de feijão, avançadas pelo método do “bulk”, por dezessete gerações**. 1999. 95 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DÍAZ, P. H.; GONZÁLEZ, O. M.; PABLOS, Y. R. V.; BÁEZ, C. F. A. G. Aplicaciones de las lectinas. **Revista Cubana de Hematología Inmunología y Hemoterapia**, La Habana, n. 15, v. 2, p. 91-95, 1999.

DRAPER, N. R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. 2. Ed. New York: John Wiley, 1981. 709 p.

EDWARDS, M. D.; STUBER, C. W.; WENDEL, J. F. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. Numbers, genomic distribution and types of gene action. **Genetics**, Bethesda, v. 116, n. 1, p. 113-125, May 1987.

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

HALFORD, N. G.; HEY, S.; JHURREEA, D.; LAURIE, S.; MCKIBBIN, R. S.; PAUL, M.; ZHANG, Y. 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.

JANSEN, R. C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. **Genetics**, Bethesda, v. 135, n. 1, p. 205-211, Sept. 1993.

LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative trait using RFLP linkage maps. **Genetics**, Bethesda, v. 121, n. 1, p. 185-199, Jan. 1989.

MELO, L. C. **Mapeamento de QTLs em feijoeiro, por meio de marcadores RAPD, em diferentes ambientes.** 2000. 148 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MELO, L. C.; SANTOS, J. B.; FERREIRA, D. F. Mapeamento de QTLs para reação ao oídio e mancha angular do feijoeiro comum em diferentes locais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 8, p. 115-126, Ago. 2002a.

MELO, L. C.; SANTOS, J. B.; FERREIRA, D. F. Mapping and stability of QTLs for seed weight in common beans under different environments. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 2, n. 2, p. 227-236, 2002b.

MENDONÇA, H. A.; SANTOS, J. B.; RAMALHO, M. A. P. Genetic control of common bean reaction to angular leaf spot. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 3, n. 3, p. 209-216, 2003.

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, F. B. Cultivares. In: VIEIRA, C. V.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão: aspectos gerais.** Viçosa: UFV, 1998. p. 435-450.

RAMOLHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; ZIMMERMANN, M. J. de O. **Genética quantitativa em plantas autógamas: aplicações ao melhoramento do feijoeiro.** Goiânia: UFG, 1993. 271 p.

REZENDE, V. F.; RAMALHO, M. A. P.; CORTE, H. R. Genetic control of common bean (*Phaseolus vulgaris*) resistance to powdery mildew (*Erysiphe polygoni*). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 2, p. 233-236, June 1999.

SARBORATO, A.; RAVA, C. A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle.** Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 300 p. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 50).

SILVA, N. O. **Seleção natural e a decisão do melhorista sobre o melhor momento de abrir o “bulk” na cultura do feijoeiro.** 2003. 56 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

YU, K.; PARK, S. J.; POYSA, V.; GEPTS, P. Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Heredity**, Oxford, v. 91, n. 6, p. 429-434, Nov./Dec. 2000.

ZENG, Z. B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, Bethesda, v. 136, n. 4, p. 1457-1468, Apr. 1994.

ANEXOS

ANEXO A		Página
TABELA 1A	Pares de primers microssatélites que identificaram polimorfismo nos genitores.....	87
TABELA 2A	Temperatura de anelamento, concentração de agarose e tempos utilizados na eletroforese para a separação dos fragmentos de DNA amplificados por cada par de primers.	89
TABELA 3A	Tamanho das bandas (pb) relativas ao Carioca MG, ESAL 686 e o “Bulk”	90

TABELA 1A - Pares de primers microssatélites que identificaram polimorfismo nos genitores.

Primers	Seqüência SSR	5' a 3'	Seqüência do Primer	Referência
BM139 AF483857	(CT) ₂₅	Left Right	TTAGCAATACCGCCATGAGAG ACTGTAGCTCAAACAGGGCAC	Gaitán-Solís et al.,2002
BM141 AF483859	(GA) ₂₉	Left Right	TGAGGAGGAACAATGGTGGC CTCAXAAACCACAACGCACC	Gaitán-Solís et al.,2002
BM143 AF483861	(GA) ₃₅	Left Right	GGGAAATGAACAGAGGAAA ATGTTGGGAACTTTTAGTGTG	Gaitán-Solís et al.,2002
BM149 AF483865	(TGC) ₆ (TAG) ₃	Left Right	CGATGGATGGATGGTTGCAG GGCCGACAAGTTACATCAAATTC	Gaitán-Solís et al.,2002
BM152 AF483868	(GA) ₃₄	Left Right	AAGAGGAGGTCGAAACCTTAAATCG CCGGGACTTGCCAGAAGAAC	Gaitán-Solís et al.,2002
BM154 AF483870	(CT) ₁₇	Left Right	TCTTGCACCGAGCTTCTCC CTGAATCTGAGGAACGATGACCAG	Gaitán-Solís et al.,2002
BM156 AF483872	(CT) ₃₂	Left Right	CTTGTTCCACCTCCCATCATAGC TGCTTGCATCTCAGCCAGAATC	Gaitán-Solís et al.,2002
BM157 AF483873	(GA) ₁₆	Left Right	ACTTAACAAGGAATAGCCACACA GTTAATTGTTTCCAATATCAACCTG	Gaitán-Solís et al.,2002
BM160 AF483876	(GA) ₁₅ (GAA) ₅	Left Right	CGTGCCTGGCGAATAGCTTTG CGCGGTTCTGATCGTGACTTC	Gaitán-Solís et al.,2002
BM164 AF483878	(GT) ₉ (GA) ₂₂	Left Right	CCACCACAAGGAGAAGCAAC ACCATTCAAGGCCGATACTCC	Gaitán-Solís et al.,2002
BM165 AF483879	(TA) ₃ (CA) ₉	Left Right	TCAAATCCCACACATGATCG TTCTTTCATTTCATATTATCCGTTCA	Gaitán-Solís et al.,2002
BM172 AF483884	(GA) ₂₃	Left Right	CTGTAGCTCAAACAGGGCACT GCAATACCGCCATGAGAGAT	Gaitán-Solís et al.,2002
BM175 AF483886	(AT) ₅ (GA) ₁₉	Left Right	CAACAGTTAAAGGTCGTCAAATT CCACTCTTAGCATCAACTGGA	Gaitán-Solís et al.,2002
BM201 AF483898	(GA) ₁₅	Left Right	TGGTGCTACAGACTTGATGG TGTCACCTCTCTCCTCCAAT	Gaitán-Solís et al.,2002
BM205 AF483901	(GT) ₁₁	Left Right	CTAGACCAGGCAAAGCAAGC TGAGCTGGGATTTCATTTCTG	Gaitán-Solís et al.,2002

...continua...

“TABELA 1A, cont.”

Primers	Seqüência SSR	5' a 3'	Seqüência do Primer	Referência
BM210	(CT) ₁₅	Left	ACCACTGCAATCCTAATCTTTG	Gaitán-Solís et al.,2002
AF483902		Right	CCCTCATCCTCCATTCTTATCG	
BM211	(CT) ₁₆	Left	ATACCCACATGCACAAGTTTGG	Gaitán-Solís et al.,2002
AF483903		Right	CCACCATGTGCTCATGAAGAT	
GATS91	(GA) ₁₇	Left	GAGTGCGAAGCGCGTAGAG	Gaitán-Solís et al.,2002
AF483842		Right	TCCGTGTTCTCTGTCTGTG	
JO1263	(ATCC) ₃ (AG) ₂	Left	ATGCATGTTCCAACCACCTTCTC	Yu et al.,2000
PV-ATCC001		Right	GGAGTGGAACCCTTGCTCTCATC	
JO4555	(CTT) ₃ (T) ₃	Left	GAGGGTGTTCACATTTGTCACTGC	Yu et al.,2000
PV-CTT001		Right	TTCATGGATGGTGGAGGAACAG	
K03289	(ATGC) ₄	Left	AGCTTTCACACTATGACACCACTGG	Yu et al.,2000
PV-ATGC002		Right	TGCGACATGAGAGAAAGACACGG	
M75856		Left	CAATCCTCTCTCTCATTTCCAATC	Yu et al.,2000
PV-AG001		Right	GACCTTGAAGTCGGTGTCTGTTT	
U18349	(GGC) ₅	Left	CTGAAGCCCCGAATCTTGCGA	Yu et al.,2000
PV-GGC001		Right	CGCGAGAGGTGAACGAAAGC	
U77935	(GCCACC) ₅	Left	CGTTAGATCCCGCCCAATAGT	Yu et al.,2000
PV-GCCACC001		Right	CCGTCCAGGAAGAGCGAGC	
X52626	(ATCC) ₃	Left	TCTCCATGCATGTTCCAACCAC	Yu et al.,2000
PV-ATCC003		Right	GGAGTGGAACCCTTGCTCTCATC	
X57022	(GAAT) ₅	Left	AAGGATGGGTTCCGTGCTTG	Yu et al.,2000
PV-GAAT001		Right	CACGGTACACGAAACCATGCTATC	
X60000	(AT) ₄ (T) ₂	Left	ACCTAGAGCCTAATCCTTCTGCGT	Yu et al.,2000
PV-AT003		Right	GAATGTGAATATCAGAAAGCAAATGG	
X61293	(AT) ₁₈	Left	AATCTGCCGAGAGTGGTCCTGCC	Yu et al.,2000
PV-AT004		Right	GATTGAAATATCAAAGAGAATTGTTAC	
X74919	(AT) ₅	Left	CCGTTGCCCTGTATTTCCCCAT	Yu et al.,2000
PV-AT006		Right	CGTGTGAAGTCATCTGGAGTGGTC	
X96999	(AT) ₉	Left	AGTCGCCATAGTTGAAATTTAGGTG	Yu et al.,2000
PV-AT008		Right	CTTATTAACCGTGAGCATATGTATCATTC	

TABELA 2A - Temperatura de anelamento, concentração de agarose e tempos utilizados na eletroforese para a separação dos fragmentos de DNA amplificados por cada par de primers

Primers	Temp. de anelamento (°C)	Agarose (%)	Eletroforese (h)
BM139	55-55	2,5	3:15
BM141	55-55	2,5	3:00
BM143	55-55	2,5	3:15
BM149	55-55	2,5	3:00
BM152	58-60	2,5	2:30
BM154	55-55	2,5	3:00
BM156	58-60	2,0	2:45
BM157	58-60	2,0	2:45
BM160	58-60	2,0	2:45
BM164	58-60	2,5	3:00
BM165	58-60	2,5	3:00
BM172	58-60	2,0	2:30
BM175	58-60	2,5	3:00
BM201	58-60	2,5	3:00
BM205	58-60	2,5	3:00
BM210	68-60	2,5	3:15
BM211	58-60	2,0	3:00
GATS91	58-60	2,5	3:10
JO1263	58-60	2,5	3:00
JO4555	58-60	2,0	3:00
K03289	58-60	2,0	2:30
M75856	58-60	2,5	3:00
U18349	55-55	2,5	3:00
U77935	58-60	2,5	3:00
X52626	55-55	2,5	3:00
X57022	58-60	2,5	2:45
X60000	58-60	2,5	2:45
X61293	55-55	2,5	3:30
X74919	58-60	2,0	3:00
X96999	46-46	2,5	3:00

TABELA 3A - Tamanho das bandas (pb) relativas ao Carioca MG, ESAL 686 e o “Bulk” em F₂₄.

Primers	Carioca MG (pb)	ESAL 686 (pb)	“Bulk”(pb)
BM139	100	129	100
BM141	209	170	209
BM143	155	178	155
BM149	295	300	295
BM152	129	141	129
BM154	-	275	-
BM156	209	219	209
BM157	110	126	110
BM160	182	209	182
BM164	162	200	162
BM165	229	245	229
BM172	79	100	79
BM175	178	200	178
BM201	178	145	178
BM205	200	204	200
BM210	229	224	229
BM211	174	200	174
GATS91	224	200	224
JO1263	200	158	200
JO4555	158	182	158
K03289	158	145	158
M75856	224	214	224
U18349	209	224	209
U77935	89	100	89
X52626	200	178	200
X57022	200	204	200
X60000	158	178	178
X61293	170	186	170
X74919	174	138	174
X96999	229	245	229