

**MARCADORES RAPD NA AVALIAÇÃO DO  
POTENCIAL DE MÉTODOS DE CONDUÇÃO  
DE POPULAÇÃO SEGREGANTE DE FEIJÃO**

**ANA LUIZA MONTEIRO CASTANHEIRA**

**2001**

51247  
MAY 36 194

ANA LUIZA MONTEIRO CASTANHEIRA

DESCARTADO

F.V.A.

ASSINATURA

Data 09 / 11 / 17

BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA  
UFLA

**MARCADORES RAPD NA AVALIAÇÃO DO  
POTENCIAL DE MÉTODOS DE CONDUÇÃO DE  
POPULAÇÃO SEGREGANTE DE FEIJÃO**



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

Orientador

Prof. Dr. João Bosco dos Santos

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2001



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

**Castanheira, Ana Luiza Monteiro**

**Marcadores RAPD na avaliação do potencial de métodos de condução de  
população segregante de feijão / Ana Luiza Monteiro Castanheira. – Lavras :  
UFLA, 2001.**

**76 p. : il.**

**Orientador: João Bosco dos Santos.**

**Dissertação (Mestrado) – UFLA.**

**Bibliografia.**

**1. Feijão. 2. Marcador molecular. 3. Melhoramento genético. 4. RAPD. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.**

**CDD-635.6523**

**ANA LUIZA MONTEIRO CASTANHEIRA**

**MARCADORES RAPD NA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
DE MÉTODOS DE CONDUÇÃO DE POPULAÇÃO  
SEGREGANTE DE FEIJÃO**

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

**APROVADA em 24 de Janeiro de 2001**

**Prof. Dr. Antônio Nazareno Guimarães Mendes**      **UFLA**

**Prof. Dr. Magno Antônio Patto Ramalho**      **UFLA**

  
**Prof. Dr. João Bosco dos Santos**

**UFLA**

**(Orientador)**

**LAVRAS**

**MINAS GERAIS - BRASIL**

**Aos meus pais Eduardo e Nina, e a meus irmãos  
Maria Eugênia e Luiz Fernando pelo amor que nos  
une, compreensão, carinho e incentivo presentes em  
todas as etapas de minha vida,**

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

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

Ao CNPq pela concessão de bolsa de estudos.

Ao professor João Bosco dos Santos, pela paciência, pelos ensinamentos transmitidos, apoio, amizade e confiança demonstrados durante todos esses anos.

Aos professores do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, em especial aos professores do curso de genética, Magno, César, Lisete, Elaine e João Cândido pela amizade e ensinamentos transmitidos.

Ao doutorando Francislei Vitti Raposo, pela valiosa colaboração na realização deste trabalho.

Aos meus amigos Leonardo Cunha Melo e Jair Moura Duarte, que muito me transmitiram em nossos anos de convivência.

À doutoranda e amiga Maria Cristina Duarte Rios, por seu apoio, paciência e amizade durante esses anos.

Ao Lamartine, que foi de grande importância e ajuda durante à condução deste trabalho.

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

Aos amigos do curso de Genética e Melhoramento de Plantas.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, pelos auxílios prestados.

A todos que não foram citados, mas nem por isso esquecidos, que colaboraram para a realização desse trabalho.

# SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 Métodos de melhoramento do feijoeiro.....	03
2.2 Métodos de condução das populações segregantes.....	04
2.2.1 Método genealógico.....	05
2.2.2 Método da população.....	07
2.2.3 Método descendentes de uma única semente.....	09
2.2.4 Método “bulk” dentro de famílias.....	10
2.3 Eficiência dos métodos de condução das populações segregantes.....	11
2.4 Marcadores moleculares.....	12
2.5 Avaliação da divergência genética por meio de marcadores RAPD.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Extração de DNA.....	19
3.2 Processo de amplificação de DNA e eletroforese.....	20
3.3 Análise dos dados moleculares e obtenção das similaridades genéticas..	22
3.4 Comparação entre marcadores RAPD e produção de grãos das famílias.	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5 CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
ANEXOS.....	62

## RESUMO

**CASTANHEIRA, Ana Luiza Monteiro. Marcadores RAPD na avaliação do potencial de métodos de condução de população segregante de feijão. Lavras: UFLA, 2001. 76p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)\***

Visando identificar o potencial dos métodos de condução da população segregante de feijão em liberar variabilidade por meio de marcadores RAPD, foram utilizadas 56 famílias geradas pelo método genealógico, 55 pelo método da população, 61 pelo método "bulk" dentro de famílias  $F_2$ , 58 pelo método "bulk" dentro de famílias  $F_3$  e 62 pelo descendência de uma única semente (SSD), selecionadas na geração  $F_5$  da população Carioca x Flor de Mayo. Além das famílias de cada método foram incluídos também os genitores e a cultivar Pérola como testemunha. Procedeu-se a extração do DNA, de 16 plantas de cada família, que foi utilizado na reação de RAPD. Nessa reação foram utilizados 23 primers, que amplificaram fragmentos de DNA associados a alguns locos dos caracteres produção de grãos, peso de 100 sementes, dias para o florescimento e reação aos agentes causais do oídio e mancha angular. A partir de 42 bandas polimórficas entre as famílias, nos cinco métodos de condução, foram estimadas as similaridades genéticas por meio do coeficiente de Dice. Elas foram agrupadas pelo método das médias (UPGMA) e representadas em dendrogramas, e também pela escala multidimensional. O método da população foi o mais eficiente em liberar variabilidade, seguido em ordem decrescente, pelo método do "bulk" dentro de famílias  $F_2$ , SSD, "bulk" dentro de famílias  $F_3$  e genealógico. O método da população permitiu também a seleção de algumas famílias com maiores similaridades, em relação à cultivar Carioca, que é uma das mais adaptadas na região.

---

\* Comitê Orientador: Prof. Dr. João Bosco dos Santos - UFLA (Orientador).

## ABSTRACT

**CASTANHEIRA, Ana Luiza Monteiro. Potential of some self-pollinated inbreeding methods to liberate genetic variability from a segregating population of common bean as determined by RAPD markers. Lavras: UFLA, 2001. 76p. (Dissertation - Master in Plant Genetics)\***

Aiming to identify the potential of some inbreeding methods for liberating genetic variability as determined by RAPD markers, 56 families generated by pedigree procedure, 55 by bulk, 61 by bulk within F<sub>2</sub> families, 58 by bulk within F<sub>3</sub> families and 62 by single seed descendent, were used after their selection at F<sub>5</sub> generation, plus the parents Carioca and Flor de Mayo and the test cultivar Pérola. DNA extraction was set up from 16 plants per family and used in RAPD reaction. There were used 22 Operon primers that amplified DNA fragments linked to some loci of grain yield, 100 seed weight, number of days to flowering, and reaction of the causal agents of oidium and angular leaf spot. 42 polymorphic bands were amplified among the families and between the parents, and were used to estimate the genetic similarities between every pair of genotypes in each inbreeding method, according to Dice procedure. The similarities were grouped by UPGMA procedure and represented in a tree. The genetic similarities were also grouped by multidimensional scaling. The bulk method was the most efficient to liberate genetic variability, followed by bulk within F<sub>2</sub> families, SSD, bulk within F<sub>3</sub> families and pedigree. The bulk method also generated some families with the highest similarities in relation to the Carioca cultivar, wich is one of most adapted genotype in the region.

---

\* Guidance Committee: Prof. Dr. João Bosco dos Santos (Major Professor).

# 1 INTRODUÇÃO

No melhoramento do feijoeiro por meio da hibridação, o sucesso no final do programa, depende da média do caráter e da magnitude da variabilidade gerada pelas populações segregantes. A magnitude dessa variabilidade é função da diversidade genética dos genitores e, também, dos métodos de condução das populações segregantes. Portanto, a escolha adequada dos genitores e também do método, pelo qual será conduzida a população segregante, asseguram a obtenção de linhagens superiores com a seleção.

Dentre os vários métodos para condução da população segregante, geralmente são preferencialmente empregados o método genealógico (pedigree), método da população (bulk), descendência de uma única semente (SSD – Single Seed Descendent) e “bulk” dentro de famílias  $F_2$  e  $F_3$ .

A escolha do método mais eficiente de condução das populações segregantes pode ser feita por meio da avaliação da variabilidade das linhagens após o avanço da população por várias gerações. Embora seja esse o procedimento em que se avalia a variabilidade real liberada pelos diferentes procedimentos de condução e, para cada caráter de interesse, ele possui a desvantagem de demandar muito trabalho experimental. Uma alternativa é avaliar a variabilidade liberada pelos diferentes procedimentos de condução, por meio de diversidade genética entre linhagens.

A diversidade genética pode ser determinada sem a necessidade de avaliação experimental, a partir do emprego de um marcador molecular, como o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams et al., 1990). Entretanto, é necessário verificar se a variabilidade das populações, identificada por meio do marcador, é correspondente à variabilidade real, avaliada a partir de

um ou mais caracteres de interesse. Alguns estudos que correlacionaram a similaridade genética determinada por meio de marcadores moleculares, com a diversidade fenotípica, mostraram que os marcadores são eficientes para prever a diversidade genética, quando se consideram vários caracteres agronômicos, mas não o é, quando se considera apenas a produtividade de grãos (Duarte, 1998; Machado, 1999), sugerindo que a variabilidade medida pela produtividade é uma parcela muito pequena da variação genética total. Entretanto, existem resultados indicando que a variabilidade avaliada pelos marcadores é correlacionada com a produtividade em milho e soja (Ajmone Marsan et al., 1997; Barroso, 2000).

O objetivo deste trabalho foi verificar se a similaridade genética entre as famílias, provenientes de diferentes métodos de condução de população segregante, obtida por meio de marcadores RAPD, indica a variabilidade de produção de grãos das famílias.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Métodos de melhoramento do feijoeiro

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma planta tipicamente autógama onde, devido à ocorrência de cleistogamia (a polinização acontece no momento ou pouco antes da antese), a autofecundação torna-se o sistema quase obrigatório de reprodução. O processo de fecundação cruzada também ocorre, principalmente, devido a insetos que visitam as flores, mas sua taxa também pode ser afetada devido às condições ambientais. Em diversas oportunidades, estimou-se essa taxa, como sendo inferior a 5% (Junqueira Neto e Lasmar Filho, 1971; Ortega, 1974; Pereira Filho e Cavarani, 1984; Ramalho, Santos e Zimmermann, 1993; Marques Júnior e Ramalho, 1995). Dessa forma, para o melhoramento do feijoeiro comum, são empregados métodos comumente usados em plantas autógamas, como a introdução de linhagens, a seleção de linhas puras e o melhoramento por hibridação (Fehr, 1987; Fouilloux e Bannerot, 1988).

A introdução de linhagens e/ou cultivares, de outros programas de melhoramento, gera a disponibilidade imediata de tipos geneticamente superiores, no entanto, elas podem ser mal adaptadas (Abreu, 1997).

Produtores de feijão, geralmente, não adquirem sementes, utilizando os grãos colhidos, como sementes. Uma vez que o fazem por muitas gerações, os cruzamentos naturais, misturas mecânicas e mutações, são mecanismos que acumulam variabilidade nas culturas. Essas populações constituem materiais promissores à seleção, pois são altamente adaptadas à região, além de

possuírem o tipo de grão que atende às exigências do consumidor (Ramalho, Santos e Zimmermann, 1993; Abreu, 1997). Esse método é denominado de seleção de linhas puras e já deu origem a várias cultivares importantes, sendo o principal destaque, a cultivar Carioca (Almeida, Leitão Filho, Miyasaka, 1971).

O melhoramento por hibridação é o método que tem sido mais freqüentemente empregado no melhoramento do feijoeiro. Hibridação é a fusão de gametas de indivíduos diferentes, o que resulta em indivíduos híbridos heterozigóticos para um ou mais locos, ou seja, seu objetivo é combinar em um mesmo indivíduo, dois ou mais fenótipos desejáveis, que se encontram em linhagens diferentes (Allard, 1971; Fehr, 1987; Borém, 1997).

Em um programa de melhoramento por hibridação, existem algumas decisões fundamentais a serem tomadas. A primeira delas é a escolha dos genitores, considerada a decisão mais importante do melhorista, uma vez que o sucesso do programa está diretamente relacionado à escolha criteriosa do material a ser cruzado. A escolha dos genitores depende de diversos fatores, entre eles, dos caracteres a serem melhorados, o tipo de herança dos caracteres e da fonte de germoplasma disponível. Posteriormente, escolhe-se o esquema de cruzamento, a fim de se obter a população segregante, ou seja, deve-se definir qual a proporção desejada dos alelos de cada um dos genitores. Finalmente, deve-se definir qual o melhor método para condução das populações segregantes (Fehr, 1987; Ramalho, Santos e Zimmermann, 1993; Borém, 1997). Esse último passo será considerado nesta revisão.

## **2.2 Métodos de condução das populações segregantes**

A condução das populações segregantes é considerada a fase mais crítica, trabalhosa e onerosa de um programa de melhoramento (Mallmann et al.,

1994; Almeida, Kihl e Abdelnoor, 1997), embora a avaliação das famílias também seja considerada bastante laboriosa e seu objetivo é selecionar, no final do processo, genótipos homozigóticos, em todos os locos (linhagens), com alelos favoráveis no maior número de locos (Abreu, 1997). Fouilloux e Bannerot (1988) classificaram esses métodos de condução de populações segregantes, em duas categorias distintas. A primeira categoria é aquela que não separa as fases de endogamia e seleção e já a partir da geração F<sub>2</sub>, quando já existe variabilidade, inicia-se à seleção, que continua no decorrer das sucessivas gerações de endogamia. Um método que se inclui nessa categoria é o genealógico (pedigree). A segunda categoria é aquela que separa essas duas fases, ou seja, a seleção só se inicia após a maioria dos locos estar em homozigose e, nessa categoria, incluem-se os métodos da população (bulk), descendência de uma única semente (SSD – Single Seed Descendent) e o método do “bulk” dentro de famílias (Ramalho, Santos e Zimmermann, 1993).

Nem sempre é fácil decidir qual método de condução de população segregante usar e, por isso, alguns trabalhos têm sido realizados, visando comparar esses métodos, como os citados por Raposo (1999): Voigt e Weber (1960), Fasoulas (1973), Boerma e Cooper (1975), Tee e Qualset (1975), Cruz, Carvalho e Federizzi (1983), Obiesan (1992), Mallmann et al. (1994), Mishra, Singh e Rao (1994), Urrea e Singh (1994), Gil et al. (1995), Ranalli et al. (1996), Inagaki et al. (1998), Singh et al. (1998).

### 2.2.1 Método Genealógico

O método genealógico, também descrito como método do pedigree, foi proposto por Hjalman Nilson, mas foi Love (1927), o primeiro a apresentar uma descrição completa do método (Borém, 1997; Raposo, 1999).

O princípio do método genealógico é a seleção individual de plantas, na população segregante, bem como, a avaliação de cada progênie separadamente. Os indivíduos selecionados são avaliados pelo teste de progênie e, desta forma, a seleção é feita, baseando-se no genótipo desses indivíduos. O método inicia-se a partir de uma geração  $F_2$ , que deve ser conduzida em condições representativas de cultivo. As plantas  $F_2$ , que se apresentam fenotipicamente superiores, são selecionadas e, os descendentes de cada uma, constituem uma família  $F_{2,3}$ , que é semeada em linha. Nesta geração procede-se à avaliação das famílias superiores e das melhores plantas dentro dessas famílias. Cada planta  $F_{2,3}$ , selecionada, será conduzida, em fileira, na próxima geração ( $F_{3,4}$ ). O processo se repete nas demais gerações, até que se atinja o nível esperado de homozigose, em geral em  $F_5$  ou  $F_6$ . Ao final do processo colhem-se as linhagens individualmente e elas serão então avaliadas em experimentos com repetição (Ramalho, Santos e Zimmermann, 1993; Borém, 1997).

Nesse método, faz-se anotações a cada etapa, ou seja, obtém-se um registro de genealogia de cada linha, com isso podem-se identificar os ancestrais das plantas selecionadas e estabelecer o grau de parentesco entre elas (Ramalho, Santos e Zimmermann, 1993; Borém, 1997).

A cada geração de autofecundação libera-se variabilidade do cruzamento. A variabilidade entre famílias aumenta e dentro de famílias diminui. Por isso, no método Genealógico, só se justifica a seleção dentro de famílias até a geração  $F_5$  (Ramalho, Santos e Zimmermann, 1993).

Esse método é, provavelmente, o mais empregado pelos melhoristas de plantas autógamas e apresenta uma série de vantagens, tais como, controle do grau de parentesco entre as seleções, descarte de indivíduos inferiores em gerações precoces e utilização de dados obtidos para estudos genéticos. Porém, o método apresenta algumas desvantagens, que são: a exigência de uma elevada demanda de mão-de-obra e campo experimental, principalmente com a

identificação de cada planta selecionada. A principal desvantagem, porém, é o fato de que a seleção é feita apenas visualmente, o que requer pessoal altamente qualificado, além de caracteres de alta herdabilidade e pouco influenciados pelo ambiente, para que o método se mostre eficiente (Patiño e Singh, 1989; Silva et al., 1994; Borém, 1997; Cutrim, Ramalho e Carvalho, 1997). Sobretudo, vale lembrar que a grande parcela de trabalho, para identificação da genealogia de cada planta, não resulta em grande benefício prático, já que o principal objetivo é a seleção de linhagens que reunam os fenótipos desejáveis.

### 2.2.2 Método da população

Também conhecido como método do “bulk”, foi inicialmente proposto por Nilson-Ehle, em 1908, na Suécia, para a cultura do trigo. Nilson-Ehle percebeu que o método permitia o cultivo de grandes populações, sem muito esforço, aumentando assim, a oportunidade de se selecionarem plantas de trigo com alta produtividade (Alberini, 1977). Esse método encontra-se descrito em, praticamente, todos os compêndios de métodos de melhoramento, sendo alguns deles por Elliott (1958), Briggs e Knowles (1967), Allard (1971), Fehr (1987), Ramalho, Santos e Zimmermann, (1993) e Borém, (1997).

O desenvolvimento do método inicia-se com o cruzamento de dois ou mais genitores selecionados, conforme os objetivos do programa. As plantas  $F_1$  são conduzidas de forma a produzir muitas sementes. As sementes  $F_2$  são agrupadas e utilizadas para a obtenção da população  $F_2$ , que deve ser tão grande quanto possível. Colhem-se sementes  $F_3$  em um só lote e elas serão utilizadas para se obter a geração seguinte. O procedimento é repetido até que se obtenha o nível de homozigose desejado - geralmente até  $F_6$  ou  $F_7$ , dependendo do melhorista e da natureza do cruzamento. Assim, o método baseia-se na

associação entre a capacidade de competição ou agressividade dos indivíduos e a produtividade, pois as gerações segregantes submetem seus integrantes a uma competição, devido à pressão da seleção natural, havendo pequena ou nenhuma seleção artificial (Florell, 1929; Briggs e Knowles, 1967; Borém, 1997).

A seleção natural, dependendo do caráter, pode atuar na direção desejada pelos melhoristas, segundo o relatado em alguns trabalhos (Allard, 1988; Corte, Ramalho e Abreu, 1997; Corte, 1999; Gonçalves, 2000). Durante a condução das gerações segregantes em “bulk”, é recomendado praticar seleção artificial, em caracteres de alta herdabilidade, ajudando assim, a atuação da seleção natural. Exemplos do efeito da seleção natural em feijão seriam a eliminação de alguns fenótipos, como sementes grandes e plantas de hábito I, embora, aparentemente, a seleção natural seja neutra para resistência a doenças (Gonçalves, 2000).

As principais vantagens do método são a economia de mão-de-obra na condução da população segregante, o baixo custo, a possibilidade de condução de um grande número de populações com maior facilidade, aumento da proporção de indivíduos mais adaptados e competitivos. O presente método se presta praticamente para culturas de cereais de grãos pequenos, onde as sementes constituem o produto de valor comercial (Allard, 1971). Como desvantagens têm-se: a inadequação para espécies, cujo produto comercial não seja semente, a impossibilidade de se usar casa de vegetação, não permitir o uso da população para estudos de herança, risco de perda de genótipos desejáveis, com baixa capacidade de competição e, principalmente, problemas de perdas de combinações genóticas devido à amostragem (Borém, 1997).

### 2.2.3 Método descendência de uma única semente

O método é mais conhecido como SSD (do inglês – Single Seed Descendent). A primeira referência ao princípio deste método foi feita por Goulden (1939), como uma modificação proposta ao método genealógico e que serviu de base ao desenvolvimento do método “Pedigree modificado” por Brim (1966). O nome “Descendência de uma única semente” (Single Seed Descendent) foi proposto por Empig e Fehr (1971).

A principal característica do método, é a redução no tempo requerido para obtenção de linhagens homozigóticas, por meio do avanço das gerações fora da época normal de semeadura da cultura durante todo o ano. Nesse método, o processo de avaliação e seleção de genótipos só se inicia após a obtenção das linhagens em homozigose. Os indivíduos podem ser conduzidos em casa de vegetação, uma vez que apenas uma semente por planta é utilizada para se obter a geração seguinte. Portanto, uma das principais características desse método é a separação da fase de aumento da homozigose da fase de seleção. Assim, as populações segregantes não precisam ser conduzidas no ambiente similar, ao qual, a futura cultivar será utilizada (Borém, 1997).

O método proposto por Brim (1966), para avançar gerações segregantes de soja até um nível desejável de homozigose, consiste, basicamente, em tomar de cada planta da geração  $F_2$ , uma única semente para formar a geração seguinte. Duas a três sementes de cada planta  $F_2$  são semeadas para assegurar a germinação, mas somente a uma planta será permitido desenvolvimento. Esse procedimento é usado em todas as gerações seguintes à  $F_2$ , até à geração onde é considerado o nível ideal de homozigose, para se retirar linhas e fazer seleção (geralmente  $F_6$  ou  $F_7$ ). Cada progênie nas gerações avançadas, corresponde a uma planta  $F_2$ , o que reduz perdas por deficiências de amostragem.

O SSD oferece como vantagens: o fornecimento de máxima variância genética, entre linhagens, na população final, possibilidade de se atingir o nível desejado de homozigose rapidamente, fácil condução com a não exigência de um registro de genealogia, poder ser conduzido fora da área de adaptação, requerer pouca mão de obra, pequena área, colheita rápida e sem esforço. Já as desvantagens são: a pequena oportunidade de seleção nas gerações precoces, algumas plantas  $F_2$  não apresentarem descendentes na população final e não há ação da seleção natural, na condução da população segregante, pois, cada planta contribui com o mesmo número de descendentes para a próxima geração. Efetivamente, no Brasil, contando com a irrigação, pode-se cultivar o feijão durante todo o ano na maioria das regiões. Assim, a principal vantagem do método, que é o avanço rápido das gerações, deixa de existir (Brim, 1966; Ramalho, Santos e Zimmermann, 1993; Araújo et al., 1996; Borém, 1997).

#### **2.2.4 Método “bulk” dentro de famílias**

O método do “bulk” dentro de famílias foi, primeiramente, proposto por Frey (1954) e associa os métodos genealógico e da população. Com isso, esperava-se diminuir o efeito de amostragem, que é um problema comum no método da população e, também, tornar o método genealógico mais barato e menos trabalhoso (Raposo, 1999).

Por esse método, obtém-se plantas individuais a partir da população base, e cada planta dará origem a uma família. As sementes provenientes de cada família são misturadas e com elas se obtém a próxima geração de endogamia (Raposo, 1999).

Na Universidade Federal de Lavras, esse método é muito empregado no melhoramento do feijoeiro, mas foram feitas algumas modificações em relação

ao método original. Uma dessas modificações está relacionada com a abertura do bulk, que é feita na geração  $F_2$ , mas pode-se adiar para a geração  $F_3$ . Com isso, tem-se a chance de uma melhor exploração de  $\sigma^2_A$  entre famílias, que é de  $1\sigma^2_A$  em  $F_2$  e  $1,5\sigma^2_A$  em  $F_3$ . Com o decorrer das sucessivas autofecundações, a variabilidade dentro vai sendo liberada e, por essa razão, deve-se aumentar o número de indivíduos por família a cada geração. Desse modo, reduz-se também as perdas por amostragem dentro das famílias.

A principal vantagem desse método é a redução nas perdas por amostragem. Uma outra vantagem é o fato de que a seleção não é feita visualmente mas sim, baseando-se em resultados experimentais. Além do mais, a seleção das famílias é feita utilizando-se experimentos conduzidos por mais de uma geração, em mais locais, o que garante maior segurança aos melhoristas na seleção, uma vez que esta será baseada na performance média das culturas, obtida de vários experimentos. Isso atenua o efeito da interação entre genótipos e ambientes (Ramalho, Santos e Zimmermann, 1993). Sua principal desvantagem é o grande trabalho envolvido na avaliação das famílias em experimentos com repetição e como consequência, pode-se ter problemas com a representabilidade da variabilidade gerada no cruzamento.

O método de “bulk” dentro de famílias deve ser preferencialmente utilizado, quando se tem um cruzamento muito promissor e se deseja maior atenção no avanço das gerações (Raposo, 1999).

### **2.3 Eficiência dos métodos de condução da população segregante**

Como já salientado, os diferentes métodos foram propostos, visando sanar defeitos daqueles já existentes. Entretanto, uma forma de avaliar a eficiência dos métodos é determinar a variabilidade liberada por cada um, bem

como o número de famílias, que apresentam maior produtividade de grãos, como investigado por Raposo (1999). De acordo com o autor, não aconteceram diferenças marcantes entre os métodos na obtenção de famílias superiores. Desde que sejam conduzidos corretamente, todos possibilitam sucesso com a seleção. Quando se considerou, contudo, as estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos, a facilidade e flexibilidade de condução, os métodos da população e SSD foram os mais vantajosos.

Um procedimento que poderá auxiliar na comparação desses métodos é o estudo da diversidade genética entre as famílias produzidas por cada um. Tal diversidade pode ser obtida nas avaliações morfo-agronômicas, ou mais facilmente, por meio de marcadores moleculares.

## **2.4 Marcadores moleculares**

Um marcador pode ser definido como todo e qualquer fenótipo decorrente de um gene expresso, como no caso das proteínas e caracteres morfológicos ou de um segmento específico de DNA, que pode ou não corresponder a regiões expressas do genoma, cuja seqüência e função podem ou não ser conhecidas e possuem comportamento de acordo com as leis básicas da herança (Ferreira e Grattapaglia, 1996). Já Sakiyama (1993), em uma definição mais abrangente, relata que a palavra marcadores tem sido utilizada para designar fatores morfológicos, fisiológicos, bioquímicos ou genéticos, passíveis de serem identificados e que permitem o estudo comparativo de genótipos e suas progênies.

O termo marcador indica que sua função é identificar alguma coisa e no caso de marcadores moleculares, uma de suas funções é marcar alelos, cuja expressão seja de difícil identificação, a fim de que se possa selecionar esse alelo indiretamente. Além disso, os marcadores também podem ser utilizados para

amostrar o genoma de uma espécie qualquer e a partir daí, determinar a diversidade genética de um grupo de indivíduos, bem como o grau de parentesco relativo entre eles.

Um ponto essencial é que o marcador seja herdável (Ramalho, Santos e Pinto, 2001). Há quatro classes de marcadores, que podem ser utilizados em vegetais: marcadores morfológicos, marcadores citológicos, marcadores bioquímicos e marcadores moleculares.

Um marcador morfológico consiste de um caráter qualitativo de alta herdabilidade, normalmente determinado por um único alelo. Os marcadores morfológicos são, em geral, fenótipos de fácil identificação visual, como nanismo, cor de pétala e morfologia foliar. Esses marcadores contribuíram, significativamente, para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e para a construção das primeiras versões de mapas genéticos.

No entanto, eles apresentam uma série de problemas, entre eles, sofrerem influência do ambiente. Porém, o principal problema é o fato de que essa classe de marcadores se apresenta em pequeno número, além de apresentarem a desvantagem de somente serem identificados, em sua maioria, no nível de planta inteira ou adulta (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

Marcadores citológicos podem alterar o fenótipo da planta, produzindo indivíduos que não podem ser utilizados, sendo também difíceis de serem monitorados em cruzamentos e, por isso, de uso menos difundido (Hu e Quiros, 1991).

Marcadores bioquímicos consistem do uso de proteínas de reserva de sementes e isoenzimas. O termo isoenzima define um grupo de múltiplas formas moleculares da mesma enzima, que ocorre em uma espécie, como resultado da presença de mais de um gene, codificando as cadeias polipeptídicas das enzimas (Moss, 1982). É um marcador relativamente barato, tecnicamente acessível, embora, também, apresente a desvantagem de ser pouco variável,

principalmente, quando se analisa populações de genótipos altamente aparentados. Além disso, também pode haver interação com outros genes, uma vez que isoenzimas são produtos gênicos. Apesar de serem pouco utilizados nos dias de hoje, o seu uso é uma ferramenta auxiliar nos estudos de genética e melhoramento de plantas, com aplicações nas áreas de genética de populações, identificação de cultivares e genética evolutiva (Muniz, 1994).

Quando surgiram as técnicas de biologia molecular, foram desenvolvidos diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente no nível de DNA. Essa classe de marcadores começou a ser utilizada na década de 1980 e já se utilizam mais de uma dezena de procedimentos alternativos (Mohan et al., 1997; Ramalho, Santos e Pinto, 2001). Os marcadores de DNA têm sido amplamente explorados por apresentarem várias características desejáveis, como herança mendeliana simples, ausência de efeitos epistáticos e poderem ser utilizados em qualquer fase de desenvolvimento da planta. Isso abre a possibilidade de acelerar o processo de recombinação e seleção dos indivíduos desejados, o que, conseqüentemente, reduz o tempo necessário para completar uma geração de melhoramento, aumentando a eficiência do programa. Além disso, podem ser obtidos em grande número e por utilizarem o próprio DNA (genótipo) e não seus produtos (fenótipo), apresentam resultados experimentais mais consistentes (Ferreira e Grattapaglia, 1996). Os marcadores de DNA têm se mostrado altamente eficientes para identificar variabilidade do DNA em plantas.

Inicialmente, a utilização de enzimas de restrição, permitiu a análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição de DNA (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP) (Grodzicker et al., 1974; Botstein et al., 1980; Ferreira e Grattapaglia, 1996). O método consiste, basicamente, no uso de enzimas de restrição, que cortam o DNA em sítios específicos, produzindo

milhares de fragmentos, alguns dos quais são identificados por sondas complementares.

Apesar de ser um marcador confiável, tem algumas desvantagens, como requerer grande quantidade de DNA e, principalmente, ser uma técnica laboriosa, que demanda muito tempo para a análise.

No final da década de 1980, surgiu a técnica PCR (Mullis e Faloona, 1987; Saiki et al., 1988). A técnica PCR também utiliza DNA (genótipo), como na técnica RFLP, mas o que ocorre é a síntese diferencial de certos segmentos do DNA genômico *in vitro*. O fato da técnica do PCR ser simples, rápida, versátil e sensível, torna-a particularmente poderosa para estudos, envolvendo indivíduos de qualquer organismo vivo.

O PCR envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR, baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de primers, geralmente com 20 a 25 nucleotídeos, que delimitam a seqüência da fita dupla, alvo da amplificação (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

A técnica PCR apresenta, porém, uma desvantagem, que é o fato de requerer o seqüenciamento de um dado gene, para se obter os primers, aumentando seu custo. Mas essa técnica sofreu algumas modificações, que geraram novas classes de marcadores moleculares, tais como: polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD) (Williams et al.; 1990); amplificação de microssatélites (seqüências de dois a cinco pares de bases repetidos) (Beckman e Soller, 1990) e também polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphism – AFLP) (Zabeau, 1993).

No início da década de 1990, Welsh e McClelland (1990) e Williams et al. (1990), independentemente descreveram a técnica RAPD, que se constitui em uma variação do protocolo do PCR, mas diferenciando-se deste, pois ao invés de

utilizar um par de primers, a reação de amplificação é dirigida por apenas um primer, sendo que este possui uma seqüência de bases arbitrária (Tingey, Rafalski e Williams, 1992).

A grande maioria dos primers usados em RAPD são de 10 nucleotídeos e os que têm produzido polimorfismo em plantas, possuem de 50% a 80% de guanina mais citosina (Ramalho, Santos e Pinto, 2001).

O polimorfismo é identificado como um fragmento de DNA amplificado, a partir de um indivíduo e não amplificado a partir do outro. Esse fragmento apresenta herança mendeliana simples. Quase todos os marcadores RAPD são dominantes (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

A metodologia do RAPD abriu uma perspectiva inteiramente nova para análise genômica de indivíduos e populações, pois além de acelerar os estudos, ainda permitiu a realização desses estudos de análise genética em espécies anteriormente não contempladas. Além disso, viabilizou o estudo genético através de marcadores moleculares, devido ao seu baixo custo e simplicidade, possibilitando sua fácil utilização na maioria dos programas de melhoramento, sendo, portanto, uma ferramenta útil, acessível e de fácil aplicabilidade. Desde a sua descrição, o uso de marcadores RAPD, na análise genética e no melhoramento de plantas, tem tido uma difusão extremamente rápida. Suas aplicações incluem: obtenção de fingerprintings genômicos de indivíduos, cultivares e populações; análise da estrutura e diversidade genética em populações; estabelecimento de diferentes relacionamentos filogenéticos, entre diferentes espécies; construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica; identificação de genes de interesse econômico (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

O RAPD possui algumas vantagens sobre o RFLP, como: ser cerca de dez vezes mais rápido, requerer uma quantidade muito menor de DNA, não fazer uso de elementos radioativos, ser mais barato e muito mais simples. Porém, apresenta várias desvantagens, dentre as quais, alguma falta de repetibilidade

dos resultados, dominância (não identifica indivíduos heterozigotos), baixo número de alelos identificados para cada loco (apenas dois), falta de homologia entre genomas de espécies relacionadas e falta de especificidade para regiões particulares do genoma (Kesseli, Paran e Michelmore, 1992).

## **2.5 Avaliação da diversidade genética por meio de marcadores RAPD**

A diversidade genética pode ser utilizada em programas de melhoramento genético para diversas finalidades, sendo uma delas o estudo da variabilidade genética liberada pelos cruzamentos (Morais, 1992).

Estudos de diversidade e relacionamentos filogenéticos, entre e dentro de espécies vegetais de interesse agrícola, têm sido uma das contribuições dos marcadores moleculares à genética e melhoramento de plantas (Duarte, 1998), uma vez que, informação molecular de diversidade, pode auxiliar no enriquecimento da base genética, durante o andamento de um programa de melhoramento (Newbury e Ford-Lloyd, 1993). A avaliação da diversidade genética, por marcadores moleculares, apresenta algumas vantagens sobre outros métodos, pois, estes, além de identificarem grande polimorfismo não apresentam interações entre caracteres, podendo ainda serem avaliados em qualquer estágio do desenvolvimento (Williams et al., 1990).

A estimativa da diversidade genética, utilizando marcadores moleculares, pode ser obtida a partir de uma grande quantidade de informações, permitindo amostrar o genoma dos genótipos disponíveis para os melhoristas de modo mais eficiente. Em geral, esses dados são obtidos na forma de uma matriz composta por um certo número de genótipos, que podem ser cultivares ou linhagens, genotipados por algumas dezenas ou centenas de marcadores.

Um aspecto a ser considerado é que a utilidade de marcadores para o melhoramento genético será tanto maior, quanto maior for sua capacidade de predizer o comportamento dos cruzamentos no campo. Assim, a utilização de primers, que amplificam fragmentos de DNA, que identificam QTLs de caracteres de importância agronômica, fornecem informações mais úteis para o melhorista (Melo, 2000).

Nos últimos anos, a disponibilidade de marcadores RAPD permitiu estudos de diversidade genética de várias espécies. Ferreira e Grattapaglia (1996) citam alguns desses estudos, como: amendoim (Halward et al., 1992), cacau (Wilde Waugh e Powell, 1992), mamão (Stiles et al., 1993), alho (Wilkie, Isaac e Slater, 1993) e feijão (Skroch, Tivang e Nienhuis, 1992; Duarte, 1998; Machado, 1999).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Foram utilizadas 292 famílias, seus dois genitores, Carioca e Flor de Mayo e uma testemunha - cultivar Pérola, obtidas em experimento conduzido por Raposo (1999), no Campo Experimental do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Originalmente, Raposo (1999) conduziu a população segregante por meio dos diferentes métodos até a geração F<sub>4</sub>. Nesta geração foram tomadas de 100 a 121 plantas ao acaso e as famílias foram avaliadas em F<sub>5</sub>, com base na produtividade de grãos, sendo selecionadas as 64 mais produtivas em cada método de condução, para a comparação dos mesmos. Entre as famílias utilizadas nos diferentes métodos de condução da população segregante, 56 foram obtidas pelo método genealógico, 55 pelo método da população, 62 pelo método SSD, 61 pelo método "bulk" dentro de famílias F<sub>2</sub> e 58 pelo método "bulk" dentro de famílias F<sub>3</sub>.

#### 3.1 Extração de DNA

O DNA de cada linhagem foi extraído de uma mistura equitativa de folhas jovens provenientes de 16 plantas.

A extração do DNA foi feita por meio do procedimento empregado por Nienhuis et al. (1995), com poucas modificações, isto é: foram utilizados cerca de dois gramas de folhas jovens, que foram trituradas em 10 ml de tampão de extração a 65°C em um almofariz. O tampão de extração contém 2% de CTAB, 100mM de TRIS (pH 8,0), 20 mM de EDTA (pH 8,0), 1,4 M de

NaCl e 1% de PVP (polivinilpirrolidona). O material macerado foi colocado em tubos de centrifuga, juntamente com 20  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol e incubado durante 30 minutos, em banho-maria a 65°C. Após o banho-maria foi realizada a primeira extração dos ácidos nucleicos com 10 ml da mistura clorofórmio: álcool isoamil (24:1). Durante essa extração as fases orgânica e aquosa foram separadas por centrifugação e foi coletado o sobrenadante. Em seguida, os ácidos nucleicos foram precipitados após a adição de 30 ml da mistura álcool 95%: acetato de amônio 7,5M (6:1). Essa mistura foi colocada no freezer, por pelo menos uma hora. Após a precipitação dos ácidos nucleicos, eles foram transferidos para tubos de microcentrifuga tipo “Eppendorff” e centrifugados, descartando-se o sobrenadante e mantendo o precipitado. Em seguida, os ácidos nucleicos foram reidratados em tampão TE (1 mM TRIS e 0,1 mM EDTA). Foi realizada uma segunda extração com a mistura clorofórmio: álcool isoamil (24:1) e o sobrenadante foi precipitado pela adição de pelo menos três volumes de uma mistura de acetato de sódio: etanol 95% (1:20). Após a precipitação, os ácidos nucleicos foram reidratados em tampão TE, quantificados, usando-se o fluorímetro Hoeffer Scientific TKO100 e diluídos para a concentração de 10 ng/ $\mu$ l.

### **3.2 Processo de amplificação do DNA e eletroforese**

A reação de RAPD foi preparada em volume de 10  $\mu$ l, de acordo com o procedimento utilizado por Nienhuis et al. (1995) com modificações. Cada mistura de reação continha: 20 ng de DNA genômico, 100  $\mu$ g de cada um dos desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,4  $\mu$ M de um oligonucleotídeo iniciador (primer), 0,6 unidades da enzima Taq DNA

polimerase, 50 mM de TRIS (pH 8,3), 20 mM de KCl, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 µg.µl<sup>-1</sup> de BSA, 0,25% de Ficol 400, 10 mM de tartrazine e água pura, totalizando 10 µl.

As reações foram realizadas em tubos capilares de vidro, em um termociclador refrigerado a ar (Idaho Technology, Idaho Falls, Idaho). O termociclador foi programado para 40 ciclos, seguindo as seguintes condições: nos dois primeiros ciclos, 60 segundos para desnaturação, a 91°C, 7 segundos para anelamento do primer a 42°C e 70 segundos para alongação a 72°C. Os 38 ciclos seguintes diferiram dos dois primeiros, apenas em relação ao tempo de desnaturação, que passou para 1 segundo.

Após a amplificação, os produtos da reação foram separados por eletroforese em gel de agarose, a 1,2% em tampão TBE (0,45 M Tris-Borato e 0,001 M EDTA), a 75 volts, durante 4 horas, corados com brometo de etídio a uma concentração de 0,5 µg/ml, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta Fotodyne e fotografados com filme Polaroid 667.

Foram utilizados 23 primers decanucleotídeos adquiridos junto à Operon Technologies (California, EUA). A maioria das bandas polimórficas, geradas por esses primers, identifica um ou mais QTLs responsáveis pela produção de grãos, dias para florescimento, peso de 100 sementes e reações aos agentes causais do oídio e mancha angular (Melo, 2000). As bandas polimórficas foram classificadas como fracas, médias ou intensas, baseando-se na resolução e grau de amplificação por meio de avaliação visual. Apenas as bandas consideradas médias ou intensas foram incluídas na análise.

### 3.3 Análise dos dados moleculares e obtenção das similaridades genéticas

Durante a avaliação dos géis, cada banda polimórfica foi tratada como um caráter único. Foi elaborada uma matriz de 0 e 1, a partir da codificação da presença (1) e ausência (0) de 42 bandas polimórficas, presentes nas famílias provenientes de cada método de condução de população segregante. A estimativa da similaridade genética ( $sg_{ij}$ ), entre cada par de linhagens, foi efetuada pelo coeficiente de Dice, por meio da seguinte expressão (Rohlf, 1992):

$$sg_{ij} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

sendo os significados de a, b e c apresentados na Tabela 1:

TABELA 1 - Presença (1) e/ou ausência (0) de bandas em cada par (ij) de linhagens.

Linhagem j	Linhagem i	
	1	0
1	a (1,1)	b (0,1)
0	c (1,0)	d (0,0)

As análises de similaridade genética foram realizadas por meio do programa NTSYS-PC 2.0 (Rohlf, 1992).

Os erros associados a cada similaridade foram estimados de acordo com a expressão (Skroch, Tivang e Nienhuis, 1992):

$$\text{Erro padrão estimado } (s_{sg}) = \sqrt{sg_{ij} \times \frac{1 - sg_{ij}}{(n-1)}}$$

Em que  $n$  é o número total das combinações  $a$ ,  $b$  e  $c$  cada par de famílias.

A análise de agrupamento das similaridades foi feita através do método da média das similaridades (UPGMA), gerando dendrogramas, por meio do programa NTSYS-PC 2.0 (Rohlf, 1992).

As famílias geneticamente diferentes foram identificadas nos dendrogramas 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  $t$ , nos níveis de 1% e 0,1% de probabilidade, utilizando-se a seguinte expressão:

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

onde  $t$  é o valor tabelado de  $t$  com  $n-2$  graus de liberdade e  $\bar{s}_{sg}$  o erro médio das comparações consideradas no dendrograma.

Foi também construído um gráfico de projeção bidimensional por meio do método da Escala Multidimensional, utilizando o programa NTSYS-PC 2.0 (Rohlf, 1992).

### 3.4 Comparação entre marcadores RAPD e produção de grãos das famílias

Além das informações dos dendrogramas, procedeu-se, também, a análise da similaridade genética ( $sg_{ij}$ ) entre as famílias provenientes de cada método, por meio do método IV do dialelo de Griffing (1956), de acordo com o seguinte modelo:

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

em que:  $sg_{ij}$  é a similaridade genética entre as famílias  $i$  e  $j$ ;  $\bar{sg}$  é o valor médio de similaridade para as famílias de cada método;  $sgg_i$  é a similaridade genética geral da família  $i$ ,  $sgg_j$  é a similaridade genética geral da família  $j$ ;  $sge_{ij}$  é a similaridade genética específica para as famílias  $i$  e  $j$ ; e  $e_{ij}$  é o erro associado a  $sg_{ij}$ .

A partir dessa análise foi estimada a similaridade genética geral ( $sgg$ ) para cada família, de forma semelhante ao procedimento adotado por Ajmone Marsan et al. (1997) e Barroso (2000). Foi estimada a correlação entre  $sgg$  e produção de grãos das famílias provenientes de cada método, obtidos por Raposo (1999).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizados 23 primers, que geraram 42 bandas polimórficas nos genitores Carioca e Flor de Mayo (Figura 1) (Tabela 1A). Os primers foram escolhidos a partir do estudo realizado por Melo (2000), os quais se mostraram, na maioria, ligados a QTLs para produção de grãos, reação à mancha angular e oídio, peso de 100 sementes e florescimento, em pelo menos um dos sete ambientes avaliados.

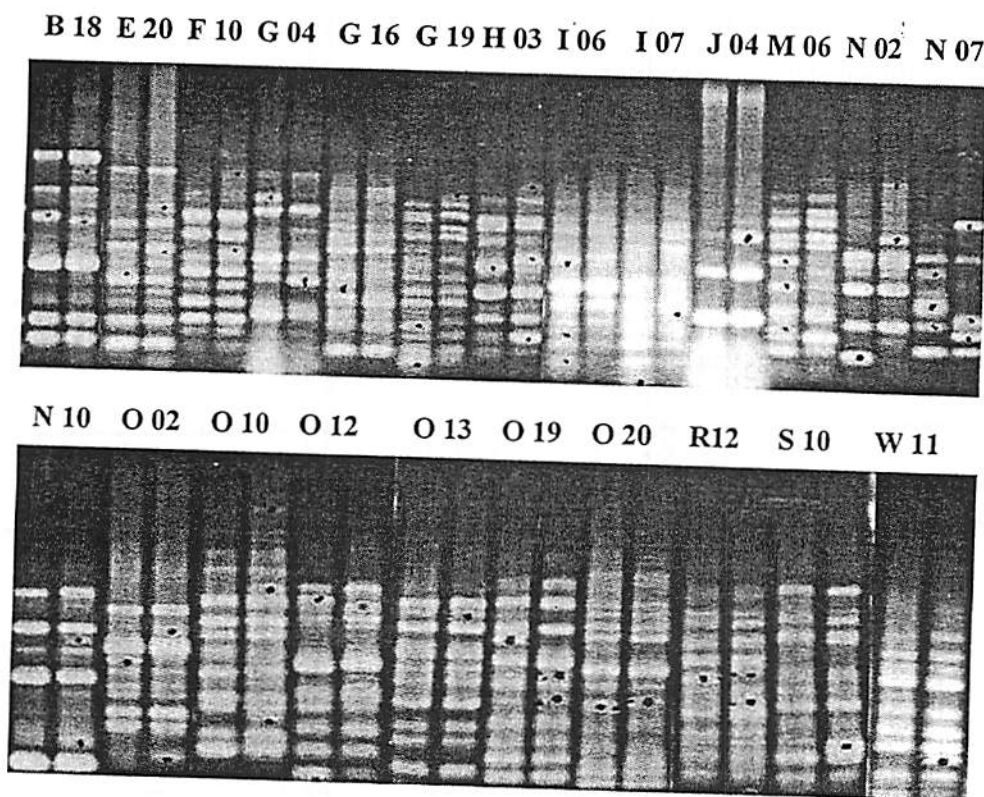


FIGURA 1 - Padrão de bandas obtidos à partir da amplificação do DNA dos genitores Carioca e Flor de Mayo utilizando 23 primers da Operon

As matrizes de 0 e 1, obtidas para cada método de condução da população segregante, a partir do padrão de bandas de todas as famílias, encontram-se nas tabelas de 2A a 6A e foram utilizadas para as estimativas da similaridade genética. Os valores extremos de similaridade e os erros médios das mesmas encontram-se na tabela 2. Nota-se ainda que no método da população ocorreu a maior amplitude desses valores, devido à maior diversidade das famílias, enquanto o método genealógico apresentou a menor amplitude.

Para facilitar a interpretação das similaridades foram realizadas análises de agrupamento obtendo-se dendrogramas (Figuras 2 a 7) e dispersão gráfica (Figuras 8 a 12).

**TABELA 2 - Valores máximo, mínimo e amplitude de similaridade genética das famílias geradas em cada método de condução da população segregante com os respectivos erros médios.**

<b>MÉTODO</b>	<b>VALOR MÍNIMO</b>	<b>VALOR MÁXIMO</b>	<b>AMPLITUD E</b>	<b>ERRO MÉDIO</b>
<b>GENEALÓGICO</b>	0,3333	0,8800	0,5467	0,0791
<b>POPULAÇÃO</b>	0,1142	0,8615	0,7473	0,0810
<b>BULK /F<sub>2</sub></b>	0,2000	0,9122	0,7122	0,0760
<b>BULK /F<sub>3</sub></b>	0,3243	0,9180	0,5937	0,0766
<b>SSD</b>	0,2777	0,8929	0,6152	0,0771

Para os dendrogramas foram determinados, por meio de um teste de t, dois pontos de corte, os valores máximos significativos de similaridade ( $sg_m$ ), sendo um no nível de 1% e o outro no nível de 0,1% de probabilidade. Por esses pontos de corte, foi possível determinar, para cada método, o valor mínimo de similaridade acima do qual as famílias são semelhantes (Tabela 3).

**TABELA 3 - Número de famílias divergentes para cada método de condução da população segregante, nos níveis de 1% e de 0,1% de probabilidade.**

<b>MÉTODO</b>	<b>NÚMERO DE FAMÍLIAS DIVERGENTES</b>	
	<b>1%</b>	<b>0,1%</b>
GENEALÓGICO	23	14
POPULAÇÃO	43	20
BULK DENTRO DE F <sub>2</sub>	28	18
BULK DENTRO DE F <sub>3</sub>	23	14
SSD	36	15

De acordo com esses pontos de corte, o método com o maior número de famílias diferentes, tanto no nível de 1% quanto no nível de 0,1% é o da população (Figura 2), em concordância com a maior amplitude das similaridades entre as famílias. O método genealógico e o “bulk” dentro de famílias F<sub>3</sub> foram os que produziram menor número de famílias divergentes, também em concordância com as mesmas amplitudes de similaridades observadas para os métodos.

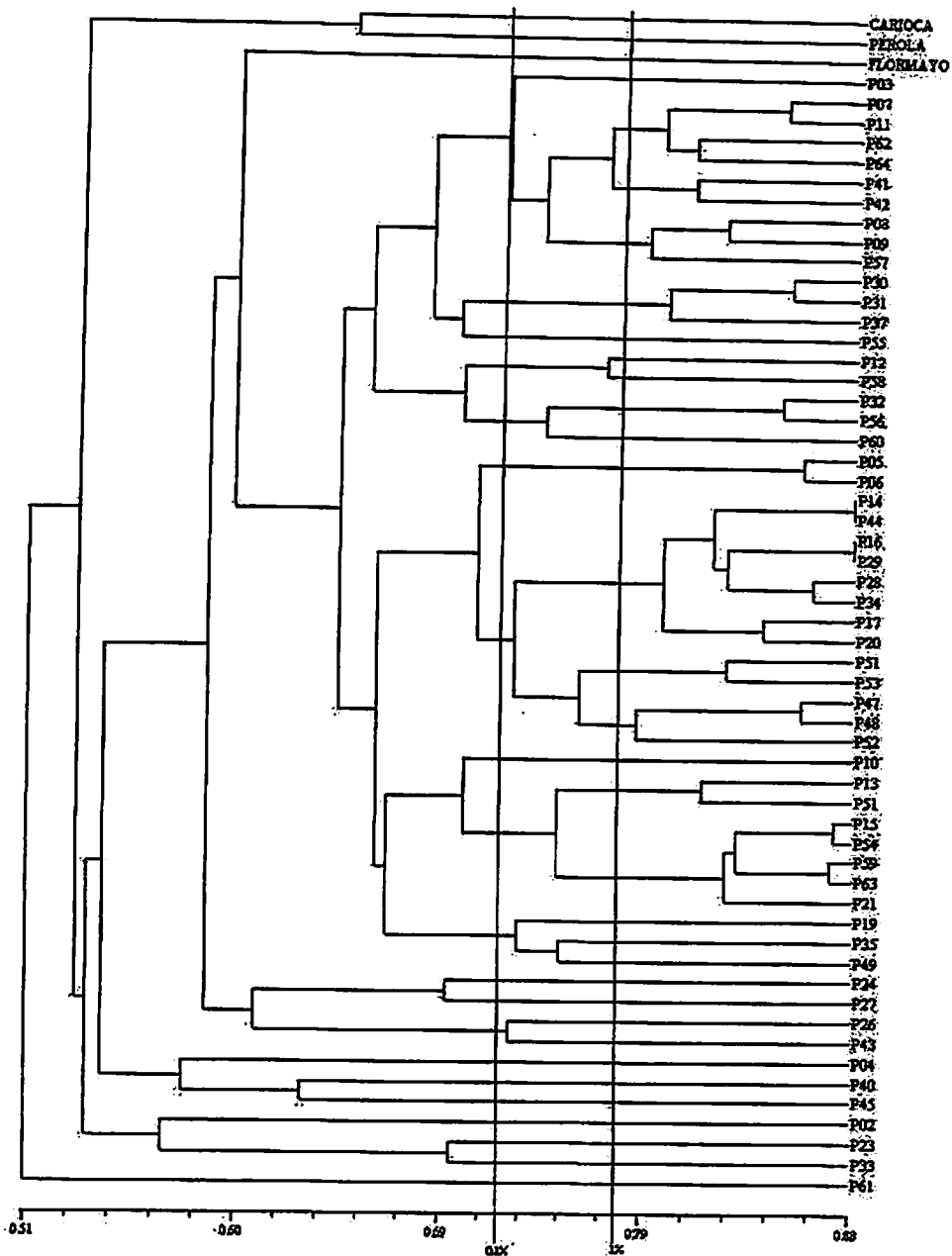


FIGURA 2 – Similaridades genéticas das famílias obtidas pelo método genealógico.

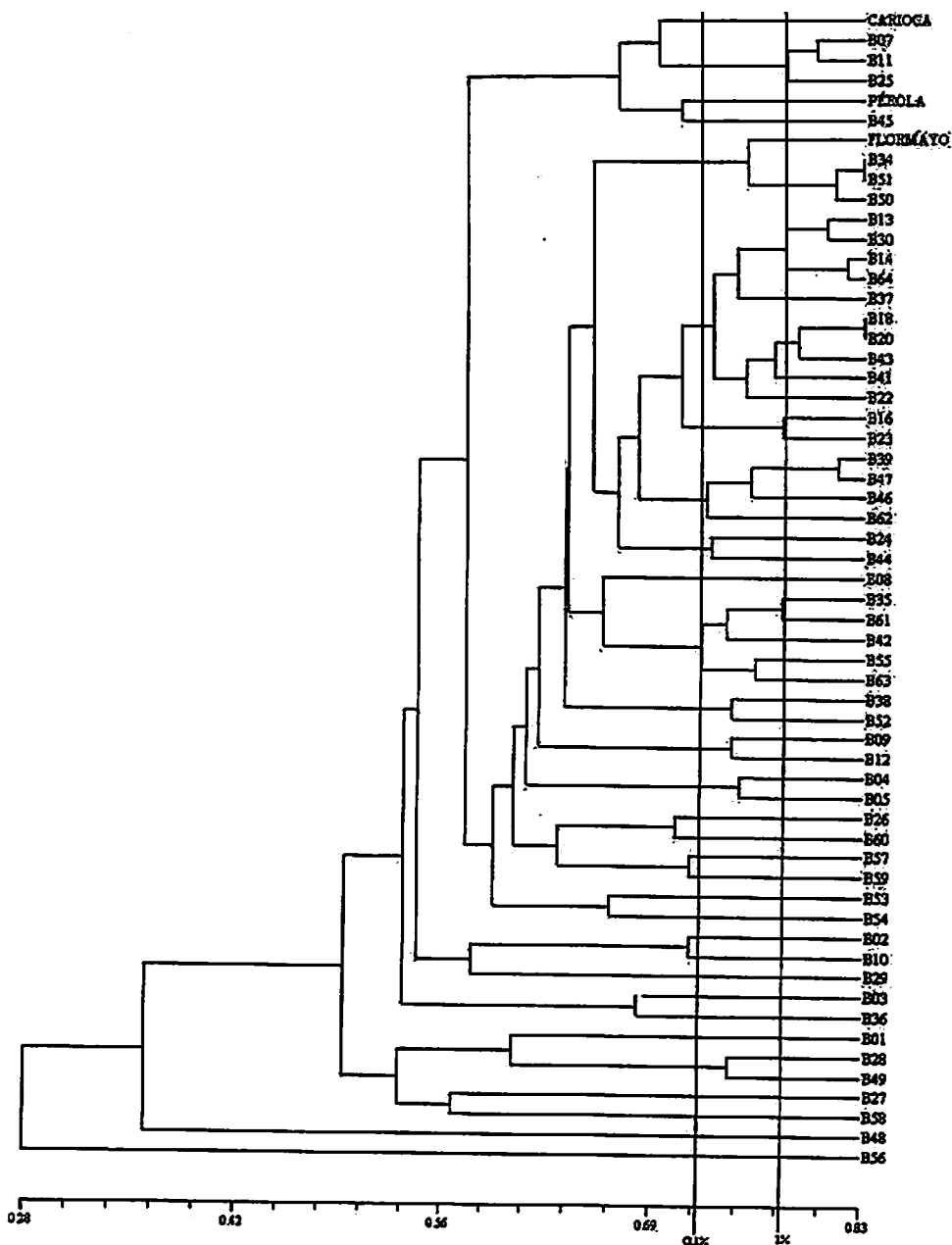


FIGURA 3 - Similaridades genéticas das famílias obtidas pelo método da população.

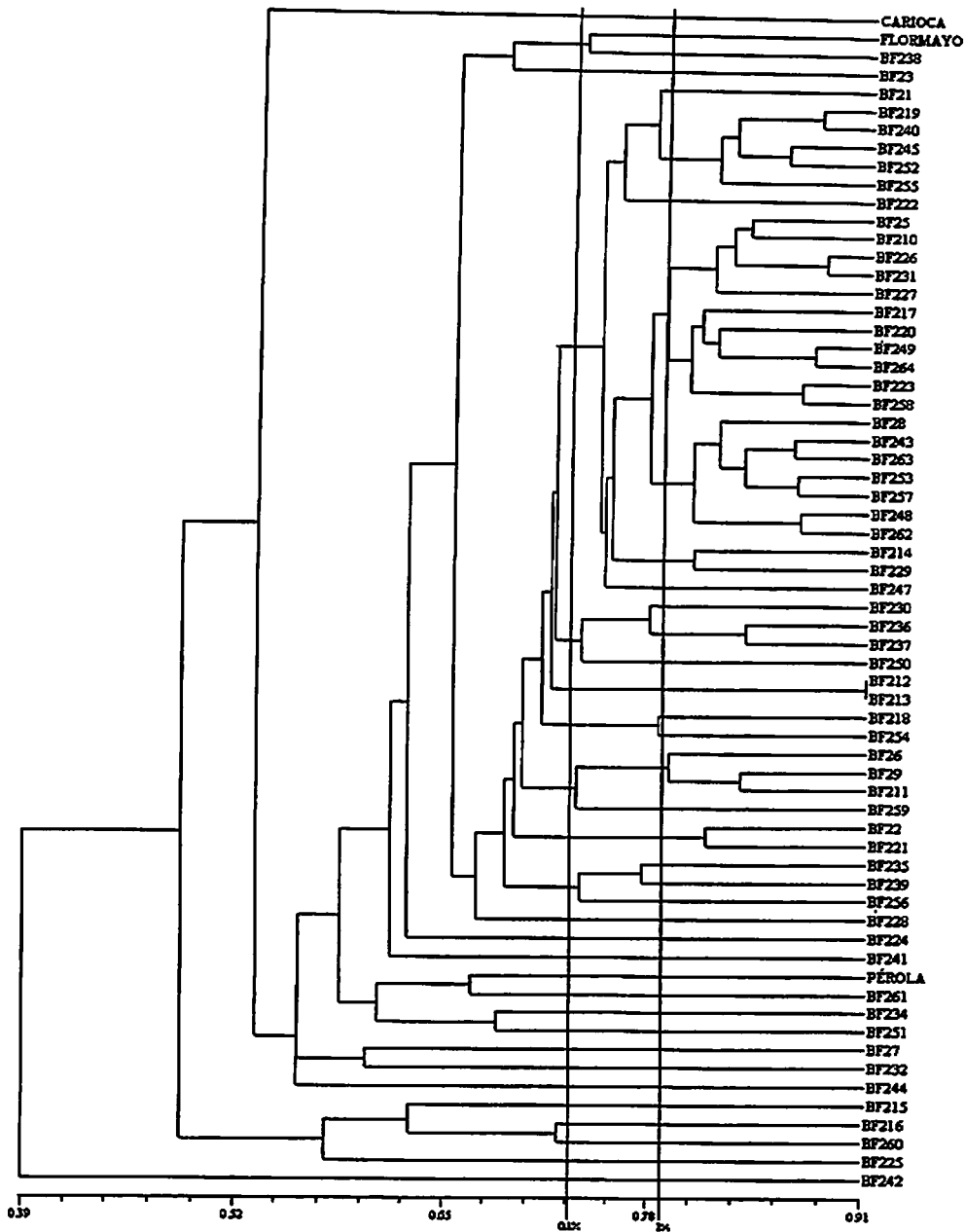


FIGURA 4 - Similaridades genéticas das famílias obtidas pelo método do “bulk” dentro de famílias F<sub>2</sub>.

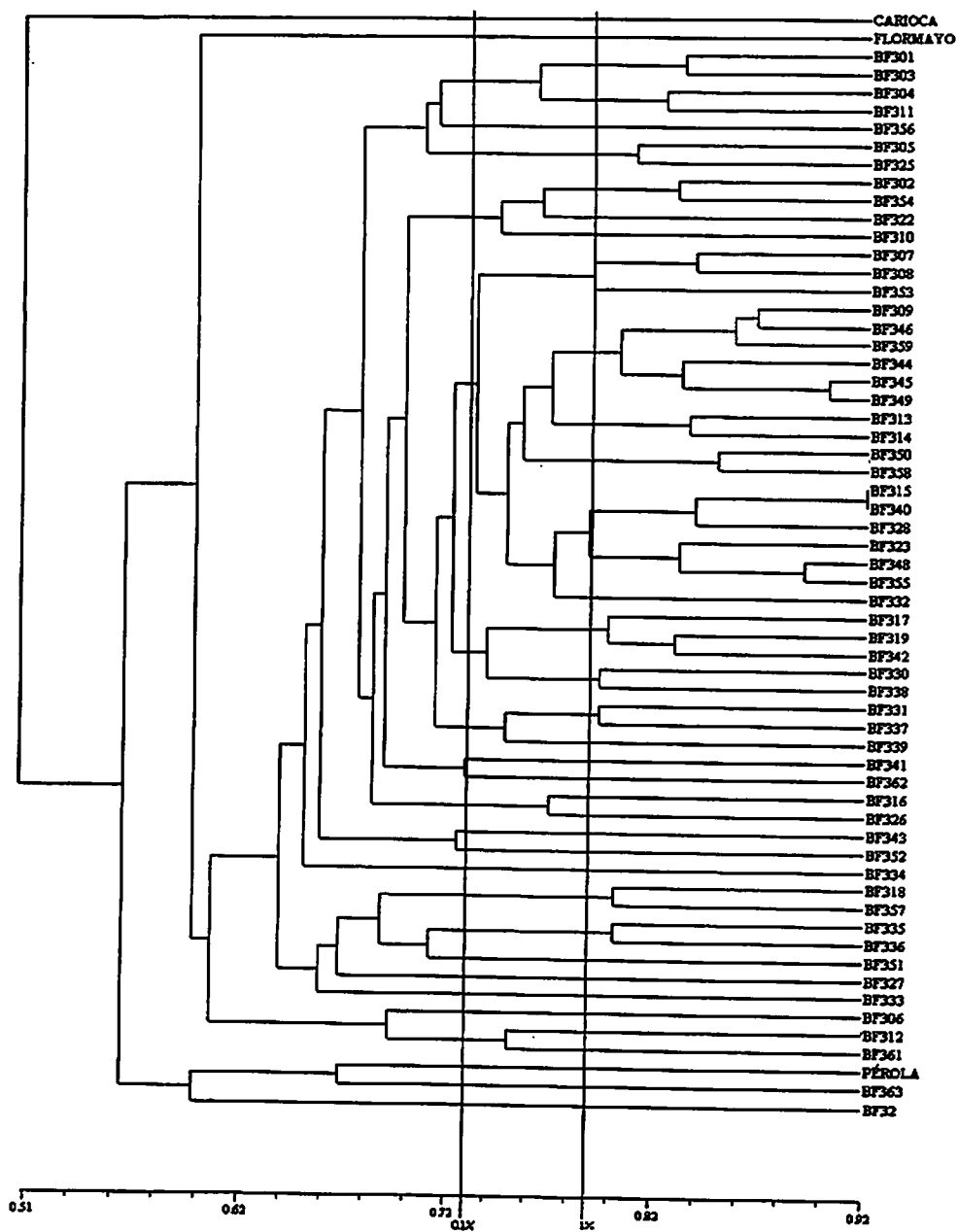


FIGURA 5 - Similaridades genéticas das famílias obtidas pelo método do "bulk" dentro de famílias  $F_3$ .

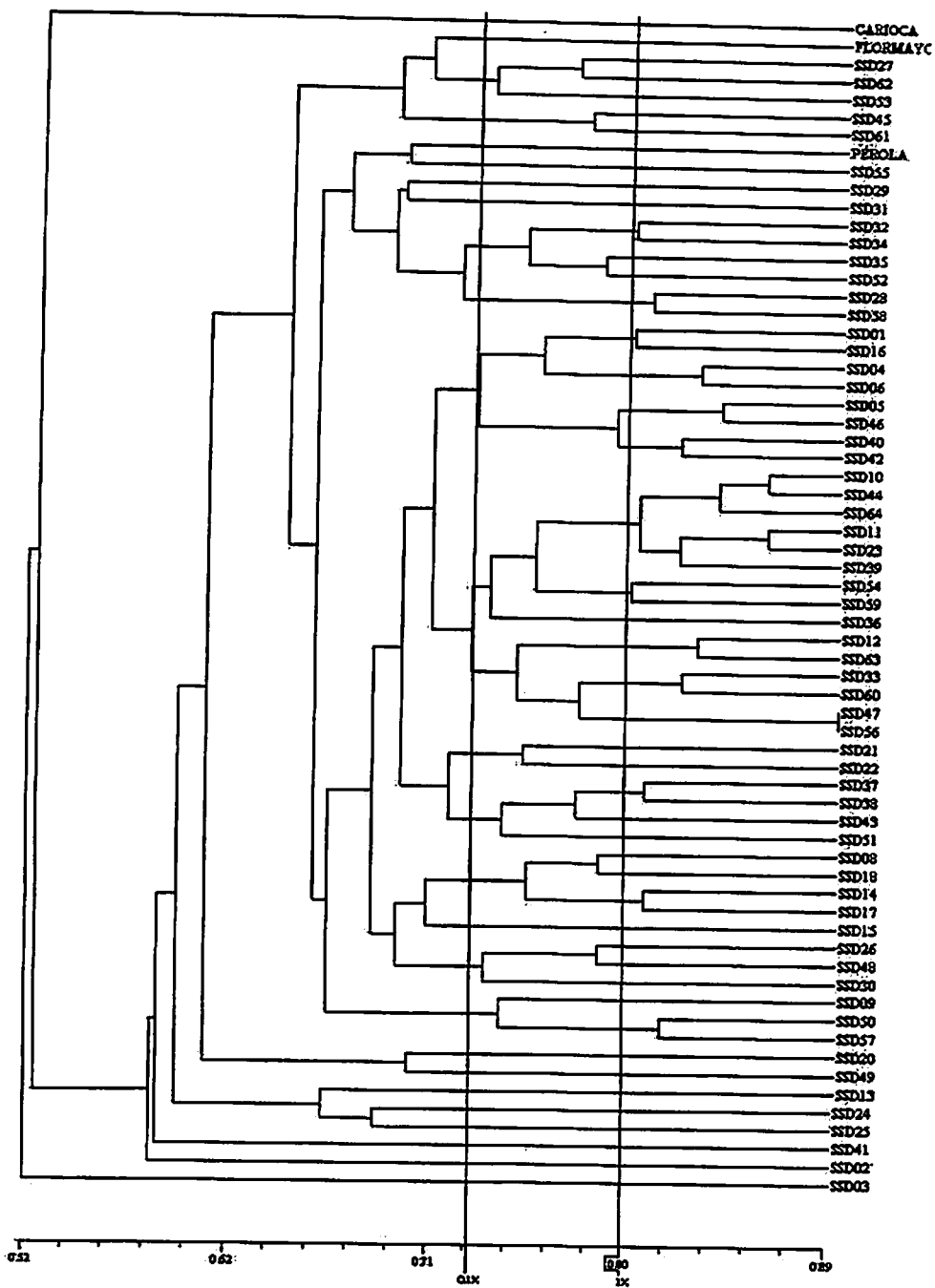


FIGURA 6 - Similaridades genéticas das famílias obtidas pelo método do SSD.

Nos gráficos bidimensionais foram selecionadas aquelas famílias, em cada método, que foram consideradas como as mais próximas à cultivar Carioca, tendo como critério de separação a distância entre as cultivares Carioca e Pérola.

O método que apresentou o maior número de famílias próximas à cultivar Carioca foi o método da população, com dez famílias que são: B 03, B 04, B 05, B 07, B 09, B 11, B 25, B 29, B 36 e B 45 (Figura 8). O método do “Bulk” dentro de famílias  $F_2$  apresentou nove famílias próximas à cultivar Carioca, sendo elas:  $BF_2$  11,  $BF_2$  21,  $BF_2$  22,  $BF_2$  28,  $BF_2$  40,  $BF_2$  42,  $BF_2$  48 e  $BF_2$  55 (Figura 9). O método SSD também apresentou nove famílias, que são: SSD 01, SSD 02, SSD 04, SSD 12, SSD 18, SSD 20, SSD 40 e SSD 49 (Figura 11). O método genealógico apresentou apenas uma família próxima à cultivar Carioca, que foi P a 62 (Figura 7). E, finalmente, o método do “Bulk” dentro de famílias  $F_3$  não apresentou nenhuma família próxima à cultivar Carioca, com base nesse critério (Figura 10). Esses resultados se mostram em concordância com aqueles apresentados nas tabelas 1 e 2.

É necessário salientar que esse procedimento reduziu o número de estimativas de similaridade em duas dimensões, as quais não incluem a totalidade da variação das similaridades (Cruz e Regazzi, 1997). A precisão da representação das similaridades, por meio do gráfico é dada pela estimativa do stress (Rohlf, 1992), cujo valor, para cada método foi: no genealógico, 0,1986; no da população, 0,1906; no “bulk” dentro de famílias  $F_2$ , 0,1885; no “bulk” dentro de famílias  $F_3$ , 0,2345; no SSD, 0,2251. De acordo com o autor, essas estimativas indicam que as informações do gráfico têm uma precisão de boa à razoável.

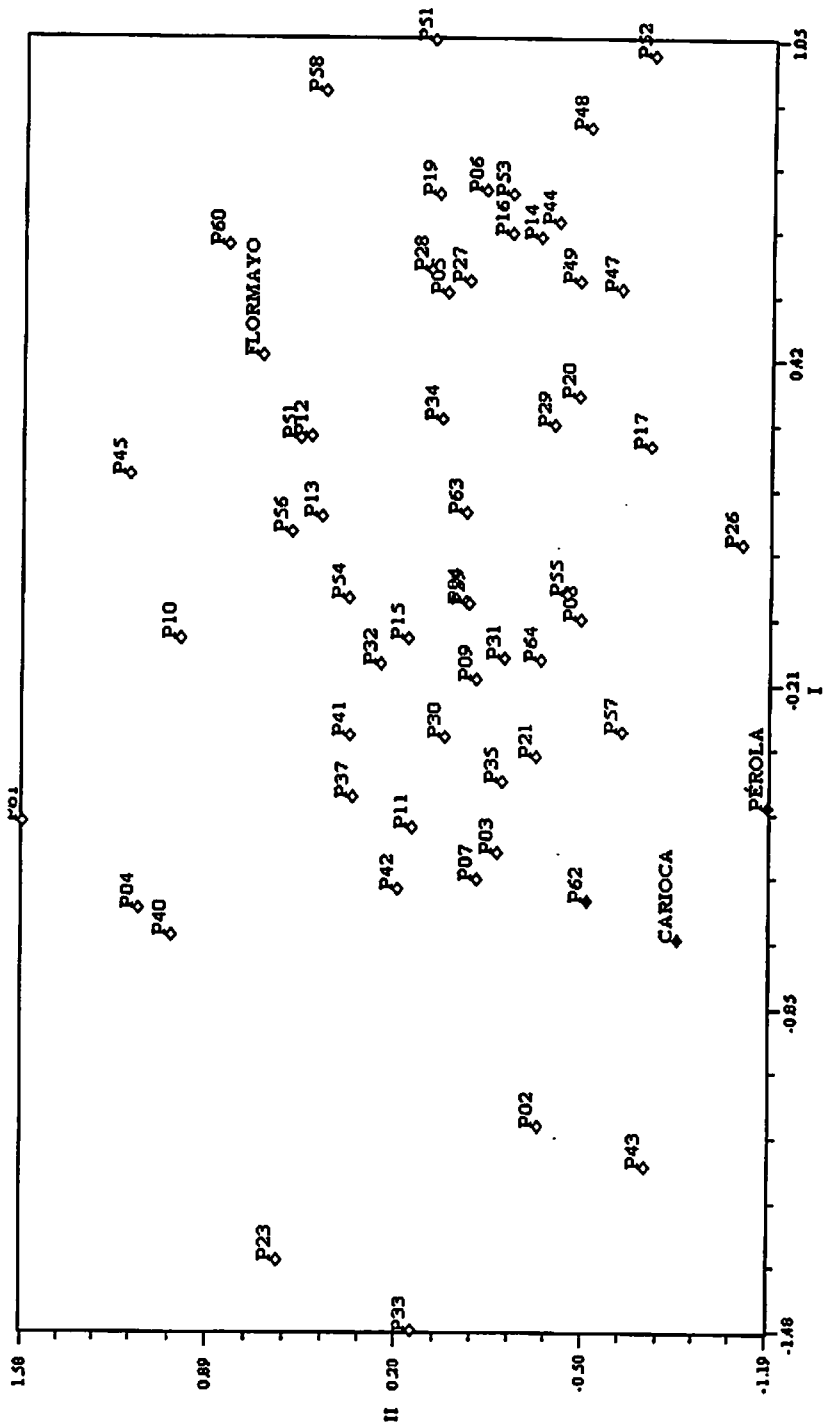


FIGURA 7 – Projecção bidimensional das famílias do método genealógico, com base na similaridade genética, com destaque daquelas famílias com divergência da cultivar Cárioca, no máximo igual à da cultivar Pérola (losangos cheios).

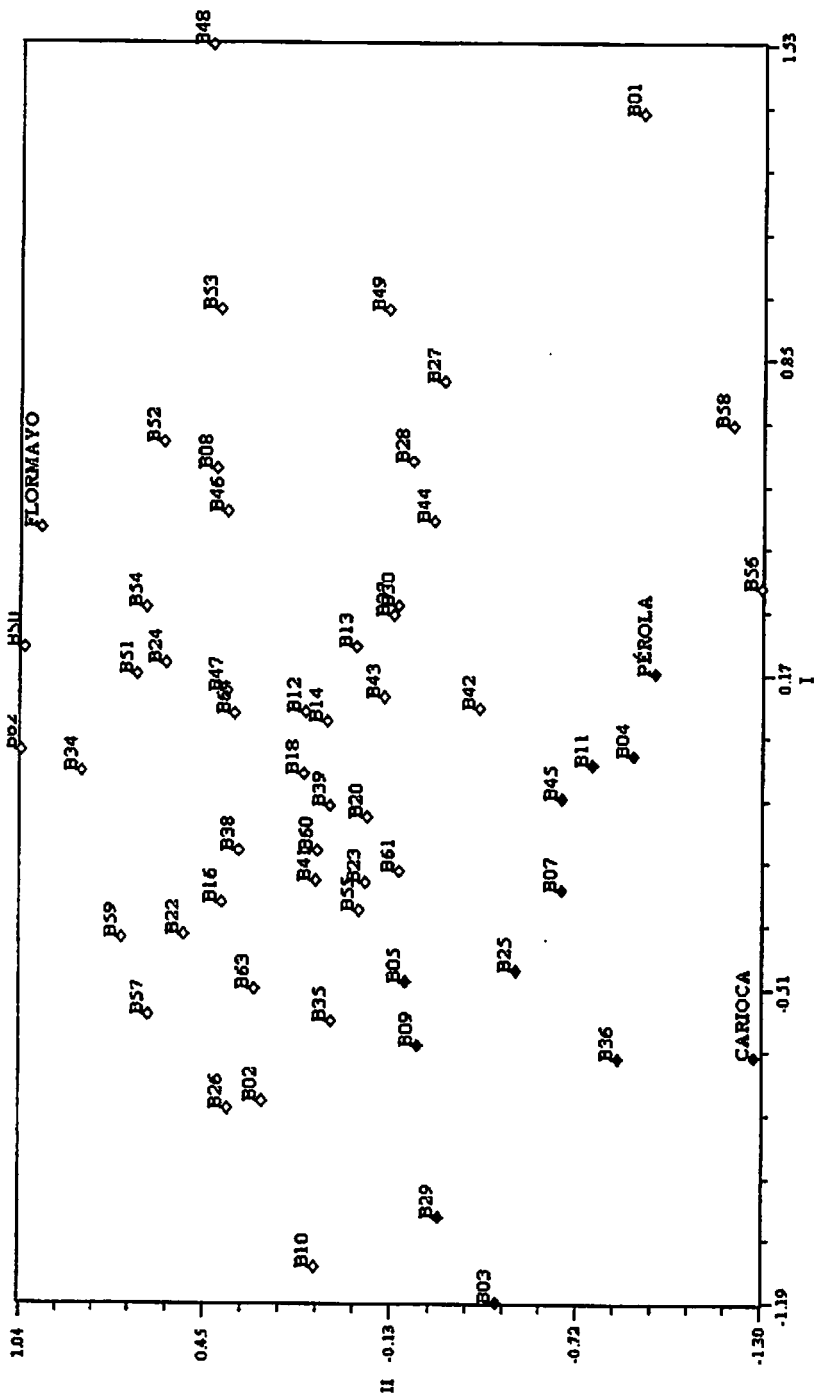
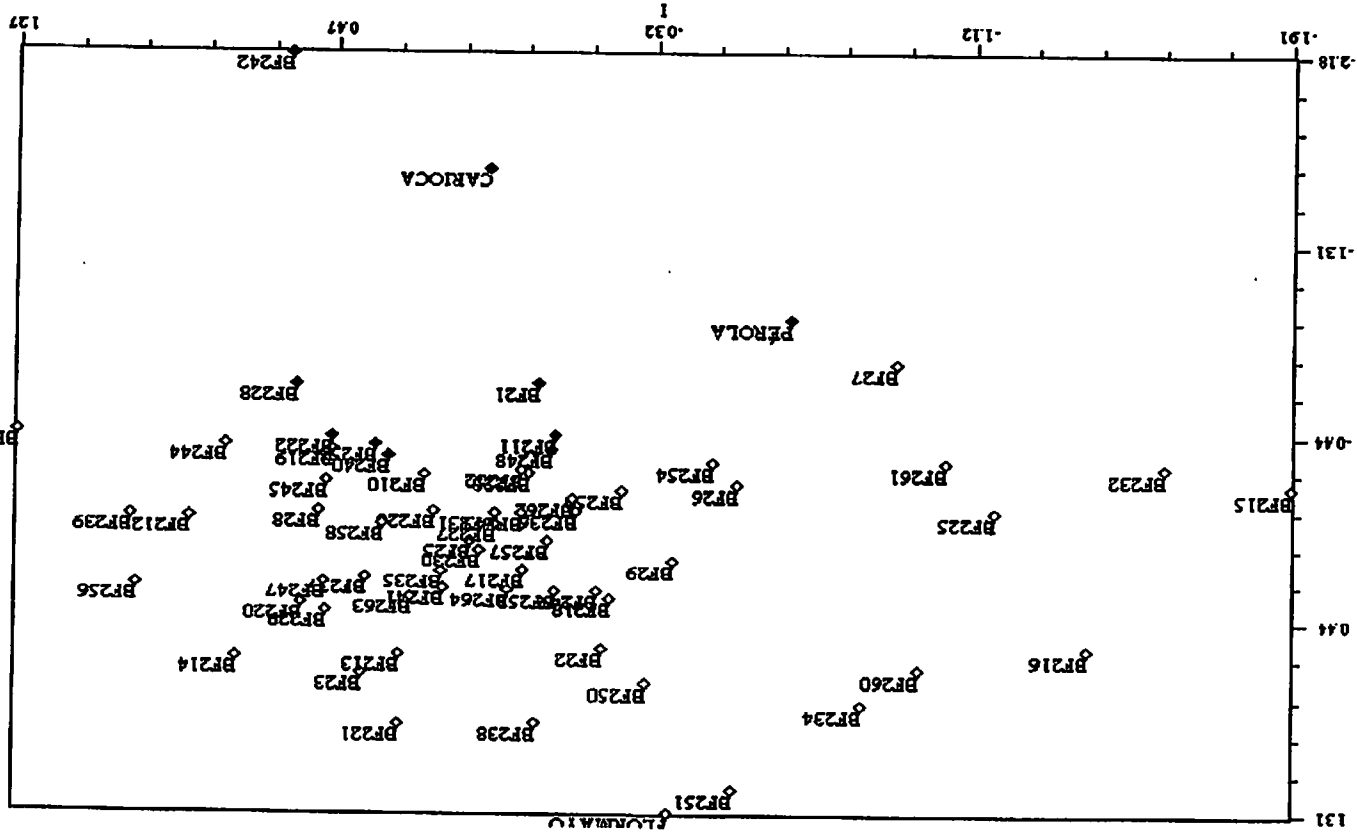


FIGURA 8 - Projção bidimensional das famílias do método da população, com base na similaridade genética, com destaque daquelas famílias com divergência da cultivar Carioca, no máximo igual à da cultivar Pérola (losangos cheios).



cultivar Pérola (losangos cheios).

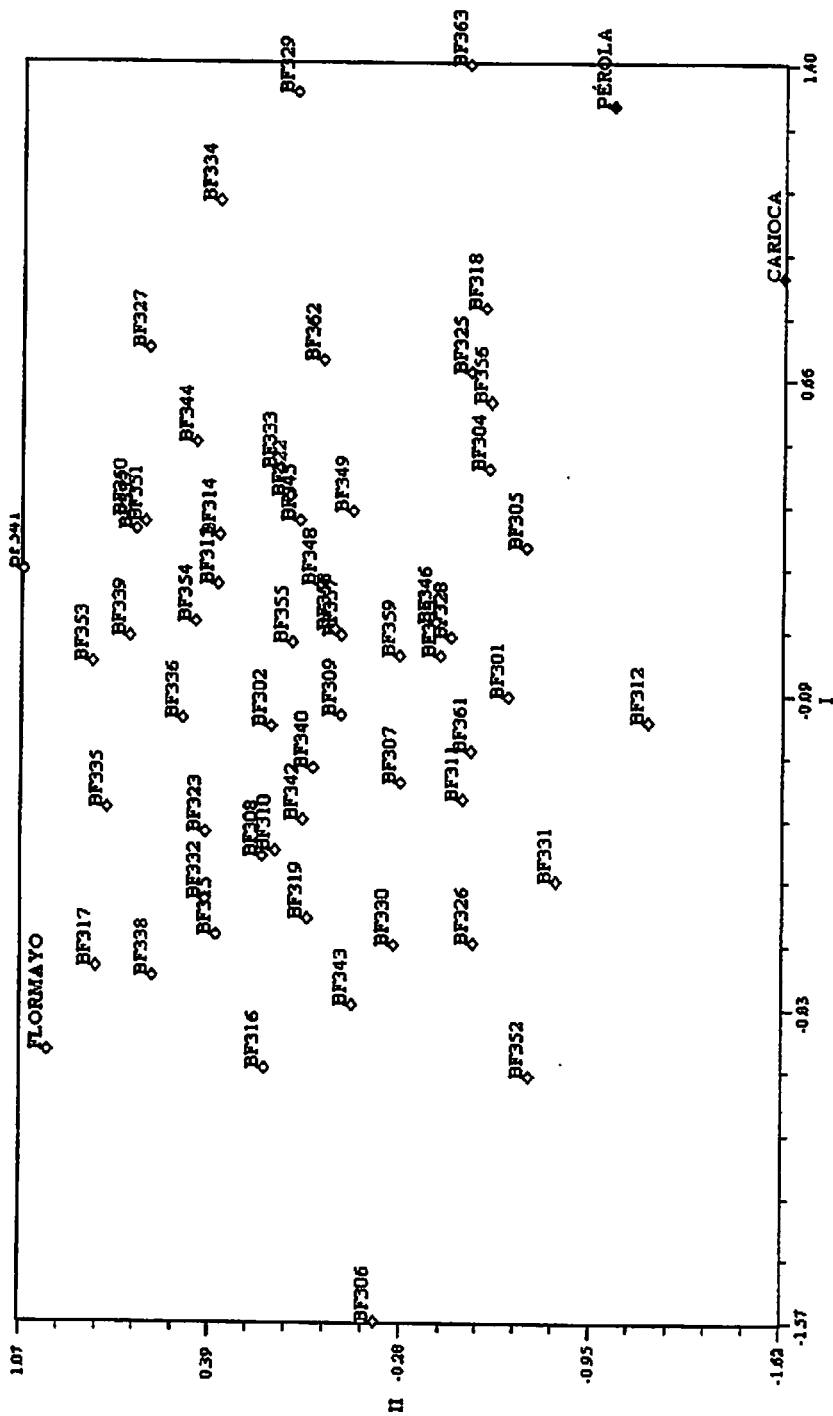


FIGURA 10 – Projeção bidimensional das famílias do método “bulk” dentro de famílias F<sub>3</sub>, com base na similaridade genética, com destaque daquelas famílias com divergência da cultivar Carioca, no máximo igual à da cultivar Pérola (losangos cheios).

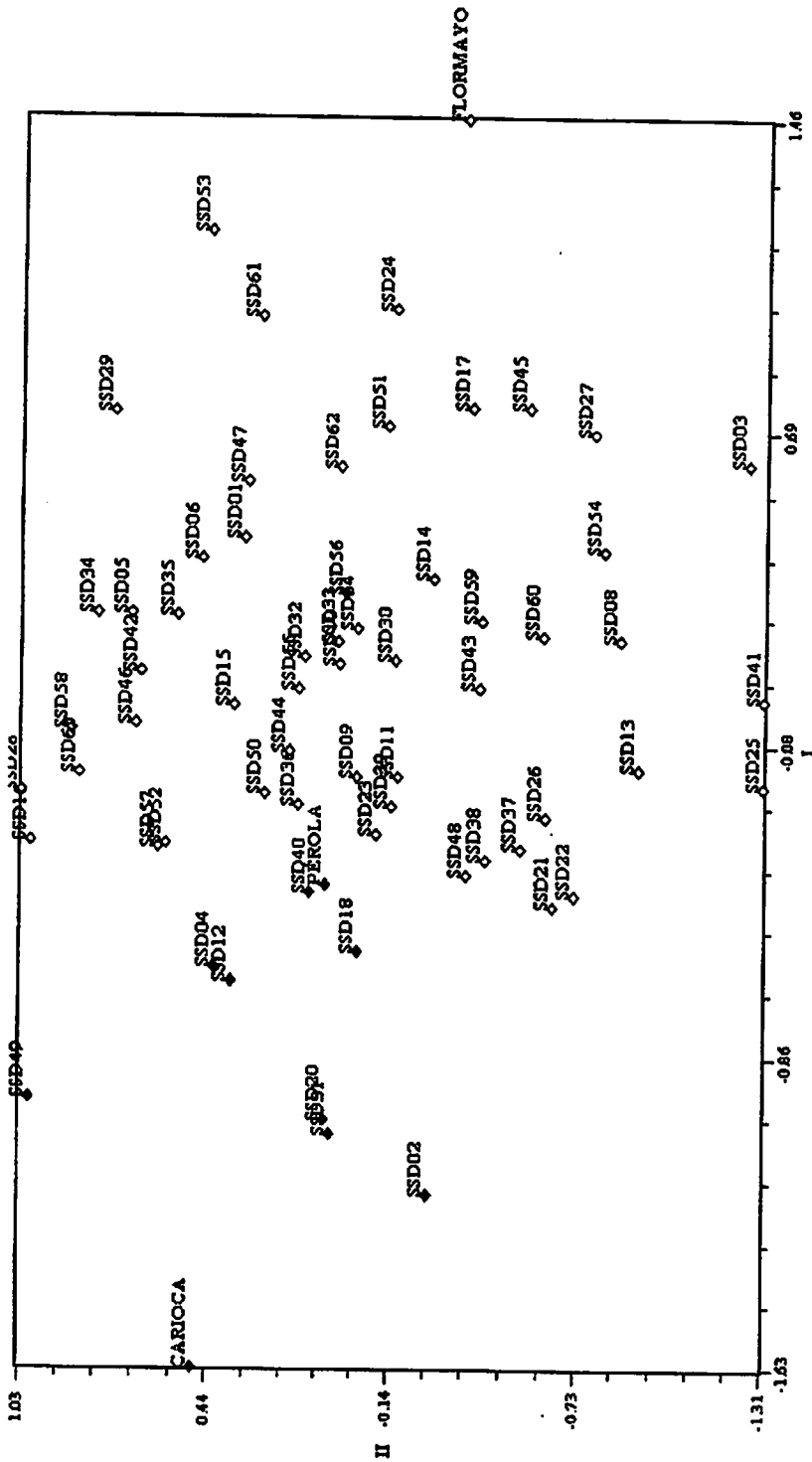


FIGURA 11 - Projeção bidimensional das famílias do método SSD, com base na similaridade genética, com destaque daquelas famílias com divergência da cultivar Carioca, no máximo igual à da cultivar Pérola (losangos chíticos).

Quando as famílias mais próximas à cultivar Carioca foram analisadas com base nos valores de similaridade, o resultado se mostrou um pouco diferente do apresentado pelos gráficos bidimensionais. Como já esperado, essas discordâncias ocorreram devido ao método de agrupamento usado e, principalmente, porque as similaridades representadas nas tabelas 4 a 8 foram estimadas apenas em relação à cultivar Carioca. Já nos gráficos, as duas dimensões envolveram todas as estimativas de similaridade.

No caso do método genealógico, a família P 62, que se encontra mais próxima à cultivar Carioca, de acordo com o gráfico, não se encontra entre as dez famílias com similaridades mais altas como mostra a tabela 4.

No método da população, algumas das famílias selecionadas pelo gráfico, encontram-se entre as dez com maiores similaridades, porém as famílias B 14, B 18, B 20, B 39 e B 41 não aparecem selecionadas no gráfico e as famílias B 04, B 05, B 29, B 36 e B 45 não aparecem entre as dez famílias com similaridades mais altas em relação à cultivar Carioca (Tabela 5).

No método do “bulk” dentro de famílias  $F_2$ , apenas duas das famílias selecionadas pelo gráfico,  $BF_2$  11 e  $BF_2$  55, encontram-se entre as dez com maiores similaridades e a maioria dessas famílias não se encontra selecionada no gráfico (Tabela 6).

Não houve nenhuma família considerada próxima à cultivar Carioca na análise do gráfico, para o método do “bulk” dentro de famílias  $F_3$  e as dez famílias com maior similaridades, em relação à cultivar Carioca, encontram-se na Tabela 7.

Para o método SSD, apenas as famílias SSD 12 e SSD 18, encontram-se entre as dez famílias com maiores similaridades e, também, encontram-se selecionadas no gráfico (Tabela 8).

TABELA 4 – Relação das dez famílias mais semelhantes e das dez famílias mais divergentes, em relação à cultivar Carioca, obtidas por meio do método genealógico, com suas respectivas produtividades de grãos.

Fam. mais similar	$S_{ij}$	g/parcela	Fam. mais diverg.	$S_{ij}$	g/parcela
P 63	0,666	576,234	FLOR DE MAYO	0	692,914
P 59	0,653	619,397	P 04	0,368	670,207
PÉROLA	0,651	628,708	P 45	0,378	553,216
P 35	0,612	550,462	P 37	0,381	593,646
P 53	0,609	510,589	P 60	0,381	510,692
P 64	0,583	424,339	P 02	0,389	680,493
P 20	0,578	608,592	P 30	0,390	562,473
P 21	0,578	604,345	P 56	0,400	629,514
P 32	0,577	675,395	P 40	0,410	584,552
P 58	0,571	582,171	P 51	0,418	566,501
MÉDIA	0,608	578,023		0,352	604,421

TABELA 5 - Relação das dez famílias mais semelhantes e das dez famílias mais divergentes, em relação à cultivar Carioca, obtidas por meio do método da população, com suas respectivas produtividades de grãos.

Fam. mais similar	$S_{ij}$	g/parcela	Fam. mais diverg.	$S_{ij}$	g/parcela
B 11	0,727	499,080	FLOR DE MAYO	0	629,914
B 07	0,682	597,916	B 48	0,138	604,626
B 25	0,682	605,376	B 56	0,231	686,860
B 09	0,667	565,578	B 50	0,233	634,319
B 39	0,653	682,750	B 62	0,333	601,156
PÉROLA	0,651	628,708	B 54	0,341	562,756
B 20	0,627	599,266	B 08	0,350	656,681
B 14	0,600	551,569	B 34	0,356	610,413
B 41	0,600	561,049	B 28	0,359	554,914
B 03	0,579	639,949	B 59	0,359	560,488
MÉDIA	0,647	593,124		0,270	616,513

TABELA 6 – Relação das dez famílias mais semelhantes e das dez famílias mais divergentes, em relação à cultivar Carioca, obtidas por meio do método “bulk”/F<sub>2</sub>, com suas respectivas produtividades de grãos.

Fam. mais similar	S <sub>ij</sub>	g/parcela	Fam. mais diverg.	S <sub>ij</sub>	g/parcela
BF <sub>2</sub>	0,679	602,949	FLOR DE MAYO	0	692,914
BF <sub>2</sub>	0,667	527,660	BF <sub>2</sub> 60	0,333	632,580
BF <sub>2</sub>	0,654	542,892	BF <sub>2</sub> 38	0,356	617,211
BF <sub>2</sub>	0,653	565,409	BF <sub>2</sub> 07	0,400	597,699
PÉROLA	0,651	628,708	BF <sub>2</sub> 25	0,400	614,975
BF <sub>2</sub>	0,640	495,108	BF <sub>2</sub> 03	0,409	701,673
BF <sub>2</sub>	0,640	646,174	BF <sub>2</sub> 16	0,421	570,819
BF <sub>2</sub>	0,640	625,338	BF <sub>2</sub> 32	0,421	689,922
BF <sub>2</sub>	0,630	577,799	BF <sub>2</sub> 34	0,429	512,714
BF <sub>2</sub>	0,627	594,354	BF <sub>2</sub> 51	0,432	669,458
MÉDIA	0,648	580,639		0,360	629,997

TABELA 7 - Relação das dez famílias mais semelhantes e das dez famílias mais divergentes, em relação à cultivar Carioca, obtidas por meio do método “bulk”/F<sub>3</sub>, com suas respectivas produtividades de grãos.

Fam. mais similar	S <sub>ij</sub>	g/parcela	Fam. mais diverg.	S <sub>ij</sub>	g/parcela
BF <sub>3</sub> 48	0,692	612,315	FLOR DE MAYO	0	692,914
PÉROLA	0,651	628,708	BF <sub>3</sub> 06	0,324	657,505
BF <sub>3</sub> 49	0,640	629,433	BF <sub>3</sub> 17	0,364	551,376
BF <sub>3</sub> 04	0,638	628,868	BF <sub>3</sub> 10	0,372	594,295
BF <sub>3</sub> 28	0,638	610,628	BF <sub>3</sub> 43	0,381	528,177
BF <sub>3</sub> 07	0,625	640,762	BF <sub>3</sub> 35	0,390	572,934
BF <sub>3</sub> 44	0,625	585,044	BF <sub>3</sub> 38	0,391	655,007
BF <sub>3</sub> 45	0,625	608,883	BF <sub>3</sub> 54	0,417	537,556
BF <sub>3</sub> 55	0,612	458,117	BF <sub>3</sub> 32	0,426	618,582
BF <sub>3</sub> 46	0,600	676,753	BF <sub>3</sub> 41	0,444	677,513
MÉDIA	0,635	607,951		0,351	608,513

**TABELA 8 – Relação das dez famílias mais semelhantes e das dez famílias mais divergentes, em relação à cultivar Carioca, obtidas por meio do método SSD, com suas respectivas produtividades de grãos.**

<b>Fam. mais similar</b>	<b>S<sub>ij</sub></b>	<b>g/parcela</b>	<b>Fam. mais diverg.</b>	<b>S<sub>ij</sub></b>	<b>g/parcela</b>
SSD 36	0,696	525,504	FLOR DE MAYO	0	692,914
SSD 12	0,652	409,280	SSD 03	0,278	742,164
PÉROLA	0,651	628,708	SSD 53	0,293	669,732
SSD 18	0,638	690,623	SSD 24	0,350	566,319
SSD 38	0,638	523,733	SSD 27	0,356	684,165
SSD 23	0,627	623,466	SSD 13	0,368	631,993
SSD 39	0,627	573,645	SSD 17	0,383	630,915
SSD 44	0,627	521,960	SSD 61	0,383	530,418
SSD 37	0,625	628,365	SSD 14	0,417	590,766
SSD 59	0,625	545,778	SSD 09	0,429	664,038
<b>MÉDIA</b>	<b>0,641</b>	<b>567,006</b>		<b>0,326</b>	<b>640,342</b>

Considerando as dez famílias mais similares à cultivar Carioca, em média os cinco métodos de condução da população segregante foram similares. Em relação às dez famílias menos similares, em média, o método da população foi o que gerou famílias mais divergentes em relação à cultivar Carioca.

Considerando a divergência entre as famílias geradas por cada método, novamente nota-se que o método da população gerou as famílias mais divergentes, com destaque àquelas mais similares à cultivar Carioca, que é uma das mais adaptadas à região.

É necessário mencionar que o efeito de cada método na condução da população segregante, ocorreu até a geração F<sub>4</sub>, quando foram amostradas plantas individuais. Cada planta gerou uma família e elas foram avaliadas em F<sub>5</sub>, sendo selecionadas as 64 com maior produtividade de grãos (Raposo, 1999). Portanto, a variabilidade identificada pelos marcadores refere-se àquela presente entre as famílias provenientes dessa seleção.

Teoricamente, espera-se que as magnitudes das variabilidades genéticas liberadas entre as famílias, em cada método de condução da população segregante sejam as apresentadas na Tabela 9 (Ramalho e Venkovsky, 1978).

TABELA 9 – Variância genética aditiva ( $\sigma^2_A$ ) e de dominância ( $\sigma^2_D$ ) esperadas entre as famílias  $F_5$ , provenientes de diferentes métodos de condução da população segregante.

MÉTODO	$\sigma^2_A$	$\sigma^2_D$
GENEALÓGICO	1,75 $\sigma^2_A$	0,109 $\sigma^2_D$
POPULAÇÃO	1,75 $\sigma^2_A$	0,109 $\sigma^2_D$
BULK/ $F_2$	1,00 $\sigma^2_A$	0,016 $\sigma^2_D$
BULK/ $F_3$	1,50 $\sigma^2_A$	0,047 $\sigma^2_D$
SSD	1,75 $\sigma^2_A$	0,109 $\sigma^2_D$

Observa-se, que entre os componentes da variância genética esperada entre famílias na geração  $F_5$ , a  $\sigma^2_A$  é predominante. Além disso a  $\sigma^2_A$  em geral é superior à  $\sigma^2_D$  para a maioria dos caracteres. Especificamente, em relação à similaridade genética, a parcela da variância genética devida aos efeitos aditivos, correspondente à similaridade genética geral (sgg) representa a quase totalidade (Tabelas A.7 a A.8). Em relação à produção de grãos em feijão, a variância genética aditiva, também tem sido constatada de magnitude superior à variância de dominância. (Ramalho, Santos e Zimmermann, 1993).

Dessa forma, espera-se que os métodos da população, SSD e genealógico sejam aqueles, que liberam maior variabilidade entre famílias, seguido dos métodos “bulk” dentro de famílias  $F_3$  e “bulk” dentro de famílias  $F_2$ , com o menor potencial.

Outro ponto que deve ser considerado é que alguns fatores podem afetar a variância genética liberada entre famílias provenientes dos diferentes métodos de condução. Entre eles, os problemas de amostragem inerentes a cada método. Esses problemas afetam o tamanho efetivo ( $N_e$ ) da população e conforme

salienta Raposo (1999), o método da população é um dos que sofre maior efeito de amostragem e o SSD é o único que não sofre esse efeito. Esse autor menciona que, na geração  $F_5$ , a  $N_e$  do método da população é de 0,55, enquanto a  $N_e$  do método SSD é de 16. O autor enfatiza, também, que é perfeitamente possível, no método da população, utilizar uma população com grande número de indivíduos, o que diminui a chance de perda por amostragem, por exemplo, como é freqüente no método da população, o emprego de 2000 plantas ou mais. E, em  $F_5$ , isso daria o tamanho efetivo de 1040 plantas, o que seria equivalente ao emprego de 65 plantas no método SSD.

Considerando os resultados de similaridade genética entre as famílias, provenientes dos diferentes métodos, eles são discordantes dos resultados esperados teoricamente. Entre eles, o método da população se destaca por liberar maior variabilidade e o SSD se classificou em terceiro lugar. O “bulk” dentro de  $F_2$ , esperado como o potencialmente menos eficiente, ficou em segundo lugar. Por outro lado, o método genealógico, esperado como um dos mais eficientes, ficou em último lugar.

Um aspecto interessante a se considerar é que os resultados da similaridade genética foram semelhantes aos resultados obtidos por Raposo (1999), que utilizou a produção de grãos, para avaliar o potencial dos diferentes métodos de condução da população segregante em liberar variação. O autor estimativas de variância genética e herdabilidade entre famílias (Tabela 10). Isso mostra que os marcadores utilizados fornecem informações semelhantes àquelas obtidas com base na produção de grãos. Assim, os resultados de similaridade genética e de produção de grãos mostram que o método da população foi o mais eficiente para liberar variabilidade, seguido, em ordem decrescente, do “bulk” dentro de famílias  $F_2$ , do SSD, “bulk” dentro de famílias  $F_3$  e genealógico (Tabelas 3 e 10).

O método da população se caracteriza por facilitar a condução da população segregante com o avanço das gerações, permitindo assim, utilizar maior número de indivíduos, os quais devem representar melhor a variabilidade genética liberada. Além disso, nesse método a seleção natural atua com intensidade máxima e se espera que sejam selecionados os indivíduos mais adaptados. Os presentes resultados mostram, como esperado, que o método em apreço foi o mais eficiente para liberar variabilidade da população e, principalmente, favorecer a obtenção de algumas famílias, provavelmente, mais adaptadas por serem mais semelhantes à cultivar Carioca.

Visando identificar a contribuição de cada família para a similaridade genética com as demais, os resultados da análise das similaridades, por meio do método dialélico, mostrou que a similaridade genética geral (s<sub>gg</sub>) representa a parcela predominante. Comparando as magnitudes do quadrado médio (QM) da s<sub>gg</sub>, com o QM da similaridade genética específica (s<sub>ge</sub>), no método da população, ela foi 51 vezes superior. No genealógico o QM da s<sub>gg</sub> foi 28 vezes superior, no “bulk” dentro de famílias F<sub>2</sub> foi 87 vezes superior, no “bulk” dentro de famílias F<sub>3</sub> foi 40 vezes superior e no SSD foi 36 vezes superior.

As correlações da s<sub>gg</sub> das famílias de cada método, com as respectivas produtividades de grãos, encontram-se na Tabela 10. A correlação positiva, observada para as famílias geradas pelo método da população, sugere a existência de associação do padrão de bandas com a produção de grãos. Isso significa que famílias com valores similares de s<sub>gg</sub> também possuem produções de grãos semelhantes. Assim, nota-se mais uma vez que o método da população favoreceu não só a produção de famílias mais divergentes, como também deve ter promovido a seleção daquelas mais adaptadas, em razão do método explorar os efeitos da seleção natural. Tal associação não foi detectada nos demais métodos, com exceção do genealógico em que ela foi baixa.

O fato de a correlação ter sido significativa para o método da população, também mostra que os QTLs identificados por Melo (2000), embora sejam de pequeno efeito, foram úteis para explicar, parcialmente, a produção de grãos.

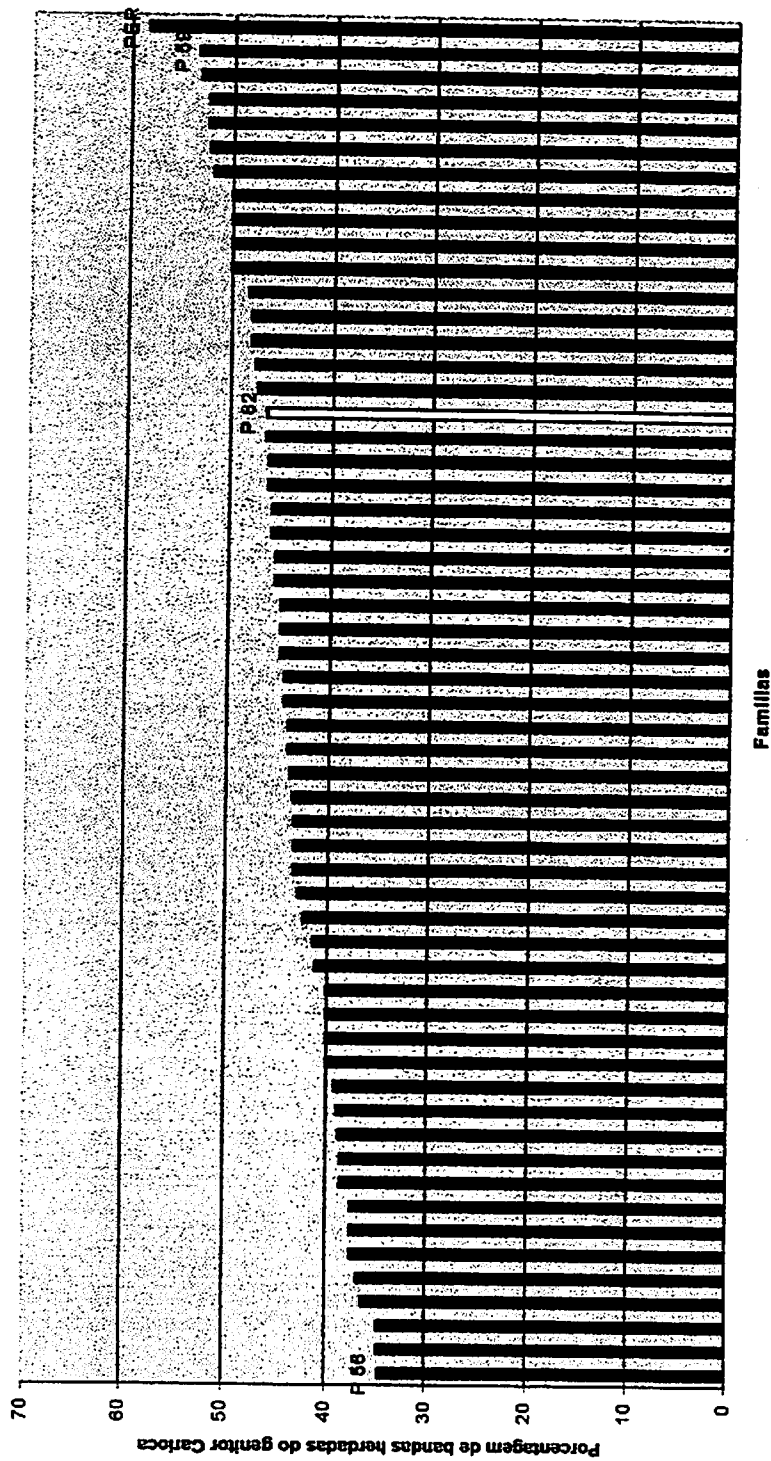
**TABELA 10** – Estimativas das correlações ( $r$ ) entre sgg e produção de grãos em gramas/parcela, relativas às famílias geradas em cada método de condução da população segregante, com as respectivas variâncias genéticas ( $\sigma^2_G$ ) e herdabilidade ( $h^2$ ) estimadas por Raposo (1999).

<b>MÉTODO</b>	<b>r</b>	<b><math>\sigma^2_G</math></b>	<b><math>h^2</math></b>
<b>POPULAÇÃO</b>	0,4860**	4314,85	57,15
<b>BULK/F<sub>2</sub></b>	0,1465 n.s.	3701,78	53,36
<b>BULK/F<sub>3</sub></b>	- 0,1647 n.s.	2214,88	40,64
<b>GENEALÓGICO</b>	- 0,2488*	1725,08	34,77
<b>SSD</b>	- 0,1333 n.s.	3642,90	52,96

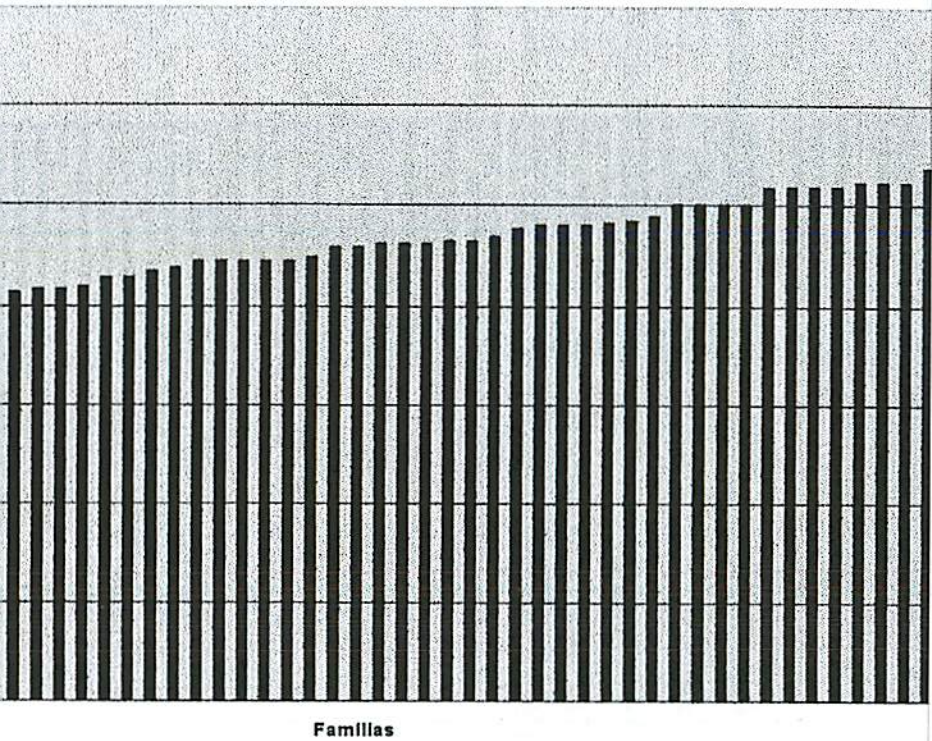
Além dos dados de similaridade, uma forma de inferir sobre a maior contribuição da seleção natural, no método da população, em comparação aos outros métodos, é verificar a proporção de bandas herdadas da cultivar Carioca, que é a mais adaptada em relação à cultivar Flor de Mayo (Figuras 12 a 16).

Em todos os gráficos, foi marcada também a cultivar Pérola, que possui apenas 58,33% das bandas em comum com a cultivar Carioca. As porcentagens médias de bandas herdadas da cultivar Carioca, para cada método, são: 44,22% no genealógico, 43,78% no método da população, 45,77% no método do “bulk” dentro de famílias F<sub>2</sub>, 44,97% no método do “bulk” dentro de famílias F<sub>3</sub>, 45,73% no método SSD. Em relação a esses valores, os métodos de condução praticamente não diferem. Entretanto, observa-se que a menor amplitude de proporção de bandas herdadas da cultivar Carioca, em relação à cultivar Flor de Mayo, ocorreu com as famílias do método genealógico (Figura 12). Isso era esperado, conforme salientado por Raposo (1999), devido a maior dificuldade de

condução da população por esse método, além de impedir a atuação da seleção natural. Ao contrário, no método da população, ocorreu a maior amplitude dessas proporções (figura 13). Nota-se ainda. Que a maioria das famílias identificadas como mais semelhantes à cultivar Carioca, na figura 8, possui as maiores proporções de bandas provenientes desse genitor. Em relação aos demais métodos, nota-se uma situação intermediária.



**FIGURA 12** – Porcentagem relativa da presença de bandas provenientes da cultivar Carioca, em relação ao total de bandas, provenientes das duas cultivares genitores, nas famílias obtidas pelo método genealógico. A cultivar Pérola corresponde à barra PER, e a barra vazia corresponde à família mais semelhante à cultivar Carioca, identificada na figura 7.



de bandas provenientes da cultivar Carioca, em relação ao total de duas cultivares genitoras, nas famílias obtidas pelo método "bulk" d  
 ivar Pérola corresponde à barra PER.

49

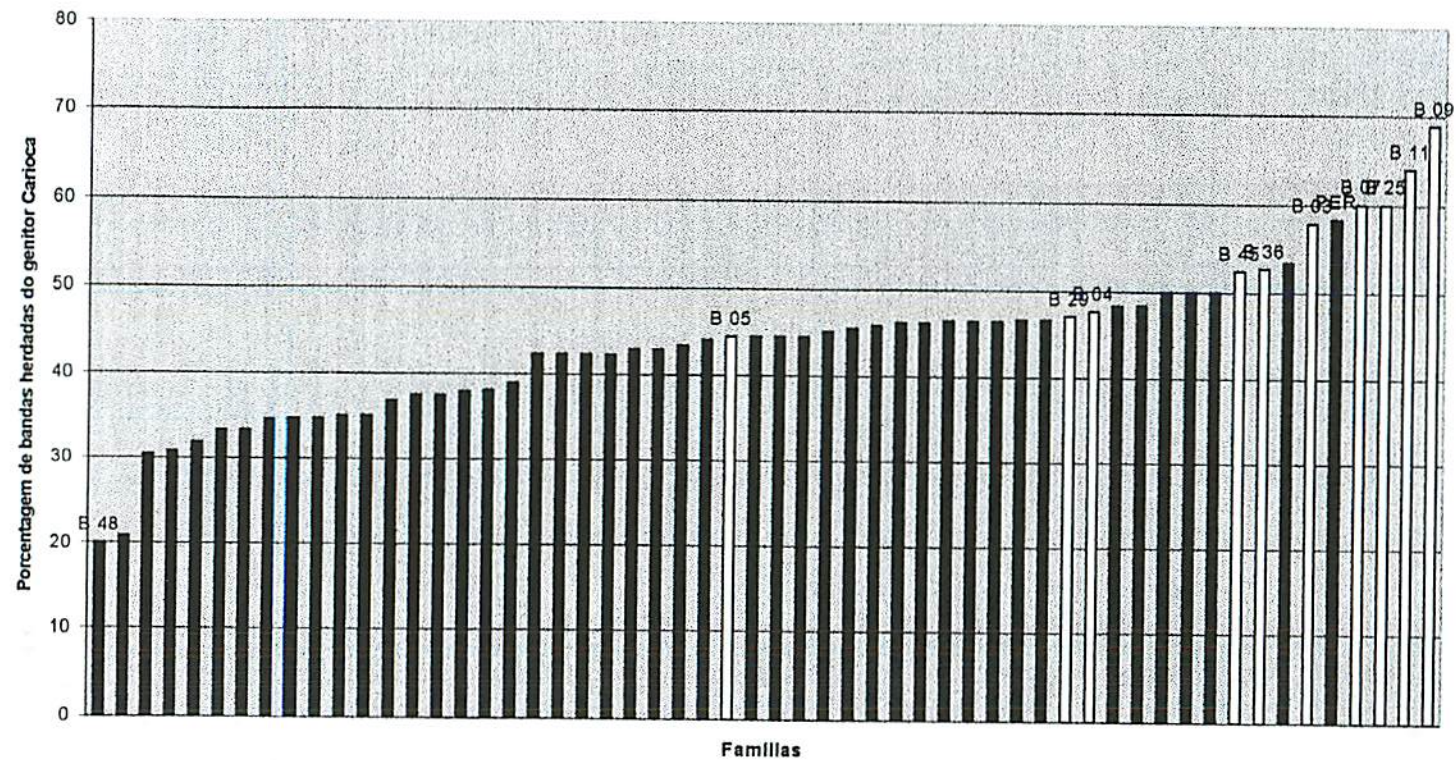
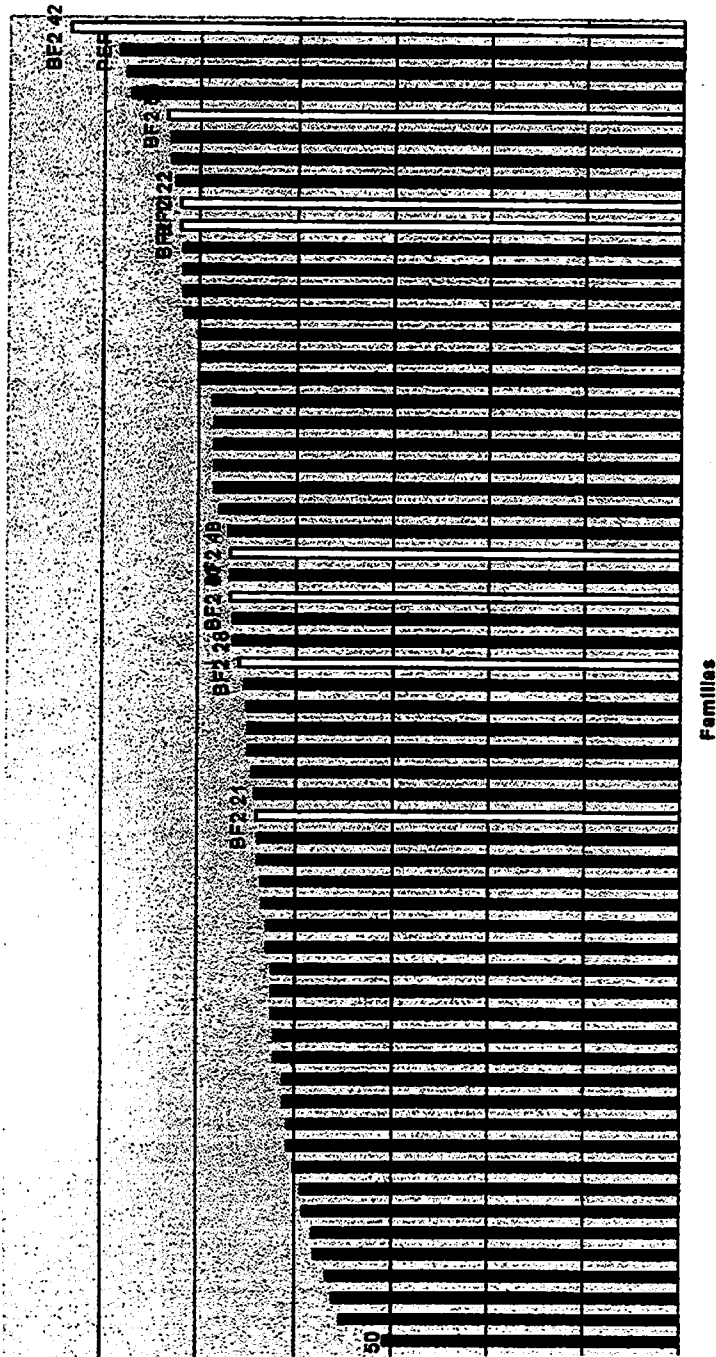


FIGURA 13 – Porcentagem relativa da presença de bandas provenientes da cultivar Carioca, em relação ao total de bandas, provenientes das duas cultivares genitoras, nas famílias obtidas pelo método da população. A cultivar Pérola corresponde à barra PER, e as barras vazias correspondem às famílias mais semelhantes à cultivar Carioca, identificadas na figura 8.



A 14 - Porcentagem relativa da presença de bandas provenientes da cultivar Carioca, em relação ao total de bandas, provenientes das duas cultivares genitoras, nas famílias obtidas pelo método "bulk" dentro de famílias F<sub>2</sub>. A cultivar Pérola corresponde à barra PER, e as barras vazias correspondem às famílias mais semelhantes à cultivar Carioca, identificadas na figura 9.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, A. DE F.B. Predição do potencial genético de populações segregantes do feijoeiro utilizando genitores inter-raciais. Lavras: UFLA, 1997. 79p. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- AJMONE MARSAN, P.; CASTIGLIONE, P.; FUSARI, F.; et al. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlim, v.96, n.2, p.219-227, Feb, 1997.
- ALBERINI, J. L. Characteristics of soybean bulk populations grown in different environments. Arkansas: University of Arkansas, 1977, 54p.
- ALMEIDA, L. A. de; KIHHL, R. A. de S.; ABDELNOOR, R. V. Melhoramento da soja. In: SIMPÓSIO SOBRE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1997, Lavras, Anais... Lavras: UFLA, p.11-55, 1997.
- ALMEIDA, L. D' A. de; LEITÃO FILHO, H. F.; MIYASAKA, S. Características do feijão carioca, um novo cultivar. *Bragantina*, Campinas, v.30, n.7, p.33-38, abr.1971.
- ALLARD, R. W. Princípios do melhoramento genético de plantas. São Paulo: Edgard Blücher, 1971, 381p.
- ALLARD, R. W. Genetic changes associated with the evolution adaptiveness in cultivated plants and their wild ancestors.

- BECKMANN, J. S.; SOLLER, M. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Biotechnology*, v.8,p.930-932, 1990.
- BOERMA, H. H.; COOPER, R. I. Comparison of three selection procedures for yield in soybeans. *Crop Science, Madison*, v.15, p.225-229, mar./apr. 1975.
- BORÉM, A. *Melhoramento de plantas*. Viçosa: UFV, 1997.547p.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetic* v.32, p.314-331, 1980.
- BRIGGS, F. N.; KNOWLES, P. F. *Introduction to Plant Breeding*. New York: Reinhold Publishing Corporation. 426p. 1967.
- BRIM, C. A. A modified pedigree method of selection in soybeans. *Crop Science, Madison*, v.6, n.2, p.220, mar./apr. 1966.
- ✓ CORTE, H. R. *Comportamento de populações segregantes de feijão, avançadas pelo método do "bulk", por dezessete gerações*. Lavras: UFLA, 1999. 95p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- CORTE, H. R.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. DE F. B. Ganho genético com a seleção natural após 10 gerações de endogamia em populações segregantes do feijoeiro, p.353 CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 43, 1997, Goiânia, 1997. *Anais...* Goiânia, 1997.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Viçosa: UFV, 1997. 390p.
- CRUZ, P. J.; CARVALHO, F. I. F. DE; FEDERIZZI, L. C. Efeitos de populações e métodos de seleção aplicados em geração segregante de trigo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.18, n.5, p.533-541, maio, 1983.
- CUTRIM, V. dos A.; RAMALHO, M. A. P.; CARVALHO, A.M. Eficiência da seleção visual na produtividade de grãos de arroz (*Oryza sativa* L.) irrigado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.32, n.6, p.601-606, jun. 1997.

- 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).
- ELLIOT, F. C.** Plant Breeding and Cytogenetics New York: McGraw-Hill Book Company, Inc. 195p. 1958.
- EMPIG, L. T.; FEHR, W. R.** Evaluation of methods for generation advance in bulk hybrid soybean populations. *Crop Science*. v.11, p.51-54. 1971.
- FASOULAS, A.** A new approach to breeding superior yielding varieties. Thessaloniki: Aristotelian University of Thessaloniki/Dept. of Genetics and Plant Breeding, 1973, n.3, 42p.
- FEHR, W. R.** Principles of cultivar development. New York: MacMillan, 1987. 525p.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D.** Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220P.
- FLORELL, V. H.** Bulk population method of handling cereal hybrids. *Journal American Soc Agronomics*. v.21, p.718-724, 1929.
- FOULOUX, G.; BANNEROT, H.** Selection methods in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) In: GEPTS, P. Genetic resources of *Phaseolus vulgaris* beans. Dordrecht: Kluwer Academic, 1988. p.215-241.
- FREY, K. J.** The use of F<sub>2</sub> lines in predicting the performance of F<sub>3</sub> selections in two barley cross. *Agronomy Journal*, Madison, v.46, p.541-544, 1954.
- GILL, S. S.; VIEIRA, M. M.; GUMBER, R. K.; BRAM, J.S.** Comparative efficiency of four selection methods for deriving high-yielding lines in mungbean (*Vigna radiata* L.) *Theoretical and Applied Genetics*, v.90, p.554-560, 1995.
- GONÇALVES, F. M. A.** Seleção natural em populações segregantes do feijoeiro. Lavras: UFLA, 2000. 98p. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- GOULDEN, C. H.** Problems in plant selection. INTERNATIONAL GENETICS CONGRESS, 7, 1939, Edimburgh Proceedings... Edimburgh: Cambridge University Press. p.132-133. 1939.

- GRIFING, J. B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel systems. *Australian Journal of Genetics and Plant Breeding*, New Delhi, v.51, n.4, p.448-453, 1956.
- GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* v.39, p.439-446, 1974.
- HALWARD, T.; STALKER, T.; LARUE, E.; KOCHERT, G. Use of single-primer DNA amplifications in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Mol Biol.*, v.18, p.315-325, 1992.
- HU, J.; QUIROS, C. F. Identification of brocoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Report*, Berlin, v.10, p.505-511, 1991.
- INAGAKI, M. N.; VARUGHESE, G.; RAJARAM, S. et al., Comparison of bread wheat lines selected by doubled haploid, single seed descendent and pedigree selection methods. *Theoretical and Applied Genetics*, v.97, p.550-556, 1998.
- JUNQUEIRA NETO, A.; LASMAR FILHO, J. Taxa de alogamia do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em Lavras, Minas Gerais. *Agros, Lavras*, v.1, n.1, p.19-21, jan. 1971.
- KESSELI, R. V.; PARAN, I.; MICHELMORE, R. Efficient mapping of specifically targeted genomic regions and the tagging of these regions with reliable PCR - based genetic markers. In: *APPLICATIONS OF RAPD TECHNOLOGY TO PLANT BREEDING*, Minneapolis, 1992. *Proceedings...Minneapolis: Crop Science Society of America*, 1992. P.31-36.
- LOVE, H. H. A program for selecting and testing small grain in successive generations following hybridization. *Journal American Soc Agronomy*, v.19, p.705-712, 1927.
- MACHADO, C. F. *Procedimentos para a escolha de genitores de feijão*. Lavras: UFLA, 1999. 118p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- MALLMANN, J. L.; BARBOSA NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F. DE; FEDERIZZI, L. C. Mecanismos de seleção aplicados sobre o caráter tamanho

- de grãos em populações segregantes de trigo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.29, n.3, p.427-437, março, 1994.
- MARQUES JÚNIOR, O. G.; RAMALHO, M. A. P. Determinação da taxa de fecundação cruzada do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) nas diferentes épocas de semeadura em Lavras-MG. *Ciência e Prática*, Lavras, v.19, n.3, p.339-341, jul./set. 1995.
- MELO, L. C. Mapeamento de QTLs em feijoeiro, por meio de marcadores RAPD, em diferentes ambientes. Lavras: UFLA, 2000. 148p. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- MISHRA, D. K.; SINGH, C. B.; RAO, S. K. Effectiveness of different selection methods in segregating populations of rice (*O. sativa* L.) in ARC 10372 x IR 36 in different environments. *Indian Journal of Genetics*, v.54, n.4, p.402-408, 1994.
- MOHAN, M.; NAIR, S.; BHAGWAT, A.; KRISHNA, T. G.; YANO, M.; BATHIA, C. R.; SASAKI, T. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding*. V.3, n.2, 1997.
- MORAIS, O. P. Análise da divergência genética dos progenitores, índices de seleção e seleção combinada numa população de arroz oriunda de intercruzamentos usando macho-esterilidade. Viçosa: UFV, 1992. 251p. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento).
- MOSS, D. W. Isoenzymes. 1982, Capman & Hall, London & New York.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*. New York, v.55, p.335-350, 1987.
- MUNIZ, J. A. Inferência sobre parâmetros relativos à estrutura genética de populações com dados de frequências gênicas. Piracicaba: ESALQ/USP, 1994. 223p. (Tese - Doutorado em Estatística e Experimentação Agronômica).
- NEWBURY, H. J.; FORD-LLOYD, B. V. The use of RAPD for assessing variation in plants. *Plant Growth Regul.*, v.12, p.43-51, 1993.

- NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SCKROCH, P.; SANTOS, J. B. DOS. Genetic relationships among cultivars and lines of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.120, n.2, p.300-306, 1995.
- OBIESAN, I. O. Evaluation of pedigree and single seed descendent selection methods for cultivar development in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Plant Breeding*, Cambridge, v.108, n.2, p.162-167, 1992.
- ORTEGA, V. S. Polinización cruzada natural de la caraota. (*P. vulgaris* L.) en Venezuela. *Agronomía Tropical*, Maracay, v.24, n.3, p.227-232, mai./jun. 1974.
- PATIÑO, H.; SINGH, S. P. Visual selection for seed yield in the F<sub>2</sub> and F<sub>3</sub> generation of nine common bean crosses. *Annual Report Bean Improvement Cooperative*. New York, v.32, p.79-80. 1989.
- PEREIRA FILHO, T. A.; CAVARANI, C. Taxa de hibridação natural do feijoeiro comum em Patos de Minas, Minas Gerais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.19, n.9, p.1181-1183, set.1984.
- RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. A. B. P. *Genética na Agropecuária*. Ed. UFLA, 2001. 2 ed. (no prelo).
- RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; ZIMMERMANN, M. J. DE O. *Genética quantitativa em plantas autógamas: aplicações ao melhoramento do feijoeiro*. Goiânia: UFG, 1993. 271p.
- RAMALHO, M. A. P.; VENCovsky, R. estimação dos componentes da variância genética em plantas autógamas. *Ciência e Prática*. Lavras, v.2, n.2, p.117-140, 1978.
- RANALLI, P.; RUARO, G.; DEL RE, P.; FAETI, V. Comparison of early generation yield testing and a single seed descendent procedure in two bean (*Phaseolus vulgaris* L.) crosses. *Journal Genet e Breed*, Italy, v.50, n.2, p.103-108, 1996.
- RAPOSO, F. V. *Comparação de métodos de condução de população segregante na cultura do feijoeiro*. Lavras: UFLA, 1999. 73p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

- ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis sistem.** New York, 1992, 470p.
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOEFFEL, S.; SHCARF, S. J.; HIGUCHI, G.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. **Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.** *Science, Washington*, v.239, n.4839, p.487-491, jan. 1988.
- SAKYAMA, N. S. **Marcadores moleculares e as hortaliças.** *Horticultura Brasileira, Brasília*, v.20, n.10, p.1203-1211, out.1993.
- SILVA, H. D.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. DE F. B.; MARTINS, L. A. **Efeito da seleção precoce para produtividade de grãos em populações segregantes do feijoeiro** *Ciência e Prática, Lavras*, v.8, n.2, p.181-185, abr./jun. 1994.
- SINGH, R. P.; RAJARAM, S.; MIRANDA, A.; HUERTA-ESPINO, J.; AUTRIQUE, E. **Comparison of two crossing and four selection schemes for yield, yield traits, and slow rusting resistance to leaf rust in wheat.** *Euphytica, Wageningen*, v.100, n.2, p.35-43, 1998.
- 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.
- STILES, J. I.; LEMME, C.; SONBUR, S.; MORSHIDI, M. B.; MANSCHARDT, R. **Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars.** *Theoretical and Applied Genetics*, v.14, p.748-749, 751. 1993.
- TEE, T. S.; QUALSET, C. O. **Bulk populations in wheat breeding: comparison of single seed descendent and random bulk methods.** *Euphytica, Wageningen*, v.24, p.393-405, 1975.
- 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.

- URREA, C. A.; SINGH, S.P Comparison of mass, f2 - derived family, and single seed descendent selection method in an interracial population of common bean. **Canadian Journal of Plant Science**, v.74, p.461-464, 1994.
- VOIGT, R. L.; WEBER, C. R. Effectiveness of selection methods for yield in soybean crosses. **Agronomy Journal**, Madison, v.52, n.9, sep. 1960.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.
- WILDE, J.; WAUGH, R.; POWELL, W. Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.83, p.871-877, 1992.
- WILKIE, S. E.; ISAAC, P. G.; SLATER, R. J. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p.497-504, 1993.
- WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p.6531-6535, 1990.
- ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. **European Patent Application 0534858 A1**, 1993.

## ANEXOS

	Página
TABELA 1A - Primers utilizados e número de bandas formadas no padrão de cada um dos genitores.....	63
TABELA 2A - Matriz de 0 e 1 obtida pelo padrão de bandas das famílias do método genealógico.....	64
TABELA 3A - Matriz de 0 e 1 obtida pelo padrão de bandas das famílias do método da população.....	66
TABELA 4A - Matriz de 0 e 1 obtida pelo padrão de bandas das famílias do método "bulk" dentro de famílias $F_2$ .....	68
TABELA 5A - Matriz de 0 e 1 obtida pelo padrão de bandas das famílias do método "bulk" dentro de famílias $F_3$ .....	70
TABELA 6A - Matriz de 0 e 1 obtida pelo padrão de bandas das famílias do método SSD.....	72
TABELA 7A - Resumo da análise de variância das similaridades genéticas ( $sg_{ij}$ ) entre as famílias geradas pelo método genealógico com a decomposição da variação entre $sg_{ij}$ em efeitos geral (s <sub>gg</sub> ) e específico (s <sub>ge</sub> ).....	74
TABELA 8A - Resumo da análise de variância das similaridades genéticas ( $sg_{ij}$ ) entre as famílias geradas pelo método da população com a decomposição da variação entre $sg_{ij}$ em efeitos geral (s <sub>gg</sub> ) e específico (s <sub>ge</sub> ).....	74
TABELA 9A - Resumo da análise de variância das similaridades genéticas ( $sg_{ij}$ ) entre as famílias geradas pelo método "bulk" dentro de famílias $F_2$ com a decomposição da variação entre $sg_{ij}$ em efeitos geral (s <sub>gg</sub> ) e específico (s <sub>ge</sub> ).....	74
TABELA 10A - Resumo da análise de variância das similaridades genéticas ( $sg_{ij}$ ) entre as famílias geradas pelo método "bulk" dentro de famílias $F_3$ com a decomposição da variação entre $sg_{ij}$ em efeitos geral (s <sub>gg</sub> ) e específico (s <sub>ge</sub> ).....	75
TABELA 11A - Resumo da análise de variância das similaridades genéticas ( $sg_{ij}$ ) entre as famílias geradas pelo método SSD com a decomposição da variação entre $sg_{ij}$ em efeitos geral (s <sub>gg</sub> ) e específico (s <sub>ge</sub> ).....	75

TABELA 1A - Primers utilizados e número de bandas formadas no padrão de cada um dos genitores

PRIMERS	BANDAS POLIMÓRFICAS		
	CARIOCA	FLOR DE MAYO	TOTAL
OPB 18	1	0	1
OPE 20	0	1	1
OPF 10	0	1	1
OPG 04	1	1	2
OPG 16	1	2	3
OPG 19	1	1	2
OPH 03	3	0	3
OPI 06	0	1	1
OPI 07	1	2	3
OPJ 04	1	1	2
OPM 06	2	2	4
OPN 02	1	1	2
OPN 07	2	2	4
OPN 10	0	1	1
OPO 02	0	2	2
OPO 10	1	0	1
OPO 12	2	0	2
OPO 13	1	0	1
OPO 19	1	0	1
OPO 20	0	1	1
POR 12	0	1	1
OPS 10	1	1	2
OPW 11	0	1	1





















**TABELA 7A – Resumo da análise de variância das similaridades genéticas ( $sg_{ij}$ ) entre as famílias geradas pelo método genealógico com a decomposição da variação entre  $sg_{ij}$  em efeitos geral (s $gg$ ) e específico (s $ge$ ).**

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>
<b>Similaridade genética</b>	1710	17,422	0,010
<b>s<math>gg</math></b>	58	8,711	0,150**
<b>s<math>ge</math></b>	1652	8,711	0,005
<b>Resíduo</b>	1711	135,340	0,079

\*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

**TABELA 8A – Resumo da análise de variância das similaridades genéticas ( $sg_{ij}$ ) entre as famílias geradas pelo método da população com a decomposição da variação entre  $sg_{ij}$  em efeitos geral (s $gg$ ) e específico (s $ge$ ).**

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>
<b>Similaridade genética</b>	1652	26,205	0,016
<b>s<math>gg</math></b>	57	16,939	0,297**
<b>s<math>ge</math></b>	1595	9,266	0,006
<b>Resíduo</b>	1653	133,893	0,081

\*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

TABELA 9A – Resumo da análise de variância das similaridades genéticas ( $sg_{ij}$ ) entre as famílias geradas pelo método “bulk” dentro de  $F_2$  com a decomposição da variação entre  $sg_{ij}$  em efeitos geral (s $gg$ ) e específico (s $ge$ ).

FV	GL	SQ	QM
Similaridade genética	2015	29,021	0,014
s $gg$	63	21,437	0,340**
s $ge$	1952	7,583	0,004
Resíduo	1956	148,656	0,076

\*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

TABELA 10A – Resumo da análise de variância das similaridades genéticas ( $sg_{ij}$ ) entre as famílias geradas pelo método “bulk” dentro de  $F_3$  com a decomposição da variação entre  $sg_{ij}$  em efeitos geral (s $gg$ ) e específico (s $ge$ ).

FV	GL	SQ	QM
Similaridade genética	1829	14,451	0,008
s $gg$	60	8,348	0,139*
s $ge$	1769	6,103	0,003
Resíduo	1830	140,178	0,077

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

**TABELA 11A – Resumo da análise de variância das similaridades genéticas ( $sg_{ij}$ ) entre as famílias geradas pelo método SSD com a decomposição da variação entre  $sg_{ij}$  em efeitos geral (s $gg$ ) e específico (s $ge$ ).**

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>
<b>Similaridade genética</b>	2079	15,559	0,007
<b>s<math>gg</math></b>	64	8,151	0,127*
<b>s<math>ge</math></b>	2015	7,408	0,004
<b>Resíduo</b>	2080	160,368	0,077

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.