

**EMPREGO DE RAPD EM PROGRAMA DE  
RETROCRUZAMENTO EM FEIJÃO**

**WILHELM EIGO HAGIWARA**

2001

WILHELM EIGO HAGIWARA

EMPREGO DE RAPD EM PROGRAMA DE RETROCRUZAMENTO EM  
FEIJÃO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

prof. Dr. João Bosco dos Santos

LAVRAS  
MINAS GERAIS  
2001

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

Hagiwara, Wilhelm Eigo

Emprego de RAPD em programa de retrocruzamento em feijão / Wilhelm Eigo  
Hagiwara. – Lavras : UFLA, 2001.

75 p. : il.

Orientador: João Bosco dos Santos.

Dissertação(Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Retrocruzamento. 2. RAPD. 3. Feijão. 4. Melhoramento genético. 5.  
*Colletotrichum lindemuthianum*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.6523

WILHELM EIGO HAGIWARA


EMPREGO DE RAPD EM PROGRAMA DE RETROCRUZAMENTO EM  
FEIJÃO

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

APROVADA em

Prof. Dr. Magno Antônio Patto Ramalho UFLA

Prof. Dra. Elaine Aparecida de Souza UFLA

  
Prof. Dr. João Bosco dos Santos  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

*Aos meus pais Hajime e Nobuko,  
aos meus irmãos Ernesto, Angelina e Samuel,*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

Ao professor João Bosco dos Santos pela paciência, pela confiança, pela disponibilidade e por todos os ensinamentos transmitidos durante o curso.

Aos professores César, Magno e Ângela, por todos os ensinamentos transmitidos.

Aos amigos do laboratório de Genética Molecular da UFLA, Sidney, Juliano, Flávia, Ana Luiza, Taislene e Mariney.

Ao amigo Lamartine, pela inestimável ajuda para a realização desse trabalho.

A todos os amigos do curso de Genética e Melhoramento de Plantas e dos outros cursos de pós-graduação, pela amizade e pelo apoio no decorrer desse trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Biologia pelos auxílios prestados.

Aos amigos Humberto Brandão e Ulises Bustamante, pela amizade e pela excelente convivência.

Aos grandes amigos Alexander de Andrade e Odair José Manfroi, por todos esses anos de amizade sincera.

A todos que, embora não citados, contribuíram para o sucesso desse trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 O melhoramento pelo método de retrocruzamento.....	4
2.2 Marcadores genéticos.....	6
2.3 Marcadores PCR e RAPD.....	7
2.4 Seleção assistida por marcadores para resistência à antracnose.....	9
2.5 Coeficientes de similaridade usados em estudos com marcadores RAPD.....	11
2.6 Uso de marcadores moleculares em programas de retrocruzamento.....	13
2.7 Análise de agrupamentos.....	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Material genético e obtenção das famílias de retrocruzamento.....	20
3.2 Extração de DNA.....	22
3.3 Análise de RAPD.....	23
3.4 Análise da similaridade genética.....	24
3.5 Avaliação de campo.....	27
3.6 Análise das características morfo-agronômicas.....	28
3.7 Correlações entre a similaridade genética e os caracteres agronômicos.....	29
3.8 Uso do primer OPL-04 para certificar se as plantas selecionadas possuem o alelo de resistência Co-7.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 Análise de RAPD.....	30
4.2 Avaliação da similaridade genética.....	32

<b>4.3 Resultados das análises das características morfo-agronômicas.....</b>	<b>40</b>
<b>4.4 Correlação dos caracteres morfo-agronômicos com a análise molecular.....</b>	<b>41</b>
<b>4.5 Uso do primer OPL-04 para certificar se as plantas selecionadas possuem o alelo de resistência Co-7.....</b>	<b>46</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>48</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>58</b>



## RESUMO

HAGIWARA, W.E. **Emprego de RAPD em programa de retrocruzamento em feijão.** Lavras: UFLA, 2001. 75p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)\*

Visando verificar a utilidade dos marcadores RAPD para acelerar a recuperação dos fenótipos desejáveis em um programa de retrocruzamento, foram selecionadas 167 plantas resistentes ao fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, após a inoculação com a raça 2047. Essas plantas foram divididas em dois grupos, sendo o grupo 1 formado por 73 plantas da população F<sub>4</sub>RC<sub>1</sub>, mais os genitores, em que a linhagem G2333 foi o genitor doador do alelo Co-7 de resistência e a linhagem ESAL696 a recorrente. O grupo 2 foi formado com 88 plantas da população F<sub>1</sub>RC<sub>2</sub>, 2 da F<sub>2</sub>RC<sub>2</sub>, 4 da F<sub>1</sub>RC<sub>3</sub>, e os genitores G2333 (doador) e os recorrentes ESAL696 e CI140. Foram extraídos o DNA dessas plantas e dos genitores e obtidos 70 bandas polimórficas utilizando-se 34 *primers*, por meio do RAPD. Foram estimadas as similaridades genéticas entre as plantas e genitores de cada grupo pelo procedimento de Dice. Constatou-se que o RAPD foi eficiente para estimar o parentesco das populações F<sub>4</sub>RC<sub>1</sub> e F<sub>1</sub>RC<sub>2</sub> de acordo com a genealogia dos mesmos. Os valores de similaridade genética mostraram que existe ampla variabilidade entre as plantas de cada grupo, sendo maior no grupo 2, devido à inclusão do CI140, como o segundo genitor recorrente, que exibiu baixa similaridade com o ESAL696. As famílias derivadas das plantas selecionadas foram avaliadas junto com os genitores recorrentes, na safra da seca, utilizando-se o delineamento látice simples 13 x 13 onde foram avaliados o número dias para florescimento, incidência de mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*), produção de grãos e peso de 100 sementes. Na safra de inverno de 2000, as mesmas famílias foram avaliadas na geração seguinte utilizando-se um látice triplo 13 x 13, e foram realizadas as mesmas avaliações do primeiro experimento, com exceção da incidência de mancha angular, incluindo a avaliação do porte das plantas e do tipo de grãos. Visando verificar se os marcadores explicaram, pelo menos em parte, a variação nos caracteres morfo-agronômicos, foram estimadas as correlações destes com a similaridade genética geral (sgg) e, também, com as similaridades das plantas de retrocruzamento com os genitores. Com exceção do peso de 100 sementes, todos os outros caracteres tiveram pelo menos uma

---

\* Comitê orientador: João Bosco dos Santos - UFLA (Orientador)

correlação significativa com os dados moleculares, a maioria, coerente com o esperado, baseando-se nos fenótipos dos genitores avaliados no campo. Isso mostra que pelo menos alguns marcadores explicam parte da variação dos caracteres. Os resultados das correlações e de parentesco indicam que o RAPD deve ser útil para auxiliar na seleção de plantas nas populações segregantes que apresentaram maiores semelhanças ao genitor recorrente mesmo em RC<sub>1</sub>.

## ABSTRACT

HAGIWARA, W.E. Utility of RAPD markers in a common bean backcross breeding program. Lavras: UFLA, 2001. 75p. (Dissertation - Master Program in Genetic and Plant Breeding)\*

Aiming to check the viability of RAPD markers for helping to select desirable phenotypes in backcross populations of common bean, 167 resistant plants were selected after inoculation with 2047 race of *Colletotrichum lindemuthianum*. Those plants were placed into two groups, one with 73 plants from  $F_4BC_1$  population plus the donor parent, G2333 line, the carrier of Co-7 allele for *C. lindemuthianum* resistance, and the recurrent parent, line ESAL696. The group 2 had 88 plants from  $F_1BC_2$ , 2 from  $F_2BC_2$ , 4 from  $F_1BC_3$ , the G2333 donor parent, and the recurrent parents, ESAL696 and the line CI140. DNA was extracted from each plant and parents. 70 polymorphic bands were obtained, by using 34 primers in the RAPD procedure. Genetic similarities between every pair of backcrossed plants and parents were estimated according to Dice procedure. High variability was detected among genetic similarity estimates, mainly in group 2 due to the use of CI140 as a second recurrent parent that exhibited small similarity to ESAL696. Also, RAPD was efficient for estimating the relationship of  $F_4BC_1$  and  $F_1BC_2$  populations as expected by genealogy. Families derived from each backcrossed plant and the recurrent parents were evaluated in the field, using a simple lattice square 13 x 13, in the "secas" season of 2000. In the next generation, they were evaluated in the winter season, using a triple lattice square 13 x 13. Data were taken of number of days to flowering, angular leaf spot (*Phaeoisariopsis griseola*), grain yield, 100 seed weight and plant and grain type. Correlation between the traits and general genetic similarity and also the traits and similarities of backcrossed plants with the parents was estimated aiming to check if the marker explained, at least in part, the variation in morpho-agronomical traits. All traits, with exception of 100 grain weight, showed at least one significant correlation with RAPD data, that was generally consistent based on the parents phenotypes, indicating that, at least some markers are related to the variation of those traits. So, considering the correlation and the relationship results, we can conclude that RAPD is useful for helping to select plants more related to the recurrent parent, even in the  $BC_1$  population.

---

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

## 1 INTRODUÇÃO

O melhoramento genético do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) no Brasil têm visado vários caracteres de importância agronômica, com destaque para a produtividade, tipo de grãos e resistência à patógenos (Ramalho, Santos e Zimmermann, 1993; Vieira, Borém e Ramalho, 1999).

Entre os patógenos mais importantes, o fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, causador da antracnose, que ocorre em todo o país, é um dos que se destaca por causar redução de produção de até 100%, especialmente, em regiões que apresentam temperatura amena e alta umidade, durante o ciclo da cultura (Sartorato e Rava, 1994). A obtenção de cultivares resistentes é a alternativa mais eficiente para o controle da doença, que é amplamente viável, devido ao fato do feijoeiro possuir vários genes independentes, cada um com um ou mais alelos de resistência a várias raças e com marcadores moleculares ligados à maioria desses alelos já identificados (Adam-Blondon et al., 1994; Castanheira, Santos e Melo, 1996; Young e Kelly, 1996a; Alzate-Marin, 1996; Santos e Ferreira, 1996; Santos, Castanheira e Melo, 1996; Young e Kelly, 1997; Young et al., 1998; Arruda, 1998; Castanheira et al., 1999; Silva, 2000). Esses marcadores permitem a piramidação dos alelos de resistência dos diferentes genes, com a finalidade de aumentar a vida útil da resistência das cultivares.

Infelizmente, as linhagens utilizadas como fontes de alelos de resistência são geralmente mal adaptadas e o meio mais viável da transferência desses alelos é o método de retrocruzamento. Por meio desse método, o genitor doador do alelo de resistência é inicialmente cruzado com o genitor recorrente, que deve ser uma linhagem/cultivar ideal sob o ponto de vista de adaptação e fenótipos agronômicos de interesse. Os cruzamentos necessários são feitos com um ou

mais genitores recorrentes, visando aumentar a frequência de seus alelos na população segregante, juntamente com o alelo de resistência.

Normalmente, são necessários de 5 a 6 retrocruzamentos para se recuperar 98,4% ou 99,2% dos alelos do genitor recorrente, o que demanda tempo para a obtenção da nova cultivar. Essa taxa em que as plantas recuperam o genótipo do pai recorrente é uma média para todos os locos e para todas as plantas da população segregante, porém, considerando-se o conjunto de genes responsável pela expressão de características agrônômicas e comerciais desejáveis, estes podem estar sendo recuperados mais rapidamente, em algumas plantas, nos primeiros retrocruzamentos. Se a cada retrocruzamento forem identificadas essas plantas para serem utilizadas no próximo retrocruzamento o tempo para fixar a maioria dos fenótipos desejáveis do genitor recorrente pode ser reduzido, diminuindo, conseqüentemente, o tempo para o lançamento da nova cultivar com o alelo de resistência.

Com o uso de marcadores moleculares como o RAPD pode ser possível identificarem-se os genótipos, com maiores proporções dos alelos do recorrente, já na geração  $F_1$  do primeiro retrocruzamento e sem que seja necessário esperar pela conclusão do ciclo de vida da planta, possibilitando a redução no tempo nos programas de melhoramento. A identificação dos genótipos, por meio do RAPD, pode ser feita a partir da estimativa da similaridade genética, que corresponde ao parentesco entre as plantas segregantes de cada retrocruzamento. As plantas que apresentarem maior similaridade em relação aos genitores recorrentes devem possuir maior proporção de alelos do mesmo. Há evidências de que a diversidade genética identificada pelos marcadores RAPD está correlacionada à diversidade morfo-agronômica (Machado, 1999; Duarte, Santos e Melo, 1999).

Assim, os objetivos do trabalho foram: *a.* estimar a similaridade genética, baseada em marcadores RAPD, entre plantas de diferentes retrocruzamentos, provenientes do cruzamento do genitor doador G2333, com os

recorrentes ESAL 696 e CII40 visando identificar aquelas com maior similaridade aos genitores recorrentes; *b.* verificar se a seleção das plantas resistentes à antracnose, com base na inoculação, foi concordante com a presença do marcador amplificado pelo *primer* OPL-04, que está ligado ao alelo Co-7 de resistência ao *Colletotrichum lindemuthianum*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Melhoramento pelo método de retrocruzamento

O método de retrocruzamento é usado para a transferência de um ou mais alelos de interesse de um genitor doador, para um genitor recorrente, normalmente cultivares elites, que não possuem os fenótipos condicionados por esses alelos. Normalmente, o genitor recorrente é um genótipo adaptado, superior em vários aspectos, mas que não possui os poucos alelos desejáveis do não recorrente (Allard, 1971). O método permite manter as qualidades de uma boa cultivar, enquanto se adiciona fenótipos desejáveis, tais como a resistência a fatores de estresse ambiental ou qualidade nutricional de fontes de germoplasma domesticado ou não domesticado (Reyes-Valdés, 2000).

O objetivo do retrocruzamento é recuperar os alelos do pai recorrente, além daqueles que estão sendo transferidos do parental doador. A taxa média de recuperação depende da intensidade de seleção para os fenótipos do parental recorrente, que é praticada durante o retrocruzamento e o efeito da ligação (Fehr, 1987). Na ausência de seleção e ligação, a porcentagem média de alelos do parental recorrente, cresce a cada retrocruzamento, em metade da porcentagem do germoplasma do parental não recorrente, que estava presente na geração anterior ao retrocruzamento. Essa porcentagem de recuperação do genoma do genitor recorrente (GR) é dada pela expressão  $\%GR=100[1-(0,5)^{n+1}]$ , em que n é o número de retrocruzamentos (Openshaw, Jarbol e Beavis, 1994). No entanto, essa expressão ignora o fenômeno conhecido por arraste ou retenção, devido à ligação ('linkage drag') (Brinkman e Frey, 1977), ou seja, a persistência de material genético do parental doador ligado ao alelo a ser introgressado. Assim, as novas linhagens formadas pelo retrocruzamento diferem, não somente no gene de introgressão, mas também, nos outros genes ligados a ela (Stam e

Zeven, 1981). Vários modelos foram desenvolvidos para a predição da taxa do genoma do parental doador que permanecem retidos nessas linhagens, como o de Hanson (1959) e Stam e Zeven (1981). Este último autor previu que um segmento relativamente grande do cromossomo do doador pode permanecer mesmo em gerações mais avançadas de retrocruzamento. No entanto, o arraste de genes é importante somente se o parental doador tem características agronômicas muito indesejáveis (Tanksley et al., 1989), podendo inclusive, o genótipo parcialmente convertido, ser superior ao totalmente convertido para o genoma do recorrente (Lee, 1995).

Como o parental recorrente e o doador possuem os mesmos alelos, em alguns locos e alelos diferentes em outros, a %GR refere-se aos locos em que os alelos do pai recorrente diferem do doador. A amplitude da variabilidade genética, em uma população segregante, é função da divergência genética entre os pais envolvidos nos cruzamentos, correspondendo, essa divergência, à diferença nas frequências alélicas das populações (Falconer, 1981). Quanto maior o número de locos, em que os alelos dos parentais diferem, maior será o tempo de recuperação dos alelos do parental recorrente.

A expressão dada por Openshaw, Jarbol e Beavis (1994) estima a taxa média de recuperação do genoma recorrente, considerando toda a população, porém, teoricamente, em populações muito grandes, em apenas uma geração podemos selecionar o genótipo ideal, ou seja, possuindo o alelo desejado do doador e o resto do genoma do parental recorrente. Considerando  $c$  pares de cromossomos de mesmo comprimento e na primeira geração de retrocruzamento, pela função de mapeamento de Haldane, a probabilidade de se ter um indivíduo com o genótipo idêntico ao do pai recorrente é dada pela expressão  $[\frac{1}{2}(1-r_m)]^c$ , onde  $r_m$  é a taxa de recombinação entre as extremidades dos cromossomos, resultando em uma população extremamente grande, quando  $c$  é elevado (Visscher, Haley e Thompson, 1996). Pela função de mapeamento



de Haldane,  $r_m = \frac{1}{2}(1-e^{-2x})$ , onde  $x$  é a distância do mapa genético entre as extremidades dos cromossomos (Stam e Zeven, 1981). Assim, por exemplo, no caso do feijão, que possui 11 pares de cromossomos e considerando  $x = 1$  Morgan,  $r_m$  será de 0,4323 e, o número de plantas necessárias para se ter um único indivíduo com o genótipo desejado é de 1.038.232 plantas. No entanto, mesmo em uma população pequena, considerando o conjunto de genes responsáveis pela expressão de características agrônômicas e comerciais desejáveis, muitos deles podem estar sendo recuperados mais rapidamente, em algumas plantas, mesmo nos primeiros retrocruzamentos. Se a cada retrocruzamento forem identificadas essas plantas, para serem utilizadas no próximo retrocruzamento, o tempo para fixar todos os fenótipos desejáveis do pai recorrente pode ser reduzido, diminuindo conseqüentemente o tempo para o lançamento da nova cultivar com o alelo de resistência. Por essa razão é recomendada a seleção dos genótipos que mais se assemelham ao genitor recorrente, com base nos fenótipos desejáveis, nas populações segregantes dos retrocruzamentos.

Um dos problemas que existem é a identificação das plantas nas gerações segregantes de retrocruzamento, que são mais próximas do genitor recorrente. Uma alternativa é identificar o parentesco dessas plantas com os genitores, que podem ser estimados com o uso de marcadores genéticos.

## 2.2 Marcadores genéticos

Entre os tipos de marcadores utilizados em estudos genéticos e no melhoramento de plantas têm-se os marcadores morfológicos, bioquímicos/enzimáticos e moleculares. Até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos. Entretanto, eles ocorrem em número muito reduzido para funcionarem como marcadores.

A técnica de eletroforese de proteínas e enzimas foi amplamente empregada nas últimas décadas, para estudar a variação genética existente em plantas e animais, porém, devido também ao seu número limitado e ao baixo nível de polimorfismo mostrado em algumas espécies, os marcadores bioquímicos/enzimáticos têm sido gradualmente substituídos por marcadores, que detectem o polimorfismo diretamente na molécula de DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Entre os vários marcadores moleculares disponíveis atualmente, destacam-se, pela sua maior utilização, o RFLP ('Restriction Fragment Length Polymorphism'), o RAPD ('Random Amplified Polymorphic DNA'), os microssatélites ou SSRs ('Simple Sequence Repeat') e o AFLP ('Amplified Fragment Length Polymorphism') (Duarte, 1998). Esses marcadores são de grande utilidade na genética e melhoramento, pela identificação de grande polimorfismo, ausência de efeito pleiotrópico, não sofrerem influência do ambiente e podem ser analisados em qualquer estágio de desenvolvimento (Williams et al. 1990).

### 2.3 Marcadores PCR e RAPD

A técnica de PCR ('Polymerase Chain Reaction') foi desenvolvida em 1984, por Kary Mullis (Mullis e Falloona, 1987; Saiki et al., 1985) e consiste na amplificação, *in vitro*, de fragmentos de DNA, usando oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* de seqüência conhecida e complementares às extremidades do segmento a ser amplificado, direcionando a síntese de DNA alvo, em ciclos repetidos (Mullis, 1990). A reação de PCR é realizada em um termociclador, que fornece as temperaturas e respectivos tempos adequados à desnaturação da molécula de DNA, separando as fitas complementares, o anelamento dos *primers* e a extensão do DNA em cada ciclo de replicação, durante os 25 a 40 ciclos.

A técnica de RAPD, descrita, independentemente, por Welsh e McClelland (1990) e Williams et al. (1990), é uma variante do PCR, onde se utiliza um único *primer*, em vez de pares de *primers* e estes são mais curtos, em geral de dez nucleotídeos e, de seqüência arbitrária, dispensando, assim, o conhecimento prévio da seqüência do fragmento de DNA complementar ao *primer*, diminuindo o seu custo (Tingey, Rafalski e Williams, 1992). Cada *primer*, normalmente, amplifica vários fragmentos, em regiões arbitrárias do genoma, os quais são separados por eletroforese. Devido ao número quase ilimitado de *primers* diferentes, capazes de amplificar um grande número de seqüências aleatórias, visualizadas por meio de bandas distintas, há a possibilidade de alguns *primers* amplificarem fragmentos do genoma próximos ao alelo de interesse. Além disso, essas seqüências constituem-se em uma amostra do genoma, que permite estimar a similaridade entre genótipos, que representam o parentesco entre eles (Skroch, Santos e Nienhuis, 1992).

Entre os marcadores de DNA, o RAPD é o mais simples e viável de ser empregado em qualquer programa de melhoramento (Santos et al. 1994). Esses autores encontraram concordância entre os dendrogramas gerados, tanto por RAPD como por RFLP e sugerem que as diferenças na estimativa da similaridade genética entre RAPDs e RFLPs é devida mais a erros de amostragem, do que a diferenças em como o RAPD e o RFLP revelam polimorfismos. As principais desvantagens do RAPD, em relação ao RFLP é que eles são, usualmente, dominantes e possuem baixa reproducibilidade do padrão de bandas, que são muito sensíveis a diferentes concentrações dos componentes de reação e a condições dos ciclos (Weeden et al., 1992). Porém, no caso de identificação de alelos, com o uso de dois marcadores, um em atração, e outro, em repulsão, pode se distinguir o genótipo heterozigoto, da mesma forma que os marcadores codominantes. Já o problema de reproducibilidade pode ser contornado com a padronização das condições de

reação entre os diversos laboratórios ou seleção de *primers* pela reprodutibilidade (Skroch e Nienhuis, 1995b). Esses autores, também, concluíram que o erro na amostragem como a única fonte de erro é suficiente para explicar a variação nas estimativas das distâncias genéticas entre as amostras independentes de bandas de RAPD por eles estudados.

A seleção de *primers*, que amplificam bandas polimórficas fortes, além de minimizar possíveis falsos negativos, na ocorrência de bandas, diminui também seu custo, com a seleção de *primers*, que amplificam maior número de bandas (Skroch e Nienhuis, 1995a). Foi demonstrada que a porcentagem de falsos negativos é baixa, mas para bandas fracas esta pode atingir até 8% (Weeden et al., 1992; Skroch e Nienhuis, 1995b), e podem afetar as estimativas da similaridade.

Os fragmentos de RAPD, que identificam alelos de interesse, podem ser convertidos em novos marcadores moleculares, baseados em PCR, como os marcadores SCARs ('Sequenced Characterized Amplified Regions') (Melotto, Afanador e Kelly, 1996) e os marcadores ASAPs ('Allele-Specific Associated Primers') (Staub e Serquen, 1996), que são específicos e mais reproduzíveis do que o RAPD.

#### **2.4 Seleção assistida por marcadores para resistência à antracnose**

Vários autores contribuíram para desenvolver a teoria e as estratégias da seleção assistida por marcadores (MAS). O uso de marcadores moleculares em programas de introgressão, via retrocruzamento, é, talvez hoje, a aplicação mais concreta da tecnologia de marcadores moleculares no melhoramento (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Isso se faz com o uso de marcadores moleculares fortemente ligados aos alelos que se deseja introgridir, possibilitando o monitoramento da presença desses alelos nas gerações de retrocruzamento.

No melhoramento visando resistência a doenças, o uso de apenas um alelo vertical de resistência têm resultado em pequena durabilidade da resistência nas cultivares. Para aumentar a vida útil dos alelos verticais de resistência de genes diferentes, uma alternativa é construir uma pirâmide de genes, ou seja, reunir vários alelos de resistência de diferentes genes, em uma única cultivar (Pedersen e Leath, 1988; Mundt, 1990, Singh et al, 1992; Young e Kelly, 1996b; Miklas, Stavely e Kelly, 1993; Miklas, Johnson e Stone, 1996; Young e Kelly, 1997; Alzate-Marin et al., 1999c). Uma das dificuldades para a construção da pirâmide de genes é identificar a presença de dois ou mais alelos de resistência em um único genótipo. No caso do *Colletotrichum lindemuthianum*, em que os principais alelos conferem resistência a um grande número de raças, é necessário um conjunto de raças diferenciadoras para esses alelos para que eles possam ser identificadas em um único genótipo (Silva, 2000). Como todas as raças não são disponíveis para serem usadas como diferenciadoras de genes e algumas nem foram identificadas, é impossível ter certeza de forma rápida, que dois ou mais alelos ocorrem em um único genótipo, utilizando os procedimentos normais da genética por meio de inoculações (Young et al., 1998).

O uso de marcadores como o RAPD permite a seleção indireta para os alelos de resistência, levando vantagem em relação aos métodos convencionais, devido à sua maior eficiência e rapidez, principalmente, se forem usados marcadores estreitamente ligados e flanqueando o alelo de interesse. Esse procedimento contribui para reduzir o número exaustivo de testes de patogenicidade e, assim, viabiliza a piramidação de genes (Young e Tanksley, 1989; Kelly e Miklas, 1998).

Especificamente, em relação ao *Colletotrichum lindemuthianum*, em feijão comum, já foram identificadas vários marcadores ligados aos alelos de interesse (Adam-Blondon et al., 1994; Castanheira, Santos e Melo, 1996; Young

e Kelly, 1996a; Alzate-Marin, 1996; Santos e Ferreira, 1996; Santos, Castanheira e Melo, 1996; Young e Kelly, 1997; Young et al., 1998; Arruda, 1998; Castanheira et al., 1999; Silva, 2000), num total de dez alelos em oito genes independentes.

A linhagem G2333 é uma das doze diferenciadoras para a antracnose e é resistente a todas as raças que ocorrem no Brasil, conferida pelo alelo Co-7. Além disso a cultivar é uma pirâmide de três alelos de resistência contra o patógeno, possuindo além do Co-7, o Co-5 e, provavelmente, o Co-3 (Alzate-Marin et al, (1999a), todos identificados e marcados (Young e Kelly, 1997; Young et al., 1998; Castanheira et al., 1999; Silva, 2000). Atualmente, alguns autores acreditam que o alelo Co-7 é na verdade o Co-4<sup>2</sup>, que é alelo do Co-4. Um problema para o uso dessa fonte de resistência deve-se ao fato da linhagem ter hábito de crescimento tipo IV, ser sensível ao fotoperíodo e possuir grãos vermelhos e brilhantes, portanto inaceitável como cultivar. Assim, para um eficiente aproveitamento de seus alelos de resistência é necessário um programa de retrocruzamento, utilizando linhagens com boas características agrônômicas e comerciais como genitor recorrente. O alelo Co-7 foi marcado recentemente, pela técnica de RAPD, por Silva (2000), através do *primer* OPL04 (Operon Technologies, Califórnia, EUA), que amplifica uma banda situada a 0 cM desse alelo, sendo portanto, o marcador ideal.

## **2.5 Coeficientes de similaridade usados em estudos com marcadores RAPD**

O coeficiente de similaridade/dissimilaridade entre dois indivíduos constitui o ponto de partida para várias técnicas de análise multivariada, que permitem melhor visualização dos relacionamentos entre os mesmos (Duarte, 1998). Devido à sua importância, um grande número de coeficientes de similaridade têm sido propostos (Krzanowski, 1988).

Os mais simples coeficientes de similaridade relacionam-se com as variáveis dicotômicas, onde cada variável tem somente dois valores. Marcadores tipo RAPD, que são binários são incluídos nesse tipo de variável. Para estes marcadores, as quatro possíveis observações de comparação entre dois genótipos são classificadas baseadas na presença (1) ou ausência (0) de um marcador para cada genótipo conforme a Tabela 1.

A partir dos padrões de coincidência ou não coincidência das variáveis na comparação de dois genótipos, vários coeficientes de similaridade têm sido propostos, combinando quantidades diferentes de  $a$ ,  $b$ ,  $c$  e  $d$ . No coeficiente de Gower (Gower, 1971), a similaridade entre qualquer par de genótipos  $i$  e  $j$  ( $Sg_{ij}$ ) é calculada como:  $Sg_{ij} = a/(a + b + c)$ , avaliando assim a similaridade em comparações onde ocorrem coincidência para a presença de variáveis e ignorando para a ausência de variáveis, e descreve a similaridade entre plantas  $i$  e  $j$  como a proporção de fragmentos RAPD comuns nas duas plantas (Mumm et al., 1994). O coeficiente de Dice (Dice, 1945) enfatiza as comparações onde ocorrem coincidência para presença de variáveis, calculando a similaridade como:  $Sg_{ij} = 2a/(2a + b + c)$ . Este coeficiente também pode ser escrito por  $Sg_{ij} = 2N_{ij}/(N_i + N_j)$  onde  $N_i$  e  $N_j$  são o número de fragmentos RAPD inerentes à plantas  $i$  e  $j$ , respectivamente e  $N_{ij}$  é o número de fragmentos RAPD comum às duas plantas, assim, descreve a similaridade entre duas plantas como a proporção de fragmentos RAPD que permanecem inalterados em uma dada geração (Mumm et al., 1994). O coeficiente de Dice é também denominado de coeficiente de Nei e Li, enquanto que o coeficiente de Gower é similar ao coeficiente de Jaccard (Mumm e Dudley, 1995). Existem ainda vários outros coeficientes na literatura, que são específicos para variáveis dicotômicas e que são empregados com marcadores moleculares do tipo RAPD.

TABELA 1. Tabela de contingência mostrando os quatro possíveis resultados de comparações de dois genótipos por marcadores RAPD

		Genótipo <i>i</i>	
		1	0
Genótipo <i>j</i>	1	<i>a</i> (1,1)	<i>b</i> (0,1)
	0	<i>c</i> (1,0)	<i>d</i> (0,0)

Considerando que os resultados das análises de agrupamento e a ordenação podem ser influenciados de acordo com o coeficiente que é empregado (Jackson, Somers e Harvey, 1989), Duarte (1998) estudou oito coeficientes de similaridade, nas subseqüentes análises de agrupamento e ordenação de 27 cultivares de feijão, analisados por marcadores RAPD, com o fim de identificar o mais adequado para o estudo da divergência genética desses cultivares. Além dos coeficientes já citados, os outros coeficientes empregados no estudo foram a Rogers e Tanimoto, Andenberg, Russel e Rao, Ochiai e Ochiai II, e concluiu que o coeficiente de Sorensen-Dice, ou coeficiente de Dice, é o mais adequado para o estudo de divergência genética, utilizando marcadores RAPD. O resultado foi concordante com o obtido por Mumm e Dudley (1994), onde o coeficiente de Dice baseado em fragmentos de RFLP foi o mais coincidente com os resultados da informação de pedigree em milho.

## 2.6 Uso de marcadores moleculares em programas de retrocruzamento

Entre as vantagens oferecidas pelos marcadores de DNA para os programas de retrocruzamentos tem-se a seleção indireta de alelos desejáveis, seleção para regiões do genitor recorrente não ligadas à região introgridida e redução do arrasto de região indesejada do genoma ('linkage drag'), situada próxima à região introduzida, do parental doador, reduzindo consideravelmente



o número de gerações necessárias para recuperar o genoma do parental recorrente na progênie retrocruzada (Lee, 1995). A redução do arrasto de genes se dá pela seleção de indivíduos que carregam o alelo de interesse e são homocigotos para alelos do parental recorrente, em locos marcadores fortemente ligados (Frisch, Bohn e Melchinger, 1999a).

Apesar de ser uma técnica comprovadamente eficiente e empregada tradicionalmente, na recuperação dos genótipos desejados, a associação da seleção fenotípica com a seleção baseada em marcadores moleculares permite que um maior número de fenótipos do genitor recorrente seja recuperado em menor período de tempo, pois possibilitaria a seleção, na população segregante, de indivíduos que mais se assemelham ao genitor recorrente (Tanksley et al., 1989). O uso de marcadores moleculares, permite a seleção de indivíduos, que além de possuir o alelo de interesse, apresentam uma maior proporção do genoma recorrente, reduzindo assim o número de gerações de retrocruzamento necessárias para o desenvolvimento de cultivares (Tanksley, Young e Paterson, 1989; Hilel et al., 1990).

Em seu estudo, Hospital, Chevalet e Mulsant (1992) previram um ganho de duas gerações com o uso de marcadores moleculares e mostrou que, nas gerações iniciais, um aumento do número de marcadores, em mais de três por cromossomo não é eficiente, porém, assumiu independência entre todos os locos, nos cromossomos sem o alelo a ser introgridido, o alelo do doador no centro do cromossomo e um tamanho da população infinita. Segundo Openshaw, Jarbol e Beavis (1994), o número de retrocruzamentos necessários para a recuperação genômica de 97 - 98% pode ser reduzido de cerca de sete para três retrocruzamentos, por meio de seleção assistida com 40 a 80 marcadores, em uma progênie de 100 indivíduos, considerando-se um genoma de dez cromossomos de 200 cM cada. Adicionalmente, o autor recomendou o uso de quatro marcadores por cromossomo (de 200 cM). Visscher, Haley e Thompson

(1996) investigaram por simulação o ganho relativo, em um programa de retrocruzamento, utilizando somente marcadores, somente fenótipos, ou um índice de marcadores e fenótipos e concluiu que os marcadores foram eficientes, em programas de retrocruzamento, por introgridir um alelo e selecionar para um 'background' desejado. Marcadores espaçados de 10 a 20 centimorgans (cM) deram uma vantagem de uma a duas gerações de seleção em relação a seleção fenotípica. Em seu trabalho com simulação, Frisch, Bohn e Melchinger (1999b) encontraram resultados semelhantes, com um ganho de duas a quatro gerações para a transferência de um único alelo.

Ainda, quanto ao número de bandas polimórficas necessárias nos estudo de divergência genética, usando marcadores RAPD, Johns et al. (1997) verificaram por reamostragem que 50 bandas produziram o mesmo agrupamento, obtido com 106 bandas em um estudo com 69 cultivares de feijão do Chile. Em um trabalho semelhante, Nienhuis et al. (1995) verificaram que para número acima de 100, praticamente não há melhoria da eficiência, ocorrendo a estabilização do coeficiente de variação das distâncias genéticas entre os fenótipos. No entanto, a variância devido a amostragem é inversamente proporcional ao número de bandas utilizadas, enquanto que a variância devido ao erro de avaliação das bandas é independente do número de bandas, o que faz aumentar a importância do erro de amostragem, quando se tem pequeno número de bandas (Skroch e Nienhuis, 1995b).

Em relação a melhor estratégia, em termos da redução do número de plantas, Reyes-Valdés (2000) mostra que o uso de um conjunto de marcadores recorrentes na primeira geração e um conjunto diferente na segunda geração é a mais vantajosa. Em analogia à resposta para um caráter quantitativo, com distribuição normal (Falconer e Mackay, 1996), a resposta para a seleção do genoma recorrente pode ser calculada como  $R = i \sigma r$ , onde  $i$  é a intensidade de seleção,  $\sigma$  é o desvio padrão do genoma recorrente, e  $r$  é a correlação entre a

proporção dos alelos do parental recorrente no loco marcador e a proporção dos alelos do parental recorrente por todo o genoma (Frisch, Bohn e Melchinger, 1999b). Como o próprio processo de retrocruzamento aumenta a proporção do genoma recorrente, para uma única seleção do genoma do parental recorrente essa é mais eficiente se realizada na última geração de retrocruzamento, como demonstrado por Hospital, Chevalet e Mulsant (1992). Quando se têm populações grandes de RC<sub>1</sub>, a resposta à seleção é alta, devido a altos valores de  $\sigma$  e  $r$ . No entanto, a cada geração de retrocruzamento, o ganho em termos do genoma recorrente diminui pela metade (Frisch, Bohn e Melchinger, 1999b).

O uso de marcadores RAPD, para acelerar a recuperação do genoma recorrente, foi testado por Utumi (1996) e Carvalho (1997), para a cultura da soja e por Arruda (1998) e, Faleiro et al. (1997) para a cultura do feijão. Os três primeiros autores não encontraram uma boa concordância entre as distâncias obtidas por marcadores e caracteres fenotípicos de interesse, porém, citam que esses marcadores são úteis se associados à seleção fenotípica. Esses autores trabalharam com pequeno número de marcadores e avaliaram poucas plantas. Utumi (1996) sugere que o uso de marcadores seja utilizado na pré-seleção de plantas no estágio vegetativo e uma posterior avaliação fenotípica das plantas selecionadas. Carvalho (1997) comenta que a seleção conjunta através de marcadores e fenótipo é mais precisa e rápida, permitindo a condução de uma população com menor número de indivíduos, pela pré-seleção e uma recuperação mais rápida das características do genitor recorrente. Melo (2000a), trabalhando com cultivares de milho, encontrou uma correlação significativa, porém de pequena magnitude entre a divergência genética avaliada por meio de caracteres morfo-agronômicos e a estimada por meio de marcadores RAPD. No entanto, Alzate-Marin et al. (1999b), utilizando a seleção assistida por marcadores RAPD e usando diferentes *primers*, em cada ciclo de retrocruzamento por quatro gerações, conseguiu acelerar a recuperação do

fenótipo recorrente em, aproximadamente 4 ciclos de retrocruzamento, em relação ao de um programa convencional.

A baixa correlação entre a distância estimada pelo marcador RAPD, com características agronômicas e comerciais de interesse, provavelmente, se deve ao fato do RAPD marcar regiões aleatórias do genoma, a maioria distantes dos locos, que controlam essas características. Como a maioria dessas características são controladas por vários genes, o uso de marcadores de QTL, para a estimativa de divergência genética, pode ser uma solução para aumentar a correlação entre essas estimativas.

Entre os marcadores, o RAPD possui a inconveniência de não ser 100% reproduzível, especialmente, entre laboratórios diferentes. Entretanto, na determinação da diversidade genética, por meio da amostra do genoma em um programa particular de retrocruzamento, por exemplo, as restrições da técnica deixam de ser importantes, pois há confirmação dos resultados de genealogia e dos obtidos por esses marcadores (Skroch, Santos e Nienhuis, 1992).

## 2.7 Análise de agrupamentos

Para se ter informações relativas a cada par de tratamentos, considerando  $n$  indivíduos, são estimados  $n(n-1)/2$  medidas de similaridade/dissimilaridade. Quando  $n$  é um número elevado, o reconhecimento de grupos homogêneos pelo simples exame visual das estimativas torna-se difícil ou impraticável.

A análise de agrupamento constitui uma metodologia numérica, com o objetivo de propor uma estrutura classificatória, ou do reconhecimento da existência de grupos, sendo o seu resultado final um gráfico em forma de árvore, denominado dendrograma, de grande utilidade para a classificação, comparação e discussão de agrupamentos biológicos (Regazzi, 1998). O processo de agrupamento, segundo Cruz (1990), envolve basicamente duas etapas: estimação

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras - DBI/UFLA, Lavras - MG. As avaliações de campo foram realizadas na Área experimental do Departamento de Biologia. A análise de RAPD foi realizada no Laboratório de Genética Molecular. O inóculo do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, raça 2047 foi preparado no Laboratório de Resistência à Doenças.

#### 3.1 Material genético e obtenção das famílias de retrocruzamento

O material foi obtido do cruzamento de uma cultivar não adaptada G2333 como genitor doador e as linhagens ESAL696 e CI140 como recorrente, de acordo com a Figura 1. O G2333 é um material originado do México, e possui o alelo Co-7 de resistência, contra todas as raças do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, que ocorrem no país. No entanto, é um genótipo não adaptado, possuindo grãos vermelhos e brilhantes, hábito de crescimento IV e sensibilidade ao fotoperíodo. O genitor recorrente ESAL696 possui grão do tipo carioca, porém de fundo escuro, hábito de crescimento II e é um pouco mais tardio que o CI140. O genitor recorrente CI140 possui grãos do tipo carioca de excelente qualidade porém possui hábito de crescimento III.

A geração  $F_1$  foi cruzada com a ESAL 696 e obteve-se a geração  $F_1RC_1$ . Esta geração foi inoculada com a raça 2047, do patógeno e obteve-se a geração  $F_2RC_1$  das plantas resistentes. Por autofecundação, obteve-se até a geração  $F_4RC_1$ . Por cruzamento da  $F_3RC_1$  com a linhagem CI140, que possui excelentes características agrônômicas como recorrente, obteve-se uma geração semelhante a  $F_1RC_2$ , já que ambos os genitores recorrentes são adaptados.

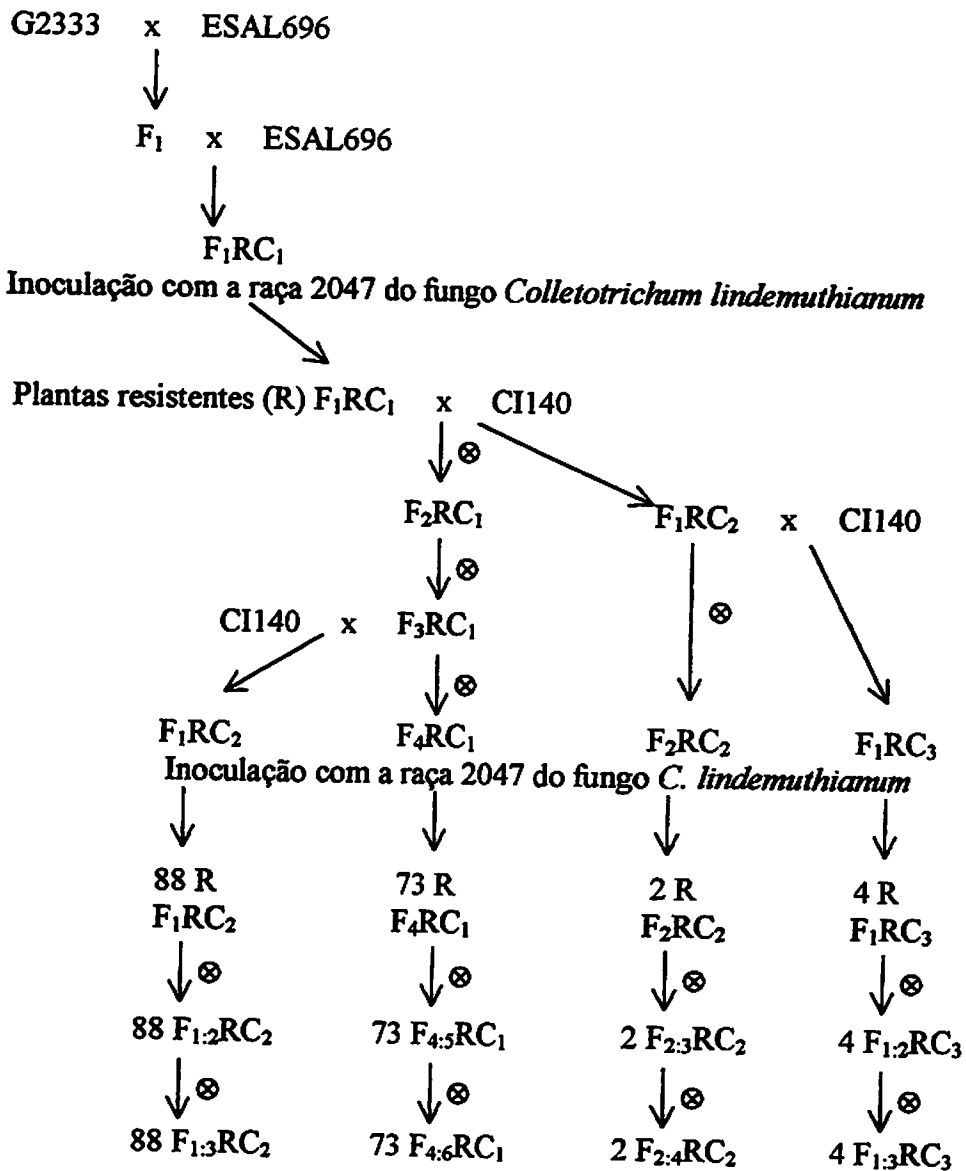



FIGURA 1. Obtenção das famílias de retrocruzamento.



As plantas resistentes  $F_1RC_1$  foram também cruzadas com a linhagem CI140, e obteve-se uma geração semelhante a  $F_1RC_2$ , que por autofecundação deu origem à geração  $F_2RC_2$ . Foi obtida também a geração  $F_1RC_3$ , usando também o CI140 como recorrente. As populações  $F_4RC_1$ ,  $F_1RC_2$ ,  $F_2RC_2$  e  $F_1RC_3$  foram inoculadas com a raça 2047 do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, selecionando-se as plantas resistentes, sendo 73 plantas  $F_4RC_1$ , 88  $F_1RC_2$ , 2  $F_2RC_2$  e 4  $F_1RC_3$ . Cada planta  $F_4RC_1$ ,  $F_1RC_2$ ,  $F_2RC_2$  e  $F_1RC_3$  produziu uma família  $F_{4:5}RC_1$ ,  $F_{1:2}RC_2$ ,  $F_{2:3}RC_2$  e  $F_{1:2}RC_3$ , as quais foram avaliadas no campo, juntamente com os genitores recorrentes ESAL696 e CI140, na safra da seca de 2000 e dessas famílias foram geradas famílias  $F_{4:6}RC_1$ ,  $F_{1:3}RC_2$ ,  $F_{2:4}RC_2$  e  $F_{1:3}RC_3$ , que foram avaliadas na safra de inverno de 2000, também junto com os genitores recorrentes.

### 3.2 Extração de DNA

De cada uma das 167 plantas resistentes das gerações  $F_4RC_1$ ,  $F_1RC_2$ ,  $F_2RC_2$  e  $F_1RC_3$ , e também dos genitores foram extraídos o DNA, de acordo com o procedimento descrito por Nienhuis et al. (1995), com algumas modificações.

Foram usados cerca de 2 gramas de folhas jovens, triturados em 10 ml de tampão de extração e 20µl de β-mercaptoetanol em um almofariz com sílica. O tampão de extração é constituído de 2% de CTAB, 100mM de TRIS (pH 8,0), 20mM de EDTA (pH 8,0), 1,4M de NaCl e 1% de PVP (polivinilpirrolidona). O material triturado foi incubado por 30 minutos em tubos de centrifuga, colocados em banho-maria a 65°C. Após o banho-maria os ácidos nucléicos foram extraídos com 10ml da mistura clorofórmio: álcool isoamil (24:1). Durante o banho-maria, os tubos foram agitados levemente, e após centrifugados, para separar as fases orgânica da aquosa e foram coletados os sobrenadantes que contém os ácidos nucléicos. Estes foram precipitados pela adição de 30ml da mistura de etanol 95%: acetato de amônio 7,5M (6:1) e mantidos em um freezer

a  $-20^{\circ}\text{C}$  por uma noite. Após a precipitação, os ácidos nucleicos foram transferidos para tubos de microcentrífuga "Eppendorf", centrifugados e secos. Em seguida, os ácidos nucleicos foram reidratados em tampão TE (1mM de TRIS e 0,1mM de EDTA). Foi realizada a segunda extração com clorofórmio: álcool isoamil (24:1) e os ácidos nucleicos do sobrenadante foram precipitados pela adição de pelo menos três volumes de uma mistura de acetato de sódio 3M: etanol 95% (1:20). Os ácidos nucleicos precipitados foram reidratados em tampão TE e o DNA foi quantificado, usando-se o fluorímetro Hoeffler Scientific TKO 100 e, posteriormente, diluído para a concentração de  $10\text{ng}/\mu\text{l}$ , utilizada na reação de RAPD.

### 3.3 Análise RAPD

O DNA obtido foi amplificado pelo método RAPD, onde foram utilizados 34 *primers* da "Operon Technologies" (Califórnia - EUA), que identificaram polimorfismos nos genitores. Cada reação RAPD foi preparada em volume de  $10\mu\text{l}$ , de acordo com o procedimento utilizado por Nienhuis et al. (1995), com algumas modificações. Cada reação conteve 20ng de DNA genômico,  $100\mu\text{M}$  de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP),  $0,4\mu\text{M}$  de um oligonucleotídeo iniciador (*primer*), 0,6 unidades da enzima Taq DNA polimerase, 50mM de TRIS (pH 8,3), 20mM de KCl, 2mM de  $\text{MgCl}_2$ ,  $5\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  de BSA, 0,25% de Ficol 400, 10mM de tartrazine e água pura totalizando  $10\mu\text{l}$ . As reações foram realizadas em tubos capilares de vidro, em um termociclador refrigerado a ar (Idaho Technology, Idaho Falls, Idaho). O termociclador foi programado para 40 ciclos, onde os dois primeiros ciclos foram de 60 segundos para a desnaturação a  $91^{\circ}\text{C}$ , 7 segundos para o anelamento do iniciador a  $42^{\circ}\text{C}$  e 70 segundos para a alongação a  $72^{\circ}\text{C}$ . Os 38 ciclos subsequentes diferiram-se em relação aos 2 primeiros ciclos no tempo de



desnaturação, reduzindo para 1 segundo. Finalmente, foi programada uma etapa de 4 minutos a 72°C para a elongação final.

Após a amplificação os produtos da reação foram separados por eletroforese, em gel de agarose a 1% em tampão TBE (0,045M de TRIS-Borato e 0,001M de EDTA) a 65 volts por 4 horas. Os fragmentos de DNA foram corados com brometo de etídio a uma concentração de 0,5µg/ml, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados com filme polaróide tipo 667.

As bandas foram classificadas visualmente como intensas, médias e fracas, baseando-se na resolução e grau de amplificação. Foram utilizadas somente as bandas intensas e médias para a análise. No gel, cada banda foi considerada um caráter único. A partir das bandas obtidas por esses *primers* foi construída uma matriz de zero e um, onde 1 indica a presença de banda e 0 a ausência. Essa matriz foi usada para se obter as estimativas da similaridade genética entre as plantas comparadas duas a duas.

### 3.4 Análise da similaridade genética

As plantas oriundas do retrocruzamento foram divididas em dois grupos, o grupo 1, contendo as plantas F<sub>4</sub>RC<sub>1</sub> mais os G2333, ESAL696 e CI140, num total de 76 plantas e o grupo 2, com as plantas F<sub>1</sub>RC<sub>2</sub>, F<sub>2</sub>RC<sub>2</sub> e F<sub>1</sub>RC<sub>3</sub> mais os três genitores, num total de 97 plantas.

A similaridade genética ( $s_{gij}$ ) foi estimada para cada grupo por meio do procedimento de Dice, utilizando-se a expressão  $s_{gij} = 2a/(2a + b + c)$ , sendo que  $a$  corresponde à presença de uma determinada banda, nos indivíduos  $i$  e  $j$ ;  $b$  a presença da banda, em  $i$  e ausência em  $j$ ; e  $c$  a ausência da banda em  $i$  e presença em  $j$ .

Os erros associados a cada similaridade ( $s_{sij}$ ) foram estimados a partir da expressão sugerida por Skroch, Tivang e Nienhuis (1992):

$$s_{sg} = [sg_{ij}(1 - sg_{ij})/(n - 1)]^{1/2}$$

onde:

$n$ : número total de combinações  $a$ ,  $b$  e  $c$  utilizadas na estimativa da similaridade genética;

O agrupamento das similaridades foi realizado por meio de um dendrograma, obtido pelo método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA), utilizando-se o programa NTSYS-PC 2,0 (Rohlf, 1992).

As famílias geneticamente diferentes foram identificadas no dendrograma a partir da estimativa do valor mínimo de similaridade, acima do qual as famílias são semelhantes, ou o valor máximo significativo de similaridade ( $sg_m$ ). O  $sg_m$  foi estimado por meio do teste de  $t$ , ao nível de 1% de probabilidade pela expressão:

$$sg_m = 1 - (t \times \bar{s}_{sg})$$

onde:

$t$ : valor tabelado de  $t$  com  $n-2$  graus de liberdade;

$\bar{s}_{sg}$ : erro médio das comparações consideradas no dendrograma.

A partir das estimativas de similaridade, também foram obtidas as similaridades observadas e esperadas dos genitores com as plantas oriundas de retrocruzamentos, das gerações  $F_4RC_1$  e  $F_1RC_2$ , com base nas similaridades estimadas entre os genitores, obtidas pelos marcadores RAPD. A similaridade observada corresponde à média das similaridades observadas entre as plantas de cada retrocruzamento, com cada genitor. As similaridades esperadas entre plantas de cada retrocruzamento, com os genitores ( $sge$ ) foram calculadas pelas seguintes expressões (Skroch, Santos e Nienhuis, 1992):

Similaridade esperada entre plantas RC<sub>1</sub> com os genitores:

$$sge_{RC1g1} = \%g_1 + \%g_2 \times sg_{g1g2}$$

$$sge_{RC1g2} = \%g_1 \times sg_{g1g2} + \%g_2$$

Similaridade esperada entre plantas RC<sub>2</sub> com os genitores:

$$sge_{RC2g1} = \%g_1 + \%g_2 \times sg_{g1g2} + \%g_3 \times sg_{g1g3}$$

$$sge_{RC2g2} = \%g_1 \times sg_{g1g2} + \%g_2 + \%g_3 \times sg_{g2g3}$$

$$sge_{RC2g3} = \%g_1 \times sg_{g1g3} + \%g_2 \times sg_{g2g3} + \%g_3$$

onde:

$\%g_1$ ,  $\%g_2$  e  $\%g_3$ : porcentagem esperada dos alelos dos genitores ESAL696, G2333 e CI140, respectivamente, com base na genealogia, nas plantas de retrocruzamento;

$sg_{g1g2}$ ,  $sg_{g1g3}$  e  $sg_{g2g3}$ : Similaridade genética observada entre os genitores, onde  $g1$ ,  $g2$  e  $g3$  são os genitores ESAL696, G2333 e CI140, respectivamente.

Foi realizada a partição das similaridades genéticas, em um componente médio ( $\overline{sg}$ ), um componente geral, denominado de similaridade genética geral (sgg), e um componente específico denominada de similaridade genética específica (sge), como proposto por Melchinger et al. (1990). Para essa partição foi empregado um procedimento semelhante à análise dialélica, método IV de Griffing (1956). O modelo empregado foi:

$$sg_{ij} = \overline{sg} + sgg_i + sgg_j + sge_{ij} + e_{ij}$$

onde  $e_{ij}$  é o erro médio das comparações associado à cada  $sg_{ij}$  e equivale à  $\overline{s_{sg}}$ .

Foi realizada uma análise para cada grupo, incluindo somente os genitores recorrentes utilizados em cada retrocruzamento, ou seja, ESAL696 no RC<sub>1</sub> e ESAL696 e CI140 nos RC<sub>2</sub> e RC<sub>3</sub>, utilizando todas as  $n(n-1)/2$  valores de similaridade, onde  $n$  é o número de plantas de cada grupo.

### 3.5 Avaliação de campo

As 73 famílias F<sub>4,5</sub>RC<sub>1</sub>, 88 F<sub>1,2</sub>RC<sub>2</sub>, 2 F<sub>2,3</sub>RC<sub>2</sub> e 4 F<sub>1,2</sub>RC<sub>3</sub> e os genitores recorrentes ESAL696 e CI140, totalizando 169 tratamentos, foram avaliados no campo no período da seca de 2000, usando o delineamento látice simples 13 x 13, com parcelas de uma linha de um metro, espaçadas de 0,50m. No inverno de 2000 as mesmas famílias foram avaliadas na geração seguinte, utilizando-se um látice triplo 13 x 13, com parcelas de uma linha de dois metros. Nos dois experimentos foram realizados os tratos culturais normais da cultura, acrescido da irrigação por aspersão sempre que necessário.

As famílias foram avaliadas com base no número de dias para o florescimento, incidência de mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*), produção de grãos em g/parcela e peso de 100 sementes. No experimento conduzido na safra de inverno de 2000 foram feitas as mesmas avaliações do primeiro experimento com exceção da incidência de mancha angular e incluindo a avaliação do porte das plantas e o tipo de grãos. O número de dias para florescimento corresponde ao número de dias com pelo menos 50% das plantas com uma flor aberta. Para a mancha angular foi usada um diagrama de notas de 1 a 9, proposta por Bergamin Filho et al., (1995), utilizando a média de três avaliadores. O porte foi avaliado por meio de um diagrama de avaliação do porte como um todo, semelhante ao proposto por Collicchio (1995) por meio de dois avaliadores. Para o tipo de grãos, foi usada uma escala descritiva semelhante à utilizada por Marques Júnior (1997), onde é tomada como padrão o tipo de grão da cultivar Carioca, ou seja, grãos com coloração creme e estria marrom-clara. A

escala usada foi de 1 a 5, com a nota 1 para grãos do tipo "Carioca", ou seja, creme com estrias marrom-claras, fundo claro, sem halo, grãos de tamanho médio e não achatados. A nota 5 foi dada para materiais que apresentaram grãos fora do padrão "Carioca". A avaliação do tipo de grãos foi realizada por dois avaliadores e não foi usada repetições.

### 3.6 Análise das características morfo-agronômicas

As características avaliadas nos experimentos de campo foram submetidas à análise de variância, considerando aleatórias todas as fontes de variação, exceto a média, segundo o seguinte modelo estatístico:

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

onde:

$Y_{ijk}$ : observação referente ao tratamento  $i$  no bloco  $k$ , dentro da repetição  $j$ ;

$m$ : efeito fixo da média geral do ensaio;

$b_{k(j)}$ : efeito aleatório do bloco  $k$ , na repetição  $j$ , sendo ( $k = 1, 2, \dots, 13$ );

$r_j$ : efeito aleatório da repetição  $j$ , sendo ( $j = 1, 2$ ) no caso da safra da seca e ( $j = 1, 2, 3$ ) na safra de inverno;

$t_i$ : efeito aleatório do tratamento  $i$ , sendo ( $i = 1, 2, 3, \dots, 169$ );

$e_{ijk}$ : efeito aleatório do erro experimental, da parcela que recebeu o tratamento  $i$ , no bloco  $k$ , dentro da repetição  $j$ , assumindo-se que os erros são independentes e normalmente distribuídos, com média zero e variância  $\sigma^2$ .

### 3.7 Correlações entre a similaridade genética e os caracteres agronômicos

Foi estimada a correlação de Pearson, entre a similaridade genética geral (sgg) de cada planta de retrocruzamento, e as respectivas médias ajustadas das características agronômicas, avaliadas em cada época, para cada grupo. Foram também estimadas correlações entre as similaridades das plantas de retrocruzamento com os genitores e as respectivas médias ajustadas das características agronômicas avaliadas em cada época, para cada grupo. As estimativas das correlações foram testadas por meio do teste *t*.

### 3.8 Uso do *primer* OPL-04 para certificar se as plantas selecionadas possuem o alelo de resistência Co-7

O *primer* RAPD OPL-04 (5'GACTGCACAC3') foi usada para verificar se todas as plantas usadas na avaliação possuem a resistência à raça 2047 do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*. Este *primer* amplifica uma banda de aproximadamente 1000pb, situada a 0 cM do alelo Co-7 e foi identificada por Silva (2000).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise de RAPD

Neste estudo, foram utilizadas 34 iniciadores, que geraram pelo menos uma banda polimórfica, num total de 70 bandas polimórficas, nas plantas de retrocruzamento e genitores (Tabela 1). O número médio de bandas polimórficas por iniciador de 2,06 foi baixo em relação ao obtido por outros trabalhos com feijão, como Johns et al. (1997), Duarte (1998), Beebe et al. (1995), Vasconcelos et al. (1996) e Skroch, Santos e Nienhuis (1992). Nesses trabalhos foram analisadas várias linhagens muito contrastantes ou incluíram linhagens adaptadas e não adaptadas. No entanto, o número médio de bandas polimórficas foi semelhante ao obtido por Melo (2000b), que utilizou plantas obtidas por cruzamento de dois genitores de conjuntos gênicos diferentes e, acima do obtido por Machado (1999), que analisou somente linhagens e cultivares adaptadas. Como no presente trabalho, utilizou-se plantas obtidas de retrocruzamento empregando-se três linhagens, sendo duas adaptadas e uma não adaptada, o número médio de bandas polimórficas por *primer* está de acordo com o esperado baseando-se nas literaturas citados acima.

Quanto ao número de bandas necessárias para a seleção do genoma recorrente, em um programa de retrocruzamento, em um estudo de simulação para seleção assistida (Openshaw, Jarbol e Beavis, 1994) recomendaram o uso de quatro marcadores por cromossomo (de 200 cM), o que daria 44 marcadores no caso do feijão ( $n = x = 11$ ). Deve-se considerar ainda que os cromossomos do feijoeiro são extremamente curtos, comparado com outras espécies (Vieira, Borém e Ramalho, 1999).

**TABELA 1.** Iniciadores utilizados com as respectivas seqüências de bases e número de bandas polimórficas, entre as plantas de retrocruzamento e genitores utilizados.

<b>Iniciador</b>	<b>Seqüência (5'- 3')</b>	<b>Nº de bandas polimórficas</b>
OPA-04	AATCGGGCTG	2
OPAA-16	GGAACCCACA	2
OPAC-07	GTGGCCGATG	3
OPB-07	GGTGACGCAG	1
OPB-08	GTCCACACGG	2
OPB-12	CCTTGACGCA	1
OPD-06	ACCTGAACGG	2
OPD-07	TTGGCACGGG	2
OPD-12	CACCGTATCC	2
OPE-06	AAGACCCCTC	1
OPE-08	TCACCACGGT	1
OPE-09	CTTCACCCGA	1
OPE-12	TTATCGCCCC	2
OPF-06	GGAATTCGG	2
OPG-09	CTGACGTCAC	3
OPG-12	CAGCTCACGA	6
OPH-03	AGACGTCCAC	1
OPH-19	CTGACCAGCC	2
OPJ-10	AAGCCCGAGG	2
OPK-10	GTGCAACGTG	3
OPN-07	CAGCCCAGAG	2
OPO-16	TCGGCGGTTC	1
OPP-01	GTAGCACTCC	1
OPR-03	ACACAGAGGG	2
OPT-02	CACCCCTGAG	1
OPU-01	ACGGACGTCA	2
OPV-12	ACCCCCACT	4
OPW-06	AGGCCCGATG	2
OPW-09	GTGACCGAGT	2
OPW-19	CAAAGCGCTC	2
OPZ-08	GGGTGGGTAA	3
OPZ-09	CACCCCAGTC	3
OPZ-11	CTCAGTCGCA	3
OPZ-12	TCAACGGGAC	1
<b>Total</b>		<b>70</b>



Hospital, Chevalet e Mulsant (1992) mostraram que nas gerações iniciais um aumento do número de marcadores, em mais de três por cromossomo, não é eficiente. Em seu trabalho de simulação por computador, Visscher, Haley e Thompson (1996) encontraram ganhos de uma a duas gerações de seleção, em relação a seleção fenotípica, usando marcadores espaçados de 10 a 20 centimorgans (cM), o que em feijão daria, aproximadamente, de 60 a 120 marcadores, considerando o comprimento total do mapa de ligação de feijão de 1226 cM, obtido por Freyre et al. (1998). As diferenças encontradas entre os trabalhos acima citados, devem-se às pressuposições adotadas pelos autores nas simulações. Adicionalmente, Johns et al. (1997) verificaram por reamostragem que 50 bandas produziram o mesmo agrupamento obtido com 106 bandas, em um estudo com 69 cultivares de feijão do Chile. Em um trabalho semelhante, Nienhuis et al. (1995) verificaram que acima de 100 bandas, praticamente não há melhoria da eficiência, ocorrendo a estabilização do coeficiente de variação das distâncias genéticas entre os fenótipos. Assim, o número de bandas polimórficas, usadas nesse trabalho é razoável, situando-se dentro do mínimo recomendado pela maioria dos autores citados acima.

#### **4.2 Avaliação da similaridade genética**

Com base nas 70 bandas polimórficas obtidas foi construída uma matriz de similaridades genéticas, a partir do coeficiente de similaridade de Dice, para cada grupo. As 10 plantas dos grupos 1 e 2 mais similares e as 10 mais distantes com os genitores são mostradas nas Tabelas 2 e 3 respectivamente. As similaridades entre os três genitores são mostradas em negrito nessas tabelas. As similaridades observadas entre o genitor doador G2333 e os recorrentes ESAL696 e CI140 foram baixos, enquanto que entre os recorrentes esse valor foi maior (Tabelas 2 e 3), refletindo o grau de divergência entre os genitores.

Mesmo no RC<sub>2</sub> várias plantas apresentaram similaridades acima de 50% com o G2333 (Tabela 3), indicando que muitas plantas ainda apresentam proporções elevadas de seu genoma. Em contrapartida, muitas plantas recuperaram o genoma do genitor recorrente em proporções acima da média esperada (Tabela 4), chegando a 0,91 de similaridade com o ESAL696, em plantas do primeiro retrocruzamento (Tabela 2). A Tabela 3 mostra que nas plantas do segundo retrocruzamento houve também muitas plantas que recuperaram o genótipo dos genitores recorrentes acima da média esperada (Tabela 4), chegando a 0,78 de similaridade com o CI140 e 0,79 com o ESAL696. No entanto, essas estimativas somente valem para os locos amostrados pelo RAPD e não refletem, necessariamente a recuperação dos fenótipos desejados dos pais recorrentes.

Considerando as populações F<sub>4</sub>RC<sub>1</sub> e F<sub>1</sub>RC<sub>2</sub>, as similaridades esperadas com base na genealogia e as observadas, baseadas nas similaridades entre os genitores, foram bastante semelhantes (Tabela 4), mostrando a eficiência do RAPD na predição do grau de parentesco entre as plantas de retrocruzamento para os locos amostrados pelos marcadores.

Analisando 17 linhagens provenientes de dois retrocruzamentos em feijão, Skroch, Santos e Nienhuis (1992) encontraram também uma boa correspondência nos valores de similaridade esperada, com base na genealogia e a observada por marcadores RAPD.

Deve ser enfatizado que as plantas F<sub>4</sub>RC<sub>1</sub> podem não representar a proporção de alelos da população RC<sub>1</sub>, em razão da seleção das plantas resistentes terem sido realizadas na população segregante F<sub>4</sub>. O mesmo pode ter ocorrido com as plantas RC<sub>2</sub>, que embora sejam plantas F<sub>1</sub>, foram obtidas a partir da população F<sub>3</sub>RC<sub>1</sub>. Provavelmente, essa é uma das causas do pequeno desvio das similaridades esperadas, em relação às observadas na Tabela 4.

**TABELA 2. Similaridades entre plantas da geração F<sub>4</sub>RC<sub>1</sub> com os genitores, das 10 plantas mais distantes e das 10 mais similares.**

<b>Mais distantes</b>			
<b>Tratamento</b>	<b>ESAL696</b>	<b>Tratamento</b>	<b>G2333</b>
G2333	0,20	ESAL696	0,20
CI140	0,44	33	0,24
84	0,48	34	0,25
17	0,51	CI140	0,25
83	0,51	108	0,27
167	0,58	164	0,27
3	0,59	104	0,27
145	0,60	4	0,28
70	0,61	35	0,28
82	0,61	27	0,29
85	0,62	162	0,30
16	0,64	165	0,30
<b>Mais similares</b>			
116	0,83	39	0,52
33	0,83	97	0,53
111	0,83	13	0,53
110	0,84	16	0,54
35	0,85	85	0,54
34	0,86	83	0,56
124	0,87	82	0,57
165	0,87	167	0,57
122	0,89	17	0,59
164	0,91	84	0,63

TABELA 3. Similaridades entre plantas das gerações  $F_1RC_2$ ,  $F_2RC_2$  (¹) e  $F_1RC_3$  (²) com os genitores, das 10 plantas mais distantes e das 10 mais similares.

Mais distantes					
Tratamento	ESAL696	Tratamento	G2333	Tratamento	CI140
G2333	0,20	ESAL696	0,20	G2333	0,25
CI140	0,44	CI140	0,25	100 <sup>1</sup>	0,32
18	0,55	106	0,27	58	0,41
19	0,56	60 <sup>2</sup>	0,28	51	0,41
148	0,56	91	0,29	ESAL696	0,44
37 <sup>2</sup>	0,57	75 <sup>2</sup>	0,30	152 <sup>1</sup>	0,49
52	0,57	24	0,30	99	0,52
114	0,57	73	0,30	118	0,53
20	0,58	132	0,32	44	0,54
131	0,58	47	0,32	121	0,55
79	0,59	49	0,32	89	0,55
63	0,59	147	0,32	42	0,55
Mais similares					
32	0,75	88	0,51	37 <sup>2</sup>	0,75
160	0,75	118	0,51	54	0,75
73	0,75	44	0,51	132	0,75
65	0,76	18	0,51	147	0,76
25	0,76	20	0,51	79	0,77
66	0,76	19	0,52	52	0,77
138	0,76	121	0,52	56	0,77
163	0,76	63	0,52	114	0,77
137	0,79	89	0,53	24	0,78
31	0,79	61	0,53	106	0,78

TABELA 4. Similaridades genéticas médias observadas e esperadas da população  $F_4RC_1$  e  $F_1RC_2$  com os genitores.

	$F_4RC_1$		$F_1RC_2$	
	Observada	Esperada	Observada	Esperada
ESAL696	0,72	0,80	0,68	0,62
G2333	0,41	0,40	0,36	0,33
CI140	--	--	0,63	0,70

Esses resultados sugerem que as similaridades genéticas entre as plantas dos retrocruzamentos e os genitores recorrentes são uma indicação eficiente da proporção de alelos dos genitores em cada planta e, conseqüentemente, deve ser útil para orientar a seleção daquelas com maior proporção de alelos dos recorrentes.

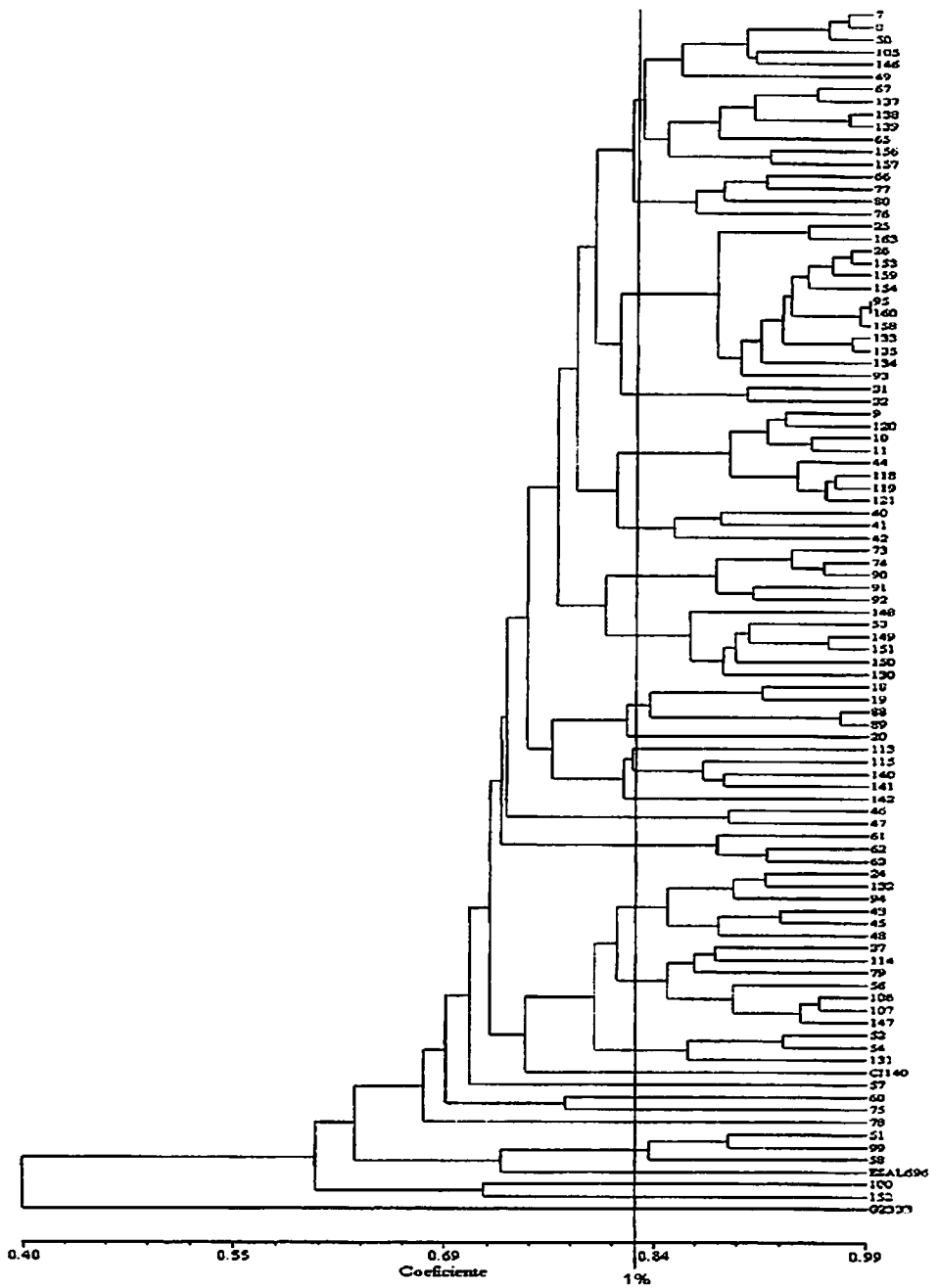
Para uma melhor visualização da divergência genética entre as plantas, foi construído um dendrograma para cada grupo, apresentados nas Figuras 2 e 3. As linhas de corte representam o valor máximo significativo de similaridade ( $sg_m$ ), acima do qual as plantas são considerados semelhantes. Nota-se que nos dois grupos o G2333 foi o mais distante, devido a menor proporção de seu genoma nas plantas de retrocruzamentos.

A linhagem CI140 foi incluída no dendrograma junto com as plantas  $F_4RC_1$ , apesar dela não ter participado como genitora, para a obtenção dessa geração e, evidentemente, ficou distante das plantas de retrocruzamentos, porém não tanto quanto a G2333, devido à sua maior similaridade com o ESAL696. Apenas quatro plantas  $F_4RC_1$  foram estatisticamente semelhantes ao ESAL696 (Figura 2), mostrando que existe ampla variação entre as plantas.

Na Figura 3, o ESAL696 ficou mais distante das plantas  $RC_2$  e  $RC_3$  em relação ao CI140 e, como esperado, um maior grupo de plantas foi mais semelhante a esse último recorrente. No grupo 2 nenhuma planta foi estatisticamente igual a nenhum dos genitores recorrentes, o que era esperado devido a menor similaridade observada das plantas  $RC_2$  e  $RC_3$ , com os genitores recorrentes em relação às plantas  $F_4RC_1$  com o ESAL696 (Tabelas 2, 3 e 4), onde apenas quatro plantas foram semelhantes. A redução da similaridade entre as plantas  $RC_2$  e  $RC_3$  com os genitores recorrentes é devido ao fato da máxima proporção média do genoma do recorrente esperado, no  $RC_2$ , ser de 50% do CI140, associada à baixa similaridade dessa linhagem com a ESAL696. Já em relação às plantas  $F_4RC_1$  essa proporção é de 75% do ESAL696.



FIGURA 2. Dendrograma das similaridades genéticas entre as plantas F4RC1 e os genitores. Os números referem-se às plantas resistentes selecionadas na população F4RC1.



**FIGURA 3.** Dendrograma das similaridades genéticas entre as plantas RC<sub>2</sub>, RC<sub>3</sub> e os genitores. Os números referem-se às plantas resistentes selecionadas nas populações RC<sub>2</sub> e RC<sub>3</sub>.

Observando-se as Figuras 2 e 3, cerca de 23% das plantas da população RC<sub>1</sub> são diferentes entre si, enquanto que na população de plantas RC<sub>2</sub> e RC<sub>3</sub>, 27% são diferentes. Esse resultado, à primeira vista, não era esperado, pois em RC<sub>1</sub> ocorre, em média 75% dos alelos do genitor recorrente e 25% do doador, enquanto que em RC<sub>2</sub>, espera-se que em média 87,5% de alelos do recorrente e 12,5% do doador. Portanto, esperava-se mais variação em RC<sub>1</sub>. No entanto, como já salientado, o RC<sub>2</sub> foi obtido utilizando-se um segundo genitor recorrente, o CI140, que é consideravelmente diferente do ESAL696 (Tabela 3, Figura 3). Esse procedimento de mudar o recorrente a partir da RC<sub>1</sub> contribuiu para aumentar a variabilidade genética entre as plantas, o que aliás é favorável à seleção, aumentando a chance de se conseguir combinações fenotípicas desejáveis. As plantas RC<sub>3</sub>, representadas pelos tratamentos 37, 60, 75 e 76 não foram classificadas entre as mais semelhantes ao CI140, porém foram avaliadas poucas plantas e todas elas vieram de uma mesma plantas RC<sub>2</sub>, constituindo uma amostra muito pequena. Embora tenha ocorrido maior variabilidade em RC<sub>2</sub> do que em RC<sub>1</sub>, vale notar que a população de plantas RC<sub>2</sub> é geneticamente mais diferente do genitor doador, com valor de similaridade média de 36%, em comparação com as plantas RC<sub>1</sub>, cuja similaridade é de 41% com o doador (Tabela 4).

Visando verificar as contribuições dos componentes similaridade genética geral (s<sub>gg</sub>) e similaridade genética específica (s<sub>ge</sub>), foi realizada uma partição da variação das similaridades, por meio da análise de variância apresentadas na Tabela 5. A partição das similaridades genéticas mostra que para o grupo 1, a s<sub>ge</sub> explica a maior parte da variabilidade, considerando os locos amostrados pelo RAPD, com coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) igual a 0,75 (Tabela 5). Já no grupo 2, a contribuição da s<sub>gg</sub> foi de 0,51, semelhante à s<sub>ge</sub>.



**TABELA 5.** Resumo da análise de variância com a decomposição da variação das similaridades genéticas ( $sg_{ij}$ ) dos grupos 1 e 2, em similaridade genética geral (s<sub>gg</sub>) e específica (s<sub>ge</sub>) e seus respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ).

FV	Grupo 1			Grupo 2		
	GL	SQ	$R^2$	GL	SQ	$R^2$
Cruzamentos	2700	22,25640		4559	26,38457	
SGG	73	5,59183	0,25	95	13,52054	0,51
SGE	2627	16,66458	0,75	4464	12,86403	0,49

Em uma análise dialélica, espera-se que a capacidade geral de combinação seja superior à capacidade específica, quando o conjunto de materiais é heterogêneo (Freire Filho, 1988). Analogamente, maiores contribuições do s<sub>gg</sub> indicam maior heterogeneidade dos materiais. Provavelmente, o s<sub>gg</sub> contribuiu menos no grupo 1, devido a maior similaridade das plantas com o ESAL696, com conseqüente diminuição da variabilidade entre as plantas. A contribuição da s<sub>gg</sub> foi maior no grupo 2, provavelmente, devido ao uso do CI140 como genitor recorrente, a partir do segundo retrocruzamento, o que gerou maior variabilidade entre os materiais como já comentado anteriormente. A s<sub>gg</sub> se deve à contribuição dos efeitos aditivos para as similaridades e a s<sub>ge</sub> aos efeitos não aditivos (Cruz e Regazzi, 1997). Trabalhando com 8 linhagens de soja de várias origens, Barroso (2000) obteve coeficiente de determinação de 0,74 para a distância genética geral, indicando maior heterogeneidade entre elas devido a efeitos aditivos.

#### **4.3 Resultados das análises das características morfo-agronômicas**

Observou-se ampla variabilidade para todos os caracteres avaliados, tanto na seca como no inverno de 2000 (Tabela 2A e 3A). Esse resultado já era esperado, pois foram usados genitores contrastantes para os caracteres morfo-agronômicos. Apesar dos genitores possuírem tamanho de grãos relativamente

semelhantes, houve grande variabilidade para esse caráter nas famílias de retrocruzamentos.

O coeficiente de variação em geral foi baixo (Tabela 2A e 3A), porém para o caráter produção este foi elevado, tanto na seca como no inverno, sendo de 27,5% e 18,15% respectivamente. Provavelmente, isso se deve ao tamanho reduzido da parcela e o uso de apenas duas repetições na safra da seca, e a ocorrência de mofo branco, na safra de inverno, que foi severo em algumas famílias, devido à incidência desuniforme da doença. Entretanto, esses valores são semelhantes aos obtidos em outros experimentos semelhantes (Melo, 2000b; Marques Júnior, 1997; Nunes, 1997; Ferreira, 1998).

#### **4.4 Correlação dos caracteres morfo-agronômicos com a análise molecular**

A possível contribuição de algumas bandas RAPD, para explicar a variação dos caracteres morfo-agronômicos avaliados foi verificada por meio das estimativas das correlações. Assim, foram obtidas as estimativas das correlações envolvendo a sgg e as médias de cada caráter avaliado nas famílias descendentes nas duas épocas. Foram também estimadas as correlações entre as similaridades das plantas de retrocruzamento com os genitores e as respectivas médias dos fenótipos morfo-agronômicos, avaliados nas famílias descendentes. As correlações tiveram pelo menos um valor significativo para todos os caracteres, exceto peso de 100 sementes (Tabelas 6 e 7).

Segundo Melchinger et al. (1990), que usou a distância de Roger para dados obtidos por RFLP, para calcular a distância geral de Roger (GRD) e específica (SRD), o valor alto, positivo ou negativo da GRD, indica que o genótipo possui um elevado número de alelos, que ocorrem em baixa ou alta frequência, respectivamente, em outras linhagens. De modo análogo, o valor positivo e alto da sgg indica que o genótipo possui muitos alelos em comum com o conjunto de genótipos.

TABELA 6. Correlações envolvendo as similaridades genéticas entre os genitores e cada planta de retrocruzamento ( $SG_i$  ESAL696,  $SG_i$  G2333 e  $SG_i$  CI140), ou a similaridade genética geral de cada planta ( $sgg_i$ ) com os caracteres morfo-agronômicos, avaliados nas famílias descendentes na seca de 2000.

	Dias para Florescimento	Reação à Mancha angular	Produção	Peso de 100 sementes
Plantas RC <sub>1</sub>				
$sgg_i$	0,2357*	-0,3283**	-0,0017	-0,0576
$SG_i$ ESAL696	0,2763*	-0,4609**	0,0970	-0,0497
$SG_i$ G2333	-0,4844**	0,4575**	-0,0679	0,1142
Plantas RC <sub>2</sub> e RC <sub>3</sub>				
$sgg_i$	0,1476	-0,2933**	0,3026**	-0,1561
$SG_i$ ESAL696	0,0277	0,0874	0,3253**	0,0444
$SG_i$ G2333	0,0333	-0,0891	0,1361	-0,0876
$SG_i$ CI140	-0,0379	0,0292	-0,1152	-0,1511

\* e \*\* Significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste  $t$ , respectivamente.

TABELA 7. Correlações envolvendo as similaridades genéticas entre os genitores e cada planta de retrocruzamento ( $SG_i$  ESAL696,  $SG_i$  G2333 e  $SG_i$  CI140), ou a similaridade genética geral de cada planta ( $sgg_i$ ) com os caracteres morfo-agronômicos, avaliados nas famílias descendentes no inverno de 2000.


	Dias para floreescimento	Porte	Produção	Peso de 100 sementes	Nota para Grãos
Plantas RC <sub>1</sub>					
$sgg_i$	0,2591*	0,0370	0,1455	-0,0899	0,0070
$SG_i$ ESAL696	0,2290*	-0,2036	0,2136	-0,1205	0,1454
$SG_i$ G2333	-0,3365**	0,1770	-0,3236**	0,2154	-0,1948
Plantas RC <sub>2</sub> e RC <sub>3</sub>					
$sgg_i$	0,0708	-0,0654	0,1995	-0,1810	-0,3248**
$SG_i$ ESAL696	0,3230**	-0,3547**	0,0357	-0,0469	-0,0926
$SG_i$ G2333	-0,1254	-0,0136	0,1503	0,0333	-0,0622
$SG_i$ CI140	-0,0921	0,3725**	0,0834	-0,1435	-0,1331

\* e \*\* Significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste  $t$ , respectivamente.

Apesar da sgg contribuir em menor proporção do total da variação entre as similaridades das plantas RC<sub>1</sub>, esta teve várias correlações significativas com os caracteres morfo-agronômicos.

As correlações positivas da sgg com o número de dias para florescimento, nas duas épocas, com as plantas RC<sub>1</sub>, indicam que plantas que tiveram maior porcentagem de locos em comum foram também mais tardias no florescimento. Como a maior parte das bandas RAPD presentes nas plantas de retrocruzamento vieram do genitor recorrente e, portanto, foram mais comuns entre essas plantas, sugere-se que plantas com maior proporção do genoma recorrente são mais tardias no florescimento. Essa hipótese pode ser confirmada pelos valores das correlações nas Tabelas 6 e 7, onde a similaridade das plantas RC<sub>1</sub> com a ESAL696 tiveram correlações positivas com o número de dias para florescimento e a similaridade com o G2333 tiveram correlações negativas. As correlações envolvendo as plantas RC<sub>2</sub> e RC<sub>3</sub> não foram significativas, exceto a similaridade com a ESAL696, no inverno de 2000, que foi novamente positiva. Isso ocorreu, provavelmente, porque a frequência de alelos do ESAL696 é menor nessas populações. Em acordo com esses resultados, o genitor ESAL696 foi o mais tardio em relação ao CI140, nas duas épocas, na avaliação de campo (Tabela 4A e 5A).

As correlações negativas da SGG, com a reação à *P. griseola*, mostram que plantas que tiveram maior porcentagem de locos em comum com todas as outras plantas foram mais resistentes à mancha angular, indicando que as plantas com maior proporção do genoma recorrente são mais resistentes. Essa hipótese é validada pelo fato da linhagem ESAL696 possuir alta resistência ao patógeno, enquanto a G2333 é altamente suscetível. A correlação entre os valores de similaridade das plantas RC<sub>2</sub> e RC<sub>3</sub> com a reação à mancha angular só foi significativa para a sgg, em decorrência da resistência ser proveniente da ESAL696, que contribuiu com uma proporção muito menor de alelos para essas



populações. Além disso, a CI140 que contribuiu com a maior parte dos alelos se mostrou mais suscetível do que a ESAL696 (Tabela 4A).

A correlação com o porte foi significativa somente com as similaridade das plantas RC<sub>2</sub> e RC<sub>3</sub> com os genitores recorrentes, sendo negativa com o ESAL696 e positiva com o CI140, mostrando que plantas dessas gerações mais similares ao ESAL696 tiveram melhor porte, o que é esperado, já que esse genitor possui hábito de crescimento tipo II e o CI140 é tipo III (Tabela 7A). O resultado não foi consistente no RC<sub>1</sub>, onde ocorreu maior variabilidade para o porte (Tabela 7A), devido à maior proporção do genoma do G2333, que possui hábito de crescimento do tipo IV.

A correlação positiva da sgg e da similaridade com o ESAL696 das plantas das gerações RC<sub>2</sub> e RC<sub>3</sub>, com a produção na safra da seca, não foi consistente nas plantas de RC<sub>1</sub> e na safra de inverno. Vale ressaltar que nas duas épocas o ESAL696 foi mais produtivo que o CI140, porém em média as famílias RC<sub>2</sub> foram mais produtivas nas duas épocas. A correlação negativa da similaridade das plantas RC<sub>1</sub> com o G2333 com a produção, pode ser devido ao fato de o G2333 ser um genótipo não adaptado e também devido ao intenso frio verificado no inverno de 2000. Esses fatos, certamente afetaram as plantas mais semelhantes a esse genitor, como constatado pelos sintomas de algumas famílias, que se mostraram afetadas pelas baixas temperaturas. É importante mencionar que os locos responsáveis pela produção possuem expressões inconsistentes, em diferentes épocas, como verificado por Melo (2000b) e explica, em parte, os resultados obtidos nas duas épocas.

Não se observou associação dos marcadores com o peso de 100 sementes. Para a nota de grãos a sgg das plantas RC<sub>2</sub> e RC<sub>3</sub> tiveram correlação negativa, indicando que os genitores recorrentes contribuíram para a melhoria do tipo de grão, porém o resultado não foi consistente nas correlações com as similaridades das plantas RC<sub>1</sub> ou do RC<sub>2</sub> e RC<sub>3</sub> com os genitores.

A ausência de correlações entre as medidas de similaridade genética e os caracteres morfo-agronômicos, podem ter várias origens como inacurácia das estimativas de similaridade genética e/ou inacurácia nas medições realizadas em caracteres morfo-agronômicos, ou pela própria inexistência de correlações entre os parâmetros da similaridade genética e das médias dos caracteres morfo-agronômicos. Neste estudo, provavelmente os 70 marcadores não foram suficientes para amostrar todo o genoma. Muitos autores sugerem o uso de marcadores espaçados regularmente, ao longo de todo o genoma (Openshaw, Jarbol e Beavis, 1994; Visscher, Haley e Thompson, 1996; Frisch, Bohn e Melchinger, 1999b; Hospital, Chevalet e Mulsant, 1992), porém, para isso seria necessário o conhecimento prévio de um mapa de ligação com marcadores RAPD. Como os caracteres morfo-agronômicos avaliados são controlados por vários genes, provavelmente por QTLs de diferentes efeitos dispersos irregularmente, ao longo do genoma e que interagem com o ambiente, similaridades envolvendo apenas os marcadores para esses QTLs devem fornecer melhores informações sobre os caracteres morfo-agronômicos.

Embora tenham sido usados marcadores aleatórios, a maioria das correlações significativas foram consistentes com os dados dos caracteres morfo-agronômicos dos genitores. Isso indica que uma parcela dos marcadores RAPD deve estar ligado aos QTLs desses caracteres e são importantes para a seleção de plantas mais similares ao genitor recorrente.

É importante mencionar que o feijão possui um ciclo de vida curto e a redução do número de retrocruzamentos, por meio da seleção assistida com marcadores, não implica em redução muito significativa no tempo de obtenção de uma cultivar melhorada. Provavelmente, a maior contribuição para essa espécie é permitir a recuperação de maior proporção de alelos do genitor recorrente. Entretanto, a contribuição dos marcadores para reduzir o tempo de

obtenção de uma cultivar melhorada, por retrocruzamento, é muito mais significativa em espécies de ciclo longo como as perenes.

#### **4.5 Uso do *primer* OPL-04 para certificar se as plantas selecionadas possuem o alelo de resistência Co-7**

Somente 83 plantas apresentaram a banda que identifica o alelo Co-7 de resistência à raça 2047, do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, sendo 35 plantas F<sub>4</sub>RC<sub>1</sub> e 48 plantas do RC<sub>2</sub> e RC<sub>3</sub>. As 84 plantas que não apresentaram a banda provavelmente não possuem o alelo Co-7 de resistência, uma vez que o marcador encontra-se em ligação completa com o alelo Co-7 (Silva, 2000). Poderia se questionar a validade dessa informação, porque, em geral, os resultados da inoculação são 100% eficientes. Entretanto, isso ocorre quando ela é realizada em plantas jovens, com cerca de 5-10 dias após a germinação e mantidas em câmara úmida por cerca de 72 horas. O procedimento de inoculação utilizado não foi exatamente o ideal, em razão da semeadura ter sido realizada em vasos, com cerca de 20 kg, com o fim de se colherem as sementes das plantas resistentes, para se obter as famílias descendentes. Além disso, devido à desuniformidade da germinação, a inoculação foi retardada e muitas plantas que se mostraram resistentes podem ter sido escapes. Uma maneira de confirmar essa hipótese é realizar uma nova inoculação nas famílias derivadas das plantas resistentes com a raça 2047. Entre as plantas F<sub>4</sub>RC<sub>1</sub>, que apresentaram a banda marcadora, espera-se que na maioria das famílias delas derivadas, as plantas sejam 100% resistentes e poucas famílias segreguem para o alelo de resistência. Dentre as plantas RC<sub>2</sub>, apenas duas são F<sub>2</sub>, enquanto que o restante RC<sub>2</sub> e RC<sub>3</sub> são da geração F<sub>1</sub>, cujas plantas, possuem o alelo Co-7 em heterozigose, assim, todas as famílias delas derivadas vão estar segregando para esse gene.

## 5 CONCLUSÕES

- 1- A similaridade genética obtida por marcadores RAPD mostrou-se útil para selecionar plantas mais similares aos genitores recorrentes, tanto em RC<sub>1</sub> quanto em RC<sub>2</sub>.
- 2- De acordo com a presença do marcador do alelo Co-7, nas plantas de retrocruzamento, a inoculação com a raça 2047 foi, parcialmente eficiente para a seleção das resistentes.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM-BLONDON, A.; SÉVIGNAC, M.; BANNEROT, H.; DRON, M. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to *ARE*, a simple gene conferring resistance to *C. lindemuthianum*, the causal agent of anthracnose in French bean. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.88, p.865-870, 1994.
- ALLARD, R.W. *Princípios do melhoramento genético das plantas*. Rio de Janeiro: USAID, 1971. 381p.
- ALZATE-MARIN, A.L. *Resistência à antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.): diversidade genética de raças de *Colletotrichum lindemuthianum*, herança de resistência e identificação de marcadores moleculares*. Viçosa: UFV, 1996. 65p. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- ALZATE-MARIN, A.L.; BAÍA, G.S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Evidências de que o gene Mexico III (Co-3) é um dos três genes de resistência à antracnose presente no cultivar G2333. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO,4, Salvador, 1999. *Anais....* Goiânia: EMBRAPA-CNPAP-APA, 1999a. p.368-370.
- ALZATE-MARIN, A.L.; COSTA, M.R.; DIAS, I.S.N.; SOUZA, K.A. de; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Retrocruzamento assistido por marcadores moleculares visando acelerar a introgressão de genes de resistência à antracnose do feijoeiro. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO,4, Salvador, 1999b. *Anais....* Goiânia: EMBRAPA-CNPAP-APA, 1999b. p.62-64.
- ALZATE-MARIN, A.L.; MENARIM, H.; CARVALHO, G.A.; PAULA JR, T.J.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Improved selection with newly identified RAPD markers linked to resistance gene to four pathotypes of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. *Phytopathology*, St. Paul, v.89, n.4, p.281-285, Apr. 1999c.
- ARRUDA, M.C.C. de. *Resistência do feijoeiro comum à antracnose: herança, identificação de marcadores moleculares e introgressão do gene Co-4 no cultivar Rudá*. Viçosa: UFV, 1998. 101p. (Dissertação- Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

- BARROSO, P.A.V.** Comparações entre métodos quantitativos e métodos baseados em marcadores **RAPD** para a predição do comportamento de populações de soja. Piracicaba: ESALQ, 2000. 162p. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- BEEBE, S.E.; OCHOA, I.; SKROCH, P.; NIENHUIS, J.; TIVANG, J.** Genetic diversity among common bean breeding lines developed for Central America. *Crop Science*, Madison, v.35, n.4, p.1178-1183, July/Aug. 1995.
- BERGAMIN FILHO, A.; LOPES, D.B.; AMORIM, L.; GODOY, C.V.; BERGER, R.D.** Avaliação de danos causados por doenças de plantas. In: **LUZ, W.C.** Revisão anual de patologia de plantas. Passo Fundo-RS: RAPP, 1995. v.3, p. 133-170.
- BRINKMAN, M.A.; FREY, K.J.** Yield component analysis of oat isolines that produce different grain yields. *Crop Science*, Madison, v.17, p.165-168, 1977.
- CARVALHO, W.L. de.** Efeito de lipoxigenases sobre níveis de inibidores de proteases de sementes de soja e uso de marcadores moleculares e fenotípicos para acelerar programa de retrocruzamento visando eliminar inibidor de protease. Viçosa: UFV, 1997. 58p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia)
- CASTANHEIRA, A.L.M.** Marcadores **RAPD** na avaliação do potencial de métodos de condução de população segregante de feijão. Lavras: UFLA, 2001. 75p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- CASTANHEIRA, A.L.M.; SANTOS, J.B. dos; FERREIRA, D.F.; MELO, L.C.** Identification of common bean alleles resistant to anthracnose using **RAPD**. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v.22, n.4, p.565-569, Dec. 1999.
- CASTANHEIRA, A.L.M.; SANTOS, J.B. dos; F.; MELO, L.C.** Uso do **RAPD** na identificação de genótipos de feijoeiro resistentes à antracnose. *Brazilian Journal of Genetics*, Ribeirão Preto, v.19, n.3, p.328, set. 1996. (Suplemento).
- COLLICCHIO, E.** Associação entre o porte da planta do feijoeiro e o tamanho dos grãos. Lavras: UFLA, 1995. 98p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

- CRUZ, C.D. Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas.** Piracicaba: ESALQ/USP, 1990. 188p. (Tese-Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético.** 2.ed. Viçosa: UFV, 1997. 390p.
- DIAS, L.A. dos S. Análise multidimensionais.** In: ALFENAS, A.C. (ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins, fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos.** Viçosa: UFV, 1998. p.405-473.
- DICE, L.R. Measures of amount of ecological association between species.** *Ecology*, Durham, v.26, p.297-302, 1945.
- DUARTE, J.M. Estudo da divergência genética em raças de feijão por meio de marcadores RAPD.** Lavras: UFLA, 1998. 78p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)
- DUARTE, J.M.; SANTOS, J.B. dos; MELO, L.C. Genetic divergence among common bean cultivars from different races based on RAPD markers.** *Genetics and molecular biology*, v.22, n.3, p.419-426, 1999.
- DWEIKAT, I.; MACKENZIE, S.; LEVY, M.; OHM, H. Pedigree assessment using RAPD-DGGE in cereal crop species.** *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.85, p.497-505, 1993.
- FALEIRO, F.G.; REGAGNIN, V.A.; CARVALHO, G.A.; MESQUITA, A.G.G.; PAULA Jr, T.J.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. de. Obtenção de uma variedade de feijão do "tipo carioca" resistente à ferrugem e à antracnose assistida por marcadores moleculares.** 1997. (no prelo).
- FALCONER, D.S. Introdução à genética quantitativa.** Viçosa: UFV, 1981. 279p.
- FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F. Introduction of quantitative genetics.** Essex: Longman, p.185, 1996.
- FEHR, W.R. Principles of cultivar development.** London: Macmillan, 1987. v.1, 536p.

- FERREIRA, W.D. Implicação do número de famílias no processo seletivo da cultura do feijoeiro. Lavras: UFLA, 1998 p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998. 220p.
- FREIRE FILHO, F.R. Análise genética de um dialelo entre genótipos precoces de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Piracicaba: ESALQ, 1988. 224p. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- FREYRE, R.; SKROCH, P.W.; GEFFROY, V. et al. Towards an linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.97, p.847-856, 1998.
- FRISCH, M.; BOHN, M.; MELCHINGER, A.E. Minimum sample size and optimal positioning of flanking markers in marker-assisted backcrossing for transfer of a target gene. *Crop Science*, Madison, v.39, p.967-975, 1999a.
- FRISCH, M.; BOHN, M.; MELCHINGER, A.E. Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of a gene. *Crop Science*, Madison, v.39, p.1295-1301, 1999b.
- GOWER, J.C. A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics*, Washington, v.27, p.857-874, 1971.
- HANSON, W.D. Early generation analysis of lengths of heterozygous chromosome segments around a locus held heterozygous with backcrossing or selfing. *Genetics*, Bethesda, v.44, p.833-837, 1959.
- HILEL, J.; SCHAAP, T.; HABERFELD, A.; JEFFREYS, A.J.; PLOTZKY, Y.; CAHANER, A.; LAVI, U. DNA fingerprints applied to gene introgression in breeding programs. *Genetics*, Bethesda, v.124, p.783-789, 1990.
- HOSPITAL, F.; CHEVALET, C.; MULSANT, P. Using markers in gene introgression breeding programs. *Genetics*, Bethesda, v.132, p.1199-1210, 1992.

- JACKSON, D.A.; SOMERS, K.M.; HARVEY, H.H. Similarity coefficients: measures for co-occurrence and association or simply measures of occurrence? *The American Naturalist*, Chicago, v.133, p.436-453, Mar. 1989.
- JOHNS, M.A.; SKROCH, P.W.; NIENHUIS, J. et al. Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. *Crop Science*, Madison, v.37, p.605-613, 1997.
- JOHNSON, R.A.; WICHERN, D.W. *Applied multivariate statistical analysis*. New Jersey: Prentice-Hall, 1988. 607 p.
- KELLY, J.D.; MIKLAS, P.N. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. *Molecular Breeding*, Amsterdam, v.4, n.1, p.1-11, Jan. 1998.
- KOTZ, S.; JOHNSON, N.L. UPGMA clustering method. In: KOTZ, S.; JOHNSON, N.L. *Encyclopedia of statistical sciences*. New York: J. Wiley, 1985. v.9, p.423-424.
- KRZANOWSKI, W.J. *Principles of multivariate analysis. A user's perspective*. Oxford: Oxford Science, 1988. 563p.
- LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. *Academic Press Inc. Advances in Agronomy*, v.55, p.265-344, 1995.
- MACHADO, C. de F. *Procedimentos para a escolha de genitores de feijão*. Lavras: UFLA, 1999. 118p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- MARQUES JÚNIOR, O.G. *Eficiência de experimentos com a cultura do feijão*. Lavras: UFLA, 1997. 80p. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- MELCHINGER, A.E.; LEE, M.; LAMKEY, K.R.; WOODMAN, W.L. Genetic diversity for restriction fragment length polymorphisms: relation to estimated genetic effects in maize inbreds. *Crop Science*, Madison, v.30, p.1033-1040, 1990.
- MELO, W.M.C. *Divergência genética e capacidade de combinação entre híbridos de milho*. Lavras: UFLA, 2000a. 73p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

- MELO, L.C. Mapeamento de QTLs em feijoeiro, por meio de marcadores RAPD, em diferentes ambientes.** Lavras: UFLA, 2000b. 148p. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- MELOTTO, M.; AFANADOR, L.; KELLY, J.D.** Development of a SCAR marker linked to the gene in common bean. *Genome, Ottawa*, v.39, n.6, p.1216-1219, Dec. 1996.
- MIKLAS, P.N.; JOHNSON, E.; STONE, V.** Selective mapping of QTL conditioning disease resistance in common bean. *Crop Science, Madison*, v.36, n.5, p.1344-1351, Sept.Oct. 1996.
- MIKLAS, P.N.; STAVELY, J.R.; KELLY, J.D.** Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. *Theoretical and Applied Genetics, Berlin*, v.85, p.745-749, 1993.
- MULLIS, K.B.** The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American, New York*, v.262, n.4, p.36-43, Apr. 1990.
- MULLIS, K.B.; FALLOONA, F.** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymology*, v.55, p.335-350, 1987.
- MUMM, R.H.; DUDLEY, J.W.** A classification of 148 U.S. maize inbreds: I. Cluster analysis based on RFLPs. *Crop Science, Madison*, v. 34, p.842-851, 1994.
- MUMM, R.H.; DUDLEY, J.W.** A PC SAS computer program to generate dissimilarity matrix for cluster analysis. *Crop Science, Madison*, v.35, n.3, p.925-927, May/June 1995.
- MUMM, R.H.; LAWRENCE, J.H.; DUDLEY, J.W.** A classification of 148 U.S. maize inbreds: II. Validation of cluster analysis based on RFLPs. *Crop Science, Madison*, v.34, p.852-865, 1994.
- MUNDT, C.C.** Probability of mutation to multiple virulence and durability of resistance gene pyramids. *Phytopathology, St. Paul*, v.80, n.3, p.221-223, Mar. 1990.

- NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SKROCH, P.; SANTOS, J.B. dos. Genetic relationships among cultivars and lines of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.120, n.2, p.300-306, 1995.
- NUNES, G.H. de S. **Seleção de famílias de feijoeiro adaptadas às condições de inverno do Sul de Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 1997. 48p (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- OPENSHAW, S.J.; JARBOE, S.G.; BEAVIS, W.D. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: Lower, R. (ed.) **Joint Plant Breeding Symposium on Analysis of Molecular Data**. Corvallis: Oregon State University, 1994.
- PEDERSEN, W.L.; LEATH, S. Pyramiding major genes for resistance to maintain residual effects. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.26, n.3, p.369-378, Mar. 1988.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. dos; ZIMMERMANN, M.J. **Genética quantitativa aplicada ao melhoramento de plantas autógamas: aplicações ao melhoramento do feijoeiro**. Goiânia: UFG, 1993. 271p.
- REGAZZI, A.J. Análise multivariada. In: **ENCONTRO MINEIRO DE GENETICISTAS**, 5, Viçosa, 1998. Anais Viçosa: Sociedade Brasileira de Genética Regional, 1998. p.55.
- REYES-VALDÉS, M.H. A model for marker-based selection in gene introgression breeding programs. **Crop Science**, Madison, v.40, p.91-98, 2000.
- ROHLF, F.J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York, 1992, 470p.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALLOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v.230, n.4732, p.1350-1354, Dec. 1985.
- SANTOS, J.B. dos; CASTANHEIRA, A.L.M.; F.; MELO, L.C. Emprego de marcadores RAPD na identificação de alelos de resistência a antracnose no feijão. In: **REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO**, 5, Goiânia, 1996. **Resumos ...** Goiânia: EMBRAPA/ CNPAF, 1996, v.1, p.263-264.

- SANTOS, J.B. dos; FERREIRA, D.F. Identificação do alelo *mex-2* de resistência à antracnose e do alelo para halo escuro em feijão através de marcador RAPD. *Brazilian Journal of Genetics*, Ribeirão Preto, v.19, n.3, p. 328, set. 1996. (Suplemento).
- SANTOS, J.B. dos; NIENHUIS, J.; SKROCH, P.; TIVANG, J.; SLOCUM, M.K. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining of genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.87, p.909-915, 1994.
- SARTORATO, A. RAVA. C.A. Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 300p.
- SILVA, M.V. da. Identificação de marcadores RAPD ligado ao alelo *Co-7* de resistência do feijão ao agente causal da antracnose. Lavras: UFLA, 2000. 41p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- SINGH, S.P.; PASTOR-CORRALES, M.A.; MOLINA, A.; OTOYA, M. Breeding common bean for resistance to anthracnose. In: PASTOR-CORRALES, M. (ed.). *La antracnosis del frijol común, Phaseolus vulgaris*, em America latina. Cali: CIAT, 1992. p.198-211. (Doc. de Trabajo, 113).
- SKROCH, P.W.; NIENHUIS, J. Impact of scoring errors and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.91, p.1086-1091, 1995a.
- SKROCH, P.W.; NIENHUIS, J. Qualitative and quantitative characterization of RAPD variation among snap bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.91, p.1078-1085, 1995.
- SKROCH, P.W.; SANTOS, J.B. dos; NIENHUIS, J. Genetic relationships among *Phaseolus vulgaris* genotypes based on RAPD marker data. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, Fort Collins, v.35, p.23-24, 1992.
- SKROCH, 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.



- SOKAL, R.R.; SNEATH, P.H.A. **Principles of numeric taxonomy**. San Francisco: W.H. Freeman, 1963. 359p.
- STAM, P.; ZEVEN, A.C. The theoretical proportion of the donor genome in near-isogenic lines of self-fertilizers bred by backcrossing. *Euphytica*, Wageningen, v.30, p.227-238, 1981.
- STAUB, J.E.; SERQUEN, F. Genetic Markers, map construction, and their application in plant breeding. *Hortscience*, Alexandria, v.31, n.5, p.729-741, 1996.
- TANKSLEY, V.H.; YOUNG, N.D.; PATERSON, A.H. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Biotechnology*, v.7, p.257-264, 1989.
- TINGEY, S.V.; RAFALSKI, J.A.; WILLIAMS, J.G.K. Genetic analysis with RAPD markers. In: **APPLICATIONS OF RAPD TECHNOLOGY TO PLANT BREEDING**, Minneapolis, 1992. **Proceedings...** Minneapolis: Crop Science Society of America, 1992. p.3-8.
- UTUMI, M.M. **Melhoramento genético da proteína da soja: eliminação de lipoxigenase das subunidades  $\alpha'$  e G4, uso de RAPD-PCR na seleção de genótipos e na identificação de marcadores ligados ao gene Cgy1**. Viçosa: UFV, 1996. 77p. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento)
- VASCONCELOS, M.J.V.; BARROS, E.G. de; MOREIRA, M.A.; VIEIRA, C. Genetic diversity of common bean *Phaseolus vulgaris* L. determined by DNA-based molecular markers. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, v.19, n.3, p.447-451, set. 1996.
- 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.
- VISSCHER, P.M.; HALEY, C.S.; THOMPSON, R. Marker-assisted introgression in backcross breeding programs. *Genetics*, Bethesda, v.144, p.1923-1932, 1996.
- WEEDEN, N.F.; TIMMERMAN, G.M.; HEMMAT, M.; KNEEN, B.E.; LOFHI, M.A. Inheritance and reliability of RAPD markers. In: **Applications of RAPD markers to plant breeding**, Minneapolis, 1992. **Proceedings ...** Minneapolis: Crop Science Society of America, 1992. p. 12-17.

- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Research*, Oxford, v.18, n.24, p.7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research*, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.
- YOUNG, N.D.; TANKSLEY, S.D. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the *Tm-2* locus of tomato during backcross breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.77, p.353-359, 1989.
- YOUNG, R.A.; MELOTTO, M.; NODARI, R.O.; KELLY, J.D. Marker-assisted dissection of oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar, G2333. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.96, n.1, p.87-94, Jan. 1998.
- YOUNG, R.A.; KELLY, J.D. Characterization of the genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean differential cultivars. *Plant Disease*, St. Paul, v.80, n.6, p.650-654, June 1996a.
- YOUNG, R.A.; KELLY, J.D. Gene pyramiding using markers assisted selection for stable resistance to bean anthracnose. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, Fort Collins, v.39, p.57-58, 1996b.
- YOUNG, R.; KELLY, J.D. RAPD markers linked to three major anthracnose resistance gene in common bean. *Crop Science*, Madison, v.37, n.3, p.940-946, May/June 1997.

## ANEXOS

	Página
TABELA 1A - Matriz de 0 e 1 obtido pelas bandas polimórficas RAPD entre as plantas de retrocruzamento e genitores.....	59
TABELA 2A - Resumo das análise de variância para os caracteres avaliados na safra da seca de 2000.....	67
TABELA 3A - Resumo das análise de variância para os caracteres avaliados na safra de inverno de 2000.....	67
TABELA 4A - Médias ajustadas para os caracteres fenotípicos avaliados nas famílias $F_{1;2}RC_2$ , $F_{2;3}RC_2$ <sup>(1)</sup> e $F_{1;2}RC_3$ <sup>(2)</sup> na safra da seca de 2000.....	68
TABELA 5A - Médias ajustadas para os caracteres fenotípicos avaliados nas famílias $F_{4;5}RC_1$ e dos genitores recorrentes na safra da seca de 2000.....	70
TABELA 6A - Médias ajustadas para os caracteres fenotípicos avaliados nas famílias $F_{1;3}RC_2$ , $F_{2;4}RC_2$ <sup>(1)</sup> e $F_{1;3}RC_3$ <sup>(2)</sup> na safra da inverno de 2000.....	72
TABELA 7A - Médias ajustadas para os caracteres fenotípicos avaliados nas famílias $F_{4;6}RC_1$ e nos genitores recorrentes na safra da inverno de 2000.....	74



















**TABELA 2A - Resumo da análise de variância para os caracteres avaliados na safra da seca de 2000.**

	GL	QM			
		Dias para florescimento	Reação à mancha angular (notas)	Produção (g/parcela)	Peso de 100 sementes (g)
Repetições	1	0,757	10,39	821,683	2,977
Tratamentos					
- Não ajustados	168	1,973**	0,689**	5102,958**	19,656**
- Ajustados	168	1,955**	0,666**	5409,223**	19,671**
Blocos dentro de repetições (adj.)	24	1,046	0,582	3946,113	3,342
Erro					
- Efetivo	144	0,833	0,386	2767,17	1,809
- DBC	168	0,841	0,398	2828,695	1,926
- Intrabloco	144	0,807	0,367	2642,459	1,69
CVe (%)		1,982	13,793	27,502	5,389
Eficiência do Latice		100,94	102,95	102,22	106,45
Média (aj.)		46,041	4,5055	191,275	24,960

\*\* Teste F significativo a 1% de probabilidade.

**TABELA 3A - Resumo da análise de variância para os caracteres avaliados na safra de inverno de 2000.**

	GL	QM			
		Dias para florescimento	Porte (notas)	Produção (g/parcela)	Peso de 100 sementes (g)
Repetições	2	17,757	0,33	26218,834	3,898
Tratamentos					
- Não ajustados	168	12,422**	0,893**	12260,342**	19,569**
- Ajustados	168	12,283**	0,836**	12210,232**	19,447**
Blocos dentro de repetições (adj.)	36	3,491	0,912	6932,643	3,113
Erro					
- Efetivo	300	1,818	0,217	3403,705	1,426
- DBC	336	1,914	0,277	3616,850	1,534
- Intrabloco	300	1,725	0,201	3218,955	1,344
CVe (%)		2,2948	13,7503	18,146	5,349
Eficiência do Latice		105,26	127,35	106,26	107,55
Média (aj.)		58,763	3,391	321,509	22,329

\*\* Teste F significativo a 1% de probabilidade.

TABELA 4A - Médias ajustadas para os caracteres fenotípicos avaliados nas famílias F<sub>1,2</sub>RC<sub>2</sub>, F<sub>2,3</sub>RC<sub>2</sub> <sup>(1)</sup> e F<sub>1,2</sub>RC<sub>3</sub> <sup>(2)</sup> na safra da seca de 2000.

Famílias	Dias para florescimento	Reação à P. griseola (notas)	Produção (g/Parcela)	Peso 100 sementes (g)	Marcador Co-7
7	46,85 b*	4,86 b	237,90 a	26,81 c	1
8	45,39 a	4,56 b	200,20 a	26,62 c	1
9	44,89 a	4,42 a	213,62 a	23,16 d	0
10	44,91 a	3,62 a	157,55 b	23,13 d	0
11	45,84 a	4,33 a	187,95 b	21,37 e	0
18	47,49 b	4,57 b	193,01 a	24,42 d	0
19	45,03 a	5,07 b	234,56 a	23,40 d	0
20	45,99 a	4,35 a	245,15 a	24,67 d	0
24	47,48 b	5,00 b	207,19 a	25,41 d	1
25	45,99 a	4,52 a	246,38 a	27,28 c	1
26	45,95 a	4,13 a	295,81 a	24,78 d	1
31	46,05 a	5,09 b	230,95 a	26,18 c	0
32	46,09 a	5,42 b	262,50 a	27,84 c	0
40	45,47 a	5,03 b	197,80 a	22,11 e	1
41	44,43 a	4,97 b	171,98 b	23,28 d	0
42	46,93 b	4,51 a	201,77 a	22,20 e	0
43	45,48 a	4,80 b	173,40 b	27,16 c	0
44	45,42 a	4,48 a	207,22 a	24,38 d	0
45	46,46 b	4,65 b	174,77 b	23,96 d	1
46	45,92 a	4,09 a	163,37 b	23,72 d	1
47	45,97 a	4,64 b	255,66 a	24,78 d	1
48	44,97 a	5,16 b	171,08 b	26,25 c	1
49	45,48 a	4,53 a	120,01 b	27,10 c	0
50	45,91 a	4,24 a	220,41 a	26,14 c	0
51	44,92 a	5,10 b	86,59 b	30,58 b	0
52	44,88 a	4,87 b	233,03 a	28,25 c	0
53	46,56 b	3,82 a	207,80 a	29,53 b	0
54	45,03 a	4,93 b	242,98 a	30,17 b	0
56	44,58 a	4,59 b	188,40 b	28,44 c	0
57	46,02 a	4,43 a	205,22 a	26,87 c	1
58	45,05 a	5,60 b	185,77 b	30,11 b	0
61	45,06 a	4,61 b	231,08 a	25,45 d	0
62	46,08 a	3,82 a	265,01 a	24,85 d	0
63	45,51 a	4,03 a	200,41 a	26,24 c	0
65	45,92 a	5,53 b	237,27 a	30,22 b	0
66	45,47 a	4,17 a	249,03 a	32,59 a	1
67	46,08 a	3,80 a	229,80 a	28,47 c	1
73	46,04 a	4,33 a	269,36 a	21,17 e	0
74	46,08 a	3,87 a	237,66 a	23,58 d	0
77	46,03 a	4,31 a	248,41 a	27,99 c	1
78	47,04 b	4,33 a	178,59 b	26,69 c	1
79	44,99 a	4,94 b	171,03 b	25,77 c	1
80	47,04 b	4,82 b	180,89 b	25,01 d	1
88	47,54 b	3,94 a	208,16 a	24,20 d	0
89	45,55 a	4,49 a	277,09 a	23,95 d	0
90	45,48 a	3,86 a	219,49 a	21,44 e	0
91	47,99 b	4,73 b	260,68 a	22,68 e	0
92	45,45 a	4,16 a	252,11 a	23,46 d	0
93	46,06 a	4,11 a	270,04 a	23,28 d	1
94	45,53 a	4,22 a	261,22 a	25,79 c	1

... continua ...

TABELA 4A, Cont.

Famílias	Dias para florescimento	Reação à P. griseola (notas)	Produção (g/Parcela)	Peso 100 sementes (g)	Marcador Co-7
95	46,53 b	4,43 a	235,00 a	28,08 c	1
99	45,52 a	4,85 b	135,60 b	31,53 a	0
105	45,97 a	3,96 a	175,27 b	25,26 d	0
106	45,01 a	4,62 b	152,56 b	26,62 c	0
107	44,97 a	4,73 b	171,74 b	29,31 b	0
113	47,51 b	3,72 a	167,41 b	23,50 d	1
114	47,01 b	4,08 a	246,83 a	26,38 c	1
115	47,53 b	3,78 a	227,76 a	22,84 d	1
118	45,92 a	4,80 b	219,78 a	25,34 d	0
119	46,04 a	4,60 b	237,96 a	24,34 d	0
120	45,50 a	4,87 b	233,14 a	22,91 d	0
121	45,00 a	3,58 a	197,92 a	25,04 d	0
130	46,49 b	4,34 a	202,75 a	28,14 c	0
131	45,45 a	5,28 b	204,19 a	26,62 c	0
132	45,49 a	5,34 b	255,11 a	25,90 c	1
133	45,46 a	4,12 a	214,30 a	24,69 d	1
134	46,46 b	3,99 a	187,08 b	25,61 d	1
135	45,01 a	4,78 b	276,71 a	26,06 c	1
137	46,48 b	4,45 a	296,08 a	29,59 b	1
138	46,45 b	5,24 b	178,68 b	27,25 c	1
139	47,49 b	3,94 a	275,97 a	24,20 d	1
140	48,49 b	4,80 b	206,39 a	23,38 d	1
141	48,01 b	4,01 a	271,32 a	23,49 d	1
142	45,94 a	5,22 b	203,72 a	25,20 d	1
146	45,94 a	4,10 a	196,85 a	23,33 d	1
147	47,44 b	4,64 b	171,63 b	25,70 c	1
148	46,49 b	4,26 a	180,26 b	27,37 c	1
149	46,43 b	4,44 a	267,09 a	26,94 c	0
150	46,97 b	4,61 b	125,63 b	26,85 c	1
151	45,93 a	4,56 b	205,23 a	24,61 d	0
153	45,47 a	5,12 b	276,94 a	27,20 c	1
154	45,99 a	4,32 a	246,87 a	24,37 d	1
156	46,89 b	4,17 a	221,89 a	27,22 c	1
157	46,08 a	5,01 b	188,26 b	25,64 d	1
158	46,04 a	4,79 b	227,44 a	21,42 e	1
159	45,54 a	4,17 a	288,22 a	25,35 d	1
160	45,60 a	3,78 a	181,86 b	25,37 d	1
163	45,04 a	4,92 b	237,83 a	28,20 c	1
100 <sup>1</sup>	46,06 a	5,72 b	171,90 b	22,06 e	1
152 <sup>1</sup>	45,47 a	4,43 a	187,52 b	28,51 c	0
37 <sup>2</sup>	46,04 a	5,52 b	238,14 a	23,99 d	1
60 <sup>2</sup>	45,06 a	4,09 a	262,66 a	28,61 c	0
75 <sup>2</sup>	45,58 a	4,72 b	158,08 b	25,46 d	0
76 <sup>2</sup>	46,60 b	5,59 b	237,01 a	24,38 d	1

\*Médias seguidas de mesma letra são semelhantes pelo teste de Scott-Knott, a nível de 5 % de probabilidade.

TABELA 5A - Médias ajustadas para os caracteres fenotípicos avaliados nas famílias F<sub>4-5</sub>RC<sub>1</sub> e dos genitores recorrentes na safra da seca de 2000.

Famílias	Dias para florescimento	Reação à P. griseola (notas)	Produção (g/Parcela)	Peso 100 sementes (g)	Marcador Co-7
1	48,89 b*	4,96 b	184,34 b	22,61 e	1
2	46,36 b	4,90 b	182,52 b	24,44 d	1
3	47,86 b	4,44 a	188,30 b	24,13 d	1
4	46,91 b	4,56 b	128,94 b	23,10 d	0
5	47,35 b	4,74 b	144,76 b	23,85 d	1
6	45,39 a	4,41 a	173,31 b	25,51 d	1
12	46,85 b	4,19 a	238,13 a	33,04 a	0
13	44,81 a	3,63 a	85,07 b	30,53 b	0
14	45,54 a	4,78 b	161,59 b	31,06 b	0
15	45,00 a	5,56 b	201,77 a	27,52 c	0
16	45,00 a	6,44 b	167,55 b	24,56 d	0
17	45,55 a	6,22 b	232,19 a	24,10 d	0
21	45,54 a	4,39 a	261,45 a	21,04 e	1
22	45,54 a	4,08 a	216,86 a	21,77 e	1
23	45,05 a	4,29 a	244,79 a	22,50 e	1
27	48,60 b	4,15 a	121,53 b	27,27 c	0
28	47,56 b	4,26 a	187,71 b	26,13 c	1
29	48,06 b	4,79 b	154,49 b	23,16 d	1
30	46,11 a	4,25 a	158,13 b	23,84 d	1
33	46,55 b	4,04 a	126,09 b	23,34 d	0
34	46,60 b	4,41 a	129,39 b	23,57 d	0
35	45,10 a	4,60 b	107,81 b	22,44 e	0
36	49,61 b	3,98 a	133,74 b	20,93 e	1
38	45,05 a	4,88 b	119,32 b	34,83 a	0
39	45,01 a	4,49 a	137,76 b	31,60 a	0
55	46,03 a	3,63 a	129,76 b	22,37 e	1
59	46,02 a	4,89 b	210,37 a	31,39 a	0
64	46,52 b	4,39 a	137,59 b	31,07 b	1
68	45,54 a	5,04 b	116,98 b	24,55 d	1
69	45,04 a	4,58 b	130,76 b	22,85 d	1
70	46,60 b	4,70 b	105,40 b	18,54 f	1
71	45,54 a	3,88 a	230,22 a	29,45 b	0
72	46,07 a	4,38 a	237,77 a	29,67 b	0
81	45,50 a	4,43 a	135,07 b	22,63 e	1
82	44,50 a	5,30 b	149,85 b	23,75 d	0
83	44,55 a	6,09 b	162,49 b	22,35 e	0
84	44,89 a	5,60 b	185,31 b	25,75 c	0
85	44,53 a	4,93 b	62,86 b	19,46 f	0
86	44,49 a	3,89 a	123,45 b	21,47 e	0
87	45,54 a	3,76 a	161,75 b	22,44 e	0
96	44,58 a	4,72 b	108,64 b	20,10 f	0
97	44,52 a	4,06 a	126,46 b	20,42 f	0
98	45,05 a	4,56 b	71,01 b	19,87 f	0
101	46,06 a	3,57 a	165,32 b	19,36 f	0
102	45,58 a	5,28 b	163,25 b	20,91 e	1
103	45,51 a	3,33 a	198,65 a	22,40 e	1
104	47,02 b	3,69 a	108,83 b	26,60 c	1
108	45,47 a	3,94 a	126,52 b	25,27 d	0
109	46,03 a	4,39 a	79,15 b	23,99 d	1
110	45,47 a	4,24 a	179,98 b	25,21 d	0
111	46,50 b	3,90 a	280,52 a	22,22 e	1
112	46,47 b	3,68 a	126,12 b	21,27 e	1

... continua ...

TABELA 5A, Cont.

Famílias	Dias para florecimento	Reação à <i>P.</i> <i>griseola</i> (notas)	Produção (g/Parcela)	Peso 100 sementes (g)	Marcador Co-7
116	46,96 b	5,00 b	183,16 b	24,13 d	1
117	46,47 b	4,85 b	202,34 a	23,70 d	1
122	47,05 b	3,54 a	159,56 b	24,22 d	1
123	44,99 a	3,88 a	213,38 a	25,43 d	1
124	45,53 a	3,88 a	221,93 a	22,25 e	1
125	45,99 a	4,84 b	189,52 b	19,09 f	0
126	47,04 b	5,21 b	266,82 a	20,07 f	0
127	46,04 a	5,39 b	222,24 a	21,15 e	0
128	45,05 a	3,60 a	165,17 b	22,33 e	1
129	45,98 a	4,14 a	177,57 b	22,38 e	1
136	46,95 b	3,95 a	192,53 a	27,05 c	0
143	47,45 b	3,41 a	120,90 b	20,08 f	1
144	49,40 b	3,35 a	118,34 b	21,98 e	1
145	46,47 b	4,83 b	154,67 b	23,34 d	1
155	46,43 b	4,90 b	109,45 b	23,15 d	1
161	45,04 a	3,80 a	182,68 b	32,56 a	0
162	46,57 b	4,29 a	120,23 b	25,15 d	0
164	47,58 b	4,29 a	111,12 b	18,89 f	0
165	47,58 b	3,81 a	141,54 b	19,06 f	0
166	46,10 a	4,68 b	189,47 b	18,82 f	0
167	45,03 a	5,56 b	162,87 b	27,18 c	0
C1140	46,04 a	4,76 b	83,05 b	23,43 d	0
ESAL696	46,99 b	4,52 a	243,49 a	23,89 d	0

\*Médias seguidas de mesma letra são semelhantes pelo teste de Scott-Knott, a nível de 5 % de probabilidade.



TABELA 6A - Médias ajustadas para os caracteres fenotípicos avaliados nas famílias F<sub>1,3</sub>RC<sub>2</sub>, F<sub>2,4</sub>RC<sub>2</sub> <sup>(1)</sup> e F<sub>1,3</sub>RC<sub>3</sub> <sup>(2)</sup> na safra da inverno de 2000.

Família	Dias para Florescimento	Porto (notas)	Produção (g/parcela)	Peso 100 sementes (g)	Tipo de Grão™	Marcador do Co-7
7	59,41b*	3,27b	350,32a	22,58e	2,5	1
8	58,59b	3,39b	367,03a	22,31e	2,5	1
9	56,90a	3,32b	340,69a	20,84e	2	0
10	56,85a	3,60c	305,19b	20,25f	3	0
11	59,52b	3,78c	356,29a	19,59f	3	0
18	57,24a	3,55c	388,30a	23,14d	3,5	0
19	56,44a	2,95b	410,20a	22,91d	4,5	0
20	58,54b	3,42b	416,25a	24,04d	3,5	0
24	60,50c	3,99c	314,14b	22,06e	3	1
25	58,57b	2,78a	435,24a	23,35d	2,5	1
26	60,31c	3,37b	425,89a	22,14e	2	1
31	58,30b	3,04b	360,41a	22,88d	3	0
32	59,72b	3,74c	338,16a	22,87d	2,5	0
40	58,04b	2,99b	411,63a	20,90e	4	1
41	57,07a	3,00b	364,01a	21,73e	2	0
42	63,28d	3,20b	427,57a	19,68f	3	0
43	55,87a	3,97c	282,92b	23,83d	4,5	0
44	57,24a	3,15b	368,88a	22,50e	3	0
45	54,77a	3,43b	314,88b	22,27e	4,5	1
46	57,41a	3,28b	313,37b	21,42e	3	1
47	60,91c	3,32b	367,24a	21,25e	4,5	1
48	56,27a	3,96c	335,67a	22,60d	3	1
49	57,27a	3,88c	391,93a	22,45e	5	0
50	56,93a	2,91a	322,66a	22,98d	4	0
51	56,28a	2,66a	256,85b	27,89b	4	0
52	57,27a	3,71c	440,16a	25,08d	3,5	0
53	58,11b	2,72a	355,78a	22,37e	4,5	0
54	58,27b	3,44b	332,99a	24,17d	4	0
56	58,74b	3,66c	318,41a	22,87d	4	0
57	58,13b	4,04c	343,16a	22,39e	1,5	1
58	59,20b	3,35b	242,14b	24,26d	4	0
61	59,02b	3,69c	341,61a	22,25e	4,5	0
62	59,17b	3,22b	282,17b	22,08e	3	0
63	59,35b	3,29b	394,51a	23,03d	4	0
65	57,55a	3,36b	384,48a	27,84b	3	0
66	57,59a	3,43b	390,25a	26,14b	2	1
67	59,21b	3,40b	332,62a	25,00d	4,5	1
73	58,08b	3,18b	271,26b	19,57f	2	0
74	60,98c	3,38b	349,79a	19,68f	4,5	0
77	57,37a	3,54c	334,57a	23,21d	3	1
78	57,21a	3,52c	289,01b	22,99d	4	1
79	58,39b	3,39b	330,65a	23,30d	3	1
80	60,49c	3,24b	353,62a	21,52e	3,5	1
88	57,87b	3,00b	410,96a	23,02d	3,5	0
89	58,53b	3,61c	390,84a	22,65e	4,5	0
90	60,26c	3,41b	283,48b	19,05f	4	0
91	59,30b	3,60c	426,21a	22,80d	4,5	0
92	58,25b	3,68c	358,28a	19,02f	3,5	0
93	59,06b	2,25a	271,12b	21,30e	1,5	1
94	59,27b	3,12b	404,31a	22,24e	4	1

... Continua ...

TABELA 6A, Cont.

Família	Dias para Florescimento	Porte (notas)	Produção (g/parcela)	Peso 100 sementes (g)	Tipo de Grão**	Marcador do Co-7
95	58,11b	3,76c	299,50b	23,78d	4,5	1
99	56,51a	3,09b	244,26b	28,06b	4,5	0
105	58,84b	3,13b	309,93b	21,44e	3	0
106	56,94a	3,74c	305,06b	24,89d	3,5	0
107	56,19a	3,67c	358,77a	23,64d	2,5	0
113	58,06b	4,07c	398,05a	20,79e	2,5	1
114	58,41b	3,28b	318,60a	23,29d	3,5	1
115	59,07b	3,93c	372,92a	21,04e	4	1
118	55,99a	3,40b	353,80a	23,97d	3,5	0
119	58,81b	3,30b	286,56b	20,31f	2,5	0
120	57,59a	3,76c	317,90a	19,78f	2,5	0
121	56,29a	3,50c	343,55a	19,61f	3	0
130	58,58b	3,19b	366,88a	24,00d	3	0
131	56,59a	3,53c	345,33a	24,06d	4	0
132	59,40b	3,35b	359,99a	22,48e	3	1
133	58,65b	3,10b	377,63a	21,08e	3,5	1
134	57,88b	2,72a	352,91a	22,71e	1,5	1
135	59,72b	2,90a	402,63a	21,49e	1,5	1
137	59,45b	3,04b	371,85a	22,60e	2	1
138	59,64b	3,62c	354,27a	22,61e	3,5	1
139	58,89b	2,74a	321,67a	22,95d	2	1
Pérola***	60,99c	3,73c	400,81a	21,74e	3	1
141	61,87c	3,78c	343,23a	19,49f	1,5	1
142	58,79b	3,42b	305,85b	22,16e	3	1
146	58,42b	3,38b	270,17b	22,36e	3	1
147	58,13b	3,95c	353,08a	22,27e	3	1
148	57,49a	3,34b	379,08a	22,68e	4	1
149	58,37b	2,83a	358,16a	23,59d	2	0
150	57,41a	3,25b	380,77a	25,15d	3,5	1
151	58,07b	3,11b	362,35a	21,49e	2	0
153	58,80b	3,06b	335,43a	23,72d	2	1
154	60,75c	3,20b	339,98a	20,45e	2	1
156	59,07b	3,01b	356,75a	23,94d	1,5	1
157	58,68b	3,11b	372,65a	24,85d	2	1
158	57,82b	3,47c	423,41a	22,48e	2,5	1
159	57,61a	3,61c	481,80a	23,50d	3,5	1
160	59,31b	3,10b	371,29a	23,12d	2	1
163	57,97b	2,62a	345,43a	24,49d	3	1
100 <sup>1</sup>	59,06b	3,40b	312,02b	19,44f	5	1
152 <sup>1</sup>	56,77a	3,08b	302,58b	26,41c	4,5	0
37 <sup>2</sup>	56,96a	3,96c	302,06b	23,28d	2	1
60 <sup>2</sup>	59,34b	3,28b	472,80a	25,24d	3	0
75 <sup>2</sup>	57,11a	2,67a	342,25a	21,96e	2	0
76 <sup>2</sup>	59,78b	3,86c	282,22b	21,75e	2,5	1

\*Médias seguidas de mesma letra são semelhantes pelo teste de Scott-Knott, a nível de 5 % de probabilidade.

\*\* Para o tipo de grão não foi usada repetições.

\*\*\* Devido à perda das sementes da família 140 (F<sub>1,2</sub>RC<sub>2</sub>) esta foi substituída pela cultivar Pérola.

TABELA 7A - Médias ajustadas para os caracteres fenotípicos avaliados nas famílias  $F_{4,6}RC_1$  e nos genitores recorrentes na safra da inverno de 2000.

Família	Dias para Florescimento	Porte (notas)	Produção (g/parcela)	Peso 100 sementes (g)	Tipo de Grão™	Marcador do Co-7
1	63,92d	3,77c	355,63a	19,31f	2,5	1
2	63,26d	3,00b	345,04a	20,47e	4	1
3	59,17b	4,05c	390,02a	21,62e	2	1
4	58,08b	3,17b	373,02a	21,90e	5	0
5	58,92b	3,78c	285,23b	19,88f	5	1
6	59,80b	3,59c	280,89b	21,88e	2,5	1
12	63,14d	2,20a	339,22a	27,55b	4,5	0
13	55,95a	2,29a	198,16c	26,42c	4,5	0
14	56,69a	3,60c	260,83b	28,87b	4,5	0
15	56,39a	3,03b	326,69a	26,40c	5	0
16	56,16a	2,95b	304,32b	24,41d	5	0
17	55,86a	2,65a	282,57b	22,28e	5	0
21	58,57b	2,75a	333,93a	19,20f	5	1
22	59,60b	3,73c	229,77b	19,68f	5	1
23	59,03b	3,56c	279,89b	19,66f	5	1
27	61,88c	3,36b	321,11a	23,69d	4,9	0
28	62,43c	3,37b	306,45b	23,78d	5	1
29	58,24b	4,16c	313,20b	20,73e	5	1
30	58,80b	3,56c	312,76b	24,25d	4,5	1
33	59,13b	2,63a	294,46b	21,51e	5	0
34	60,32c	2,24a	281,09b	21,39e	5	0
35	63,53d	4,77d	158,56c	20,13f	5	0
36	64,67e	3,81c	300,53b	20,07f	5	1
38	56,16a	3,33b	251,65b	31,90a	4,5	0
39	56,68a	2,80a	245,79b	27,15c	4,5	0
55	65,74e	3,47c	293,59b	18,93f	5	1
59	59,28b	3,28b	265,21b	27,22c	4,5	0
64	59,74b	3,93c	300,57b	28,33b	3	1
68	57,81b	3,31b	359,38a	22,11e	5	1
69	58,07b	3,83c	327,25a	20,57e	5	1
70	59,86b	4,45d	233,47b	20,79e	5	1
71	57,63a	3,80c	358,91a	24,42d	4,5	0
72	57,91b	3,27b	382,62a	24,78d	3,5	0
81	58,55b	3,56c	295,54b	20,00f	5	1
82	57,26a	2,96b	332,91a	24,90d	5	0
83	56,66a	3,09b	246,50b	22,29e	5	0
84	55,83a	3,51c	251,75b	24,12d	5	0
85	56,80a	4,01c	159,92c	19,30f	2,5	0
86	58,18b	5,13d	89,20d	21,35e	4	0
87	66,52e	5,07d	233,65b	19,19f	4,5	0
96	57,63a	4,44d	178,82c	18,27g	4	0
97	61,73c	4,87d	67,55d	18,96f	4,5	0
98	58,78b	4,78d	139,19c	19,39f	3,5	0
101	60,86c	3,24b	310,59b	18,26g	4	0
102	60,40c	3,32b	260,65b	20,05f	5	1
103	57,79b	3,37b	373,87a	20,68e	5	1
104	60,30c	3,35b	288,89b	25,11d	5	1
108	56,18a	3,03b	283,91b	22,33e	5	0
109	58,16b	3,95c	213,83c	20,80e	5	1
110	57,39a	3,25b	270,81b	21,57e	5	0
111	60,36c	2,67a	275,29b	21,66e	5	1
112	58,50b	3,06b	318,51a	21,04e	5	1

... continua ...

TABELA 7A, Cont.

Família	Dias para Florescimento	Porto (notas)	Produção (g/parcela)	Peso 100 sementes (g)	Tipo de Grão**	Marcador do Co-7
116	58,67b	3,62c	273,31b	22,45e	5	1
117	58,84b	3,85c	279,58b	22,05e	5	1
122	58,75b	2,81a	358,41a	20,85e	5	1
123	58,44b	3,36b	298,69b	20,61e	5	1
124	59,20b	2,82a	300,87b	20,51e	5	1
125	62,27c	3,38b	297,13b	17,15g	4,5	0
126	64,59e	3,30b	375,48a	16,53g	5	0
127	56,95a	3,04b	235,81b	17,58g	3,5	0
128	58,14b	3,57c	323,78a	20,38f	5	1
129	59,19b	3,17b	307,09b	20,96e	2	1
136	57,22a	2,34a	281,18b	25,03d	5	0
143	62,29c	4,69d	208,89c	18,56g	5	1
144	64,15d	4,09c	320,44a	19,74f	5	1
145	57,84b	3,54c	263,29b	22,56e	5	1
155	59,70b	3,86c	237,74b	24,09d	5	1
161	56,15a	2,78a	287,59b	29,28b	5	0
162	58,89b	2,65a	338,29a	24,23d	5	0
164	60,78c	3,52c	336,95a	17,91g	4,5	0
165	59,61b	3,90c	305,00b	17,47g	4,5	0
166	57,43a	2,94b	319,68a	17,19g	4,5	0
167	56,31a	2,41a	303,61b	25,17d	3,5	0
ESAL696	61,40c	1,99a	350,30a	21,76e	3,5	0
CH140	58,00b	3,98c	318,84a	22,49e	1	0

\*Médias seguidas de mesma letra são semelhantes pelo teste de Scott-Knott, a nível de 5 % de probabilidade.

\*\* Para o tipo de grão não foi usada repetições