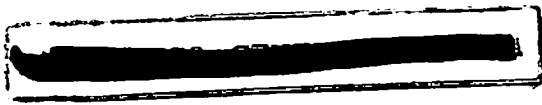




**SIMILARIDADE GENÉTICA DE LINHAGENS  
DE FEIJÃO, SELECIONADAS NAS  
CULTIVARES CARIOCA E PÉROLA,  
UTILIZANDO MARCADORES RAPD**

**MARCUS VANNER CARVALHO DE OLIVEIRA**

**2002**



54223

MFN04611

**MARCUS VANNER CARVALHO DE OLIVEIRA**

**SIMILARIDADE GENÉTICA DE LINHAGENS DE FEIJÃO,  
SELECIONADAS NAS CULTIVARES CARIOCA E PÉROLA,  
UTILIZANDO MARCADORES RAPD**

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

Orientador

Dr. João Bosco dos Santos

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

2002



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

Oliveira, Marcus Vanner Carvalho de

Similaridade genética de linhagens de feijão, selecionadas nas cultivares carioca e Pérola, utilizando marcadores RAPD / Marcus Vanner Carvalho de Oliveira. -- Lavras : UFLA, 2002.

47 p. : il.

Orientador: João Bosco dos Santos.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia

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

CDD-635.65223

**MARCUS VANNER CARVALHO DE OLIVEIRA**

**SIMILARIDADE GENÉTICA DE LINHAGENS DE FEIJÃO,  
SELECIONADAS NAS CULTIVARES CARIOCA E PÉROLA,  
UTILIZANDO MARCADORES RAPD**

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


APROVADA em 06 de Setembro de 2002

Dra. Ângela de Fátima Barbosa Abreu

EMBRAPA

Profa. Dra. Giovana Augusta Torres

UFLA

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

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

**Este trabalho é dedicado aos meus pais,  
Luiz Edson Motta de Oliveira e  
Mirlene Carvalho de Oliveira  
e a minha irmã, Ana Luiza.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus;

Aos meus pais, pela firmeza de caráter, pelo exemplo de perseverança ao longo do mestrado e por toda a minha vida. Este trabalho também é um pouco de vocês.

Ao professor João Bosco dos Santos, por sua orientação, com o qual aprendi muito nesses últimos dois anos. Fico grato pelo privilégio de poder contar com a sua orientação, tendo-o como exemplo de profissional a ser seguido.

Aos membros da banca, Ângela de Fátima Barbosa Abreu e Giovana Augusta Torres, por terem aceitado participar deste momento tão importante para mim.

Aos amigos do Laboratório, que ao longo de todo esse tempo me ajudaram a terminar este trabalho de forma satisfatória, sem os quais a estada no laboratório teria sido, com certeza, menos gratificante.

Aos colegas de Pós-Graduação, pela amizade e pela gratificante convivência .

À secretária Elaine e aos demais funcionários do Departamento de Biologia, que com seu apoio logístico, tiveram uma participação decisiva, para que esse trabalho fosse concluído com sucesso.

Obrigado a todos vocês que de forma direta ou indireta contribuíram para que este trabalho fosse concluído com sucesso.

# SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Origem do feijão.....	3
2.2 Biologia floral.....	4
2.3 Cultivar carioca.....	6
2.4 Métodos de Melhoramento em Feijão.....	8
2.4.1 Seleção de Linhas Puras.....	8
2.5 Marcadores Genéticos.....	12
2.5.1. Marcadores PCR e RAPD.....	15
2.6 Avaliação da Diversidade Genética por meio de Marcadores RAPD.....	18
2.6.1 Coeficientes de Similaridade Usado em Estudo com Marcadores RAPD.....	19
2.6.2 Análise de Agrupamentos.....	21
2.7 Estimativas de Similaridade/Distância Genética.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Local.....	25
3.2 Material Utilizado.....	25
3.3 Extração de DNA.....	26
3.4 Análise de RAPD.....	27
3.5 Análise da similaridade genética.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 RAPD.....	31
4.2 Similaridade Genética.....	32

5 CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
ANEXOS.....	55

## RESUMO

**OLIVEIRA, Marcus Vanner Carvalho de. Similaridade genética de linhagens de feijão, selecionadas nas cultivares Carioca e Pérola, utilizando Marcadores RAPD. 2002. 67 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\***

O feijão é uma planta autógama e, como tal, possui baixa taxa de fecundação cruzada, em torno de 0,5%. No entanto, apesar da baixa taxa de cruzamento, as misturas de cultivares e as mutações, em uma extensa área plantada, contribuem para gerar variabilidade dentro das cultivares, que pode ser utilizada no melhoramento. Então, o objetivo do trabalho foi fazer uma avaliação prévia dessa variabilidade, por meio da similaridade genética estimada a partir de marcadores RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA). Foram utilizadas 98 linhagens de feijão selecionadas dentro das cultivares Carioca e Pérola, na região de Sete Lagoas – MG. Foram obtidas 81 bandas polimórficas de RAPD e estimada a similaridade genética por meio do método de Nei Li. Utilizou-se o método UPGMA na análise de agrupamento e constatou-se ampla variabilidade genética nas linhagens, principalmente, daquelas selecionadas na cultivar Carioca. A acentuada divergência genética de mais de 50 % das linhagens indicam que a cultivar Carioca utilizada pelo agricultor é completamente diferente da cultivar original. Além disso, há grandes chances de sucesso com seleção de linhas puras dentro da cultivar Carioca utilizada pelos agricultores.

---

\* Comitê de Orientação: João Bosco dos Santos – UFLA (Orientador)

## ABSTRACT

**OLIVEIRA, Marcus Vanner Carvalho de. Genetic similarity of common bean lines, selected from the Carioca and Pérola cultivars, based on RAPD Markers. 2002. 67 p. (Dissertation – Master's degree in Genetics and Improvement of Plants) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\***

The common bean is a self-pollinated species, and as such, it possesses a low rate of cross - pollination, around 0.5%. However, besides the low crossing rate, the mixtures of cultivars and lines, and the mutations in a large planted area, contribute to generate variability in the cultivars, that can be selected in common bean breeding. The objective of this research was to do a previous evaluation of genetic variability, through the genetic similarity based on RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) markers. Ninety eight common bean lines were selected from Carioca and Pérola cultivars used in farms located at Sete Lagoas – MG county. There were obtained 81 polimorphic RAPD bands that were used for estimating the genetic similarity through Nei Li's method, and grouped by UPGMA procedure to generate a dendrogram. The lines presented a wide genetic variability, mainly those selected from Carioca cultivar. Therefore, the Carioca cultivar used by the farmers is completely different from the original one. Besides, there is great chance to select superior lines from that cultivar. Less variability was observed among the lines from Pérola cultivar, which is a newer cultivar than Carioca.

---

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

# 1 INTRODUÇÃO

O feijão é uma planta autógama e, como tal, possui uma baixa taxa de fecundação cruzada, em geral, inferior a 0,5 % (Borém, 1999). No entanto, em condições especiais de ambiente, com alta ocorrência de insetos polinizadores, são registradas taxas de cruzamento de até 39% (Santos, 2001). Por se tratar de uma espécie autógama, a maioria dos agricultores, em vez de utilizarem sementes certificadas, utilizam os grãos por eles produzidos ou adquiridos de seus vizinhos.

A pequena taxa de cruzamento natural, o comportamento da maioria dos agricultores, especialmente dos pequenos, que favorecem à mistura de diferentes cultivares do tipo Carioca, a extensa área plantada e a ocorrência de mutações naturais são responsáveis por ampla variação genética dentro das cultivares em uso (Abreu et al., 1997). Além disso, a partir da década de 1980, com a popularização do grão tipo Carioca, na maioria das regiões brasileiras, vários programas de melhoramento passaram a trabalhar essencialmente com esse tipo de grão. Em consequência, algumas centenas de linhagens vêm sendo selecionadas e dessas, algumas dezenas foram lançadas como cultivares, contribuindo para ampliar, significativamente, a variabilidade dentro das cultivares Carioca. Pode-se então, considerar que muitas das cultivares denominadas Carioca, ou qualquer outra com tipo semelhante de grãos, quando mantidas pelos pequenos agricultores, devem cada uma constituir uma mistura particular de várias linhagens.

A variabilidade intrínseca da cultivar Carioca pode ser explorada por meio do método de linhas puras. Para isso, basta amostrar várias linhagens dentro das cultivares usadas por agricultores de uma dada região. A variabilidade pode ser constatada por meio dos experimentos de avaliação de linhagens com base, por

exemplo, na produtividade de grãos, porte da planta e reação a patógenos. Pode-se, também, obter uma avaliação rápida e preliminar dela por meio da similaridade genética entre as linhagens, utilizando-se um marcador molecular simples como o RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA).

Com base nessas considerações, o objetivo deste trabalho foi verificar a similaridade genética entre algumas linhagens selecionadas dentro das cultivares Carioca e Pérola e, também, avaliar se as cultivares ditas carioca, utilizadas pelos agricultores do município correspondente à cultivar original.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Origem do Feijão

O gênero *Phaseolus* possui cerca de 55 espécies, das quais cinco são cultivadas: *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A., Gray var. *latifolius* Freeman e *P. polyathus* Greenman (Debouck et al., 1989). Entre elas o feijão comum, *Phaseolus vulgaris*, é o mais importante, por ser a primeira espécie a ser cultivada e, também, a mais utilizada em quase todos os continentes (Santos & Gavilanes, 1998).

Apesar do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) ser considerado uma espécie não cêntrica, ou seja, de origem múltipla e com centros de domesticação independentes (Harlan, 1971 e 1975), é consenso que essa espécie e as demais do gênero originaram-se nas Américas. Isto, porque evidências morfológicas mostram que o feijão silvestre, ancestral do feijão comum, tem uma ampla distribuição nas Américas desde o oeste do México até o nordeste da Argentina, sendo que ao longo desta faixa, observam-se diferenças morfológicas que possivelmente refletem a adaptação do feijoeiro silvestre às condições contrastantes dos ambientes em que é encontrado (Debouck et al., 1989).

Baseado em métodos fitogeográficos, Vavilov (1949-1950), citado por Vieira et al. (1999), mostrou, nas primeiras décadas do século XX, que o centro de diversidade genética das espécies de feijão *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. lunatus* e *P. acutifolius* localiza-se no México e

América Central, pois foi nessa área em que ele encontrou a maior variação de formas dessas espécies. Identificou ainda um centro secundário de diversidade genética na área montanhosa que compreende o Peru.

Atualmente, aceita-se que o feijão comum tem dois centros principais de domesticação e um terceiro, de menor expressão (Gept & Debouck, 1991). O primeiro, localiza-se na região central das Américas, principalmente no México, onde se originou a maioria dos cultivares de grãos pequenos. O segundo, localiza-se no sul dos Andes, principalmente no norte da Argentina e no sul do Peru, onde se originaram as cultivares de sementes grandes. A terceira área de domesticação, provavelmente intermediária entre as duas principais regiões, situa-se na Colômbia.

## 2.2 Biologia Floral

Existem diversos relatos na literatura, descrevendo a biologia floral do feijoeiro (Ramalho et al., 1993; Santos & Gavilanes, 1998; Peternelli & Borém, 1999). De acordo com esses relatos, o feijoeiro comum é uma planta de dias curtos e baixas altitudes. As temperaturas ótimas para a produtividade máxima situam-se entre 29,5°C (dia) e 21,0°C (noite).

A morfologia floral do *Phaseolus vulgaris* L. favorece ao mecanismo de autopolinização. As anteras estão situadas no mesmo nível do estigma e envolvidas completamente pela quilha. Quando ocorre a deiscência das anteras (antese) os grãos de pólen caem diretamente sobre o estigma. É importante salientar que a deiscência das anteras e a polinização ocorrem no momento ou pouco antes da abertura da flor (cleistogamia). Weinstein (1926) verificou, em casa de vegetação, que a polinização ocorre quase na ocasião da antese, dando-se a fertilização oito a nove horas depois. Deste modo, quando a flor abre, já está polinizada, o que torna a autofecundação um sistema quase obrigatório de

reprodução. Todavia, ocorre uma taxa de fecundação cruzada natural, que atinge, às vezes, proporções que dificultam os trabalhos de melhoramento e manutenção da pureza das cultivares.

A taxa de fecundação cruzada varia em função da distância entre as plantas e das condições do meio, no sentido de afetar população e a atividade dos insetos. Essa taxa depende, também, das cultivares semeadas, ou seja, do tipo de suas flores e da maior ou menor coincidência dos seus períodos de floração (Vieira et al., 1999). Estudos realizados no Brasil têm demonstrado que a taxa de polinização cruzada natural é baixa, ficando entre zero e 1,4% (Junqueira Neto & Lasmar Filho, 1971; Pacova & Rocha, 1975; Pereira Filho & Cavariani, 1984; Marques Júnior & Ramalho, 1995). Entretanto, em determinadas condições ambientais, certas cultivares podem apresentar taxas mais elevadas de cruzamento natural, como as obtidas por Pompeu (1963), de até 6,2%, e Costa & Antunes (1975) de até 10,6%, citados por Santos (2001).

No exterior, os estudos sobre a alogamia na cultura do feijão acusaram resultados semelhantes aos do Brasil, com taxas de fecundação cruzada natural, geralmente de até 4% (Chile, 0%, Elgueta e Baillon, 1944; México, 4,5%, Crispim e Medina, 1960; Costa Rica, 0%, Alan e Moh, 1966; México, 3,7%, Miranda – Colin, 1974; Venezuela, 0,5%, Ortega, 1974; USA, 0%, Tucker e Harding, 1975; Etiópia, 5%, Stoetzen, 1984; Malásia, 2%, Martin e Adams, 1985). Todavia, podem ocorrer altas taxas de fecundação cruzada ( USA, 10%, Emerson, 1916; Suécia, 13%, Kristofferson, 1921; USA, 8%, Banons, 1939; USA, 85%, Wales et al., 1988; Porto Rico, 39%, Brunner e Beaves, 1989; USA, 6,9%, Royer et al, 1999; USA, 55%, Gepts et al., 2000), citados por Santos (2001).

### 2.3 Cultivar Carioca

A cultivar de feijão denominada Carioca foi recebida da CATI – Coordenadoria de Assistência Técnica Integral – pela Seção de Leguminosa do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), no início de 1965, oriunda de uma cultura do município de Palmital/SP (Almeida et al., 1971). A cor do grão e o desenho ondulado do feijão, semelhante às calçadas das praias de Copacaba, no Rio de Janeiro, deram o seu nome de batismo (A Revolução..., 2000). No entanto, especula-se que a cultivar Carioca surgiu a partir de mutações ou de cruzamentos naturais. Essa origem da cultivar é discutível, pois de acordo com Voyset (1983) há vários materiais mexicanos muito parecidos com ela e que não são plantados no Brasil (A Revolução..., 2000).

Plantada em campo de observação, juntamente com outros materiais, no mesmo ano em que foi recebida pelo IAC, mostrou alta capacidade produtiva. Por essa razão, foram realizados estudos mais detalhados, sendo a cultivar colocada nos ensaios de competição e nos campos de caracterização de cultivares, embora as sementes, pela sua coloração, não tivessem a preferência dos consumidores paulistas (Almeida et al., 1971). Foram realizados vários testes culinários e agrônômicos, demonstrando que o fato de a cultivar Carioca apresentar sementes com tegumento de coloração bicolor, ou seja, fundo creme com listras havana, não comprometeu a facilidade de cozimento e nem outras características culinárias. Em campo, a cultivar Carioca mostrou-se 20% mais produtiva do que as cultivares mais utilizadas no estado de São Paulo e, também, mais resistente à antracnose, ferrugem, bacteriose e vírus (Almeida et al., 1971). Apesar da ótima produtividade e de outras características de boa qualidade, o novo material, na opinião de muitos técnicos, não seria bem aceito por produtores e consumidores, pois estes não estavam acostumados a utilizar feijões do tipo bicolor ou mesmo rajados. Esse temor atingiu até alguns

membros da Comissão Técnica Permanente de Leguminosas da Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo, os quais julgavam arriscado incluir o novo material, para multiplicação no Plano Estadual de Sementes. Foi necessário, assim, uma série de reuniões com apresentação dos resultados experimentais, para que a Comissão aceitasse a introdução da nova cultivar, para multiplicação pelo Departamento de Sementes e Mudas da CATI (Almeida, 2000).

A primeira notícia oficial sobre a nova cultivar e suas boas características, foram divulgadas em 1968, no Terceiro Encontro de Técnicos em Agricultura. Em meados de 1970, antes da publicação oficial na revista científica *Bragantia*, por Almeida, Leitão e Miyasaka, os resultados foram divulgados por um artigo de autoria de Almeida, publicado no Suplemento Agrícola do jornal “O Estado de São Paulo”, atingindo, portanto, alcance nacional (Almeida, 2000).

Nos anos seguintes, a cultivar Carioca foi incluída nos ensaios nacionais de competição de cultivares, conseguindo sempre se sobressair em produtividade, sendo indicada para plantio em outros estados brasileiros, principalmente no Paraná e em Minas Gerais. Também naquela ocasião, o novo material começou a ser incluído em todos os programas de melhoramento existentes no País, em vista de suas ótimas características.

A partir da divulgação da cultivar e da multiplicação das sementes em 1969, a aceitação da nova cultivar pelos agricultores e, também, pelos consumidores foi tão grande que, por volta de 1976, já era a cultivar mais plantada e comercializada no estado de São Paulo. Atualmente, a cultivar Carioca ou suas derivadas, as quais despontam nos programas de pesquisa em melhoramento genético, são as cultivares mais difundidas e plantadas nos principais estados produtores de feijão do Brasil. Segundo A Revolução... (2000), a cultivar Carioca é semeada em cerca de 80% das lavouras nacionais.

Em 1977, a cultivar Carioca foi colocada para competir nos ensaios internacionais, coordenados pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical –

CIAT, figurando entre as mais produtivas por diversos anos. A partir desses resultados, passou a ser usada como testemunha internacional nos programas de melhoramento do CIAT, sendo, por isso, levada para outros países.

De acordo com Ramalho & Abreu (1998), nos últimos 27 anos a cultivar Carioca tem participado dos experimentos de avaliação de cultivares em Minas Gerais, nas regiões Sul e Alto Paranaíba, sendo superada por poucos materiais melhorados atuais, principalmente na ausência de patógenos.

## **2.4 Métodos de Melhoramento em Feijão**

No melhoramento do feijoeiro podem ser utilizados todos os métodos de melhoramentos comuns às plantas autógamas, tais como: introdução de linhagens ou cultivares, seleção de linhas puras em populações heterogêneas e hibridação, envolvendo dois ou mais genitores. Dar-se-á destaque apenas à seleção de linhas puras por ser o método utilizado para aproveitar melhor a variabilidade natural disponível nas cultivares em uso pelos agricultores.

### **2.4.1 Seleção de Linhas Puras**

Como já mencionado, o método de seleção de linhas puras tem por objetivo utilizar a variabilidade natural existente nas cultivares utilizadas pelos agricultores há longo tempo. Por isso, antes da discussão do método propriamente dito é necessário comentar quais são as fontes de variabilidade no germoplasma do feijoeiro.

A principal fonte de variabilidade, aliás a única capaz de originar novos alelos, é a mutação. A mutação é, em última instância, uma alteração nas seqüências de bases do DNA, modificando a informação do alelo preexistente e, em consequência, gerando uma nova informação. No caso das mutações

naturais, a sua taxa é relativamente baixa, em geral, um mutante entre 10.000 gametas a um entre 1.000.000. Contudo, considerando o número de genes que uma planta possui, em torno de 50.000 e o número de plantas que são cultivados anualmente, a chance de que a cada safra ocorram novos alelos na descendência é enorme (Santos, 2001)

É preciso salientar que a maioria das mutações é prejudicial, ou seja, não conferem vantagens adaptativas. Como os agricultores utilizam os grãos colhidos como sementes, por alguns anos e as plantas reproduzem-se por autofecundação, a seleção natural irá se encarregar de eliminar os alelos não favoráveis. Assim, é esperado que só irão permanecer no germoplasma em uso pelos agricultores, alelos mutantes com vantagem adaptativa (Santos, 2001).

O principal modo de ampliar essa variabilidade gerada pela mutação em plantas autóгамas, é a ocorrência de hibridação natural. Como visto, ela ocorre no feijoeiro, embora ele se reproduza predominantemente por autofecundação. Além disso, o cultivo do feijão, em muitas regiões brasileiras, é praticado pelos pequenos agricultores, os quais, raramente adquirem sementes certificadas, além de adotarem práticas que facilitam a mistura de cultivares, ampliando a variabilidade genética dentro das cultivares que eles usam nos plantios sucessivos (Santos, 2001).

Finalmente, além dessas fontes convencionais de variação genética, Rasmusson & Phillips (1997) e Phillips (1999) destacam outros mecanismos que geram variabilidade. Os autores citam a recombinação intragênica, a permuta desigual, os transposons, a metilação do DNA, a paramutação, a amplificação gênica e a epistasia decorrentes de novos arranjos de alelos no genoma, como alguns desses mecanismos envolvidos na geração dessa “nova variabilidade”. Isto sugere que a variabilidade disponível dentro de linhas puras, obtidas por autofecundações sucessivas e mantidas por longos períodos, sendo submetidas a diferentes tipos de estresses, é maior do que se imaginava.

Diante desses fatos espera-se ampla variabilidade em inúmeros caracteres nas cultivares que são utilizadas pelos agricultores. A principal alternativa para utilizar essa variabilidade é a coleta de amostras de diferentes regiões e agricultores e a posterior seleção de linhas puras.

A teoria das linhas puras foi desenvolvida pelo botânico dinamarquês W. L. Johannsen, em 1903, que conduziu uma série de experimentos com a variedade de feijão “Princess”. Johannsen utilizou um lote de sementes de diferentes tamanhos, no qual investigou o efeito da seleção sobre o peso médio das sementes nas progênes. Sua conclusão foi de que a seleção em uma população heterogênea pode ser efetiva para isolar linhas distintas entre si, porém, posteriores seleções dentro das linhas são ineficientes. Assim, ele estabeleceu três princípios com seus estudos: a) há variações herdáveis e variações causadas pelo ambiente; b) a seleção só é efetiva se recair sobre diferenças herdáveis e c) a seleção não gera variação. A partir desse trabalho, o termo “linha pura”, foi utilizado para definir toda a descendência, por autofecundação, partindo de um único indivíduo homocigoto. Outra definição de linha pura refere-se ao genótipo que possui alelos iguais em todos os genes, de modo que, com as sucessivas multiplicações das sementes, via autofecundação, não há alteração na sua constituição genética (Ramalho & Abreu, 1998). Portanto, a não ser que ocorra alguma mistura mecânica de sementes, mutações ou algum cruzamento com outras cultivares, essa linhagem terá sua constituição genotípica mantida indefinidamente.

O procedimento para obtenção de linhas puras começa com a seleção de plantas individuais com posterior teste de progênes. A população base onde será iniciada a seleção pode ser proveniente de um ou vários agricultores. O material colhido dos agricultores é semeado misturado na área experimental. Durante o cultivo, o melhorista acompanha o desenvolvimento das plantas, identificando as mais promissoras com relação à arquitetura e incidência de

pragas e doenças. Na colheita, são observados caracteres dos grãos. As plantas são colhidas individualmente obtendo-se famílias-linhas puras, que serão avaliadas na safra seguinte. Na avaliação, como o número de linhas puras é normalmente grande, cada uma é semeada uma linha com dois a três metros de comprimento de cada, colocando, a espaços regulares, uma testemunha. De modo análogo é realizada a seleção das melhores linhas puras, que pode ser visual ou utilizar-se de alguma medida na tomada de decisão. As linhas selecionadas são novamente colhidas individualmente e mais extensivamente avaliadas nas gerações seguintes, utilizando-se experimentos com repetições. No final do processo seletivo, o melhorista irá identificar uma ou algumas linhas puras. Nesse último caso, as linhas poderão ser mantidas isoladas ou misturadas para originar uma nova cultivar.(Ramalho et al., 1998; Ramalho et al., 1993; Borém, 1999).

A seleção de linhas puras é utilizada no melhoramento de plantas autógamias há longo tempo. O trabalho mais expressivo foi conduzido com a cultura do arroz na Tailândia, cuja a seleção iniciou-se a partir de mais de 100 mil linhas puras. Para a seleção era colocada, intercaladamente, uma linhagem testemunha (Love, 1955).

No caso da cultura do feijoeiro, a seleção de linhas puras é freqüentemente realizada, embora, em apenas alguns casos resultados sejam publicados. Nesse contexto, merece destaque o trabalho realizado para a seleção de linhas puras, na cultivar de feijão roxo (Ramalho et al., 1982). Para isso, foram analisadas 85 amostras, coletadas em propriedades de agricultores e chegou-se à conclusão de que havia uma ampla variação entre e dentro das amostras, principalmente, para as características das sementes e produção por plantas.

Numa segunda etapa, visando aproveitar essa variabilidade, avaliaram-se 485 progênies, oriundas de plantas superiores identificadas na etapa anterior.

Em seguida, as 100 progênies selecionadas foram novamente avaliadas e, finalmente, as 20 melhores foram comparadas em dois locais: Sete Lagoas (MG) e Patos de Minas (MG). Nesse caso, os autores concluíram, baseados nas estimativas dos parâmetros genéticos e nas distribuições de frequência relativas à produtividade de grãos, que os genótipos de feijão roxo em uso pelos agricultores, na região amostrada, possuíam acentuada variabilidade genética.

No programa de melhoramento da EMBRAPA - Arroz e Feijão, esse método também foi amplamente utilizado (Costa & Zimmermann, 1988). Contudo, o exemplo de maior sucesso na cultura do feijoeiro, não só no Brasil, com em todo o mundo, foi a seleção de uma linhagem numa plantação de um agricultor do município de Palmital, estado de São Paulo, que originou a cultivar “Carioca” (Almeida et al., 1971). Vale frisar que nessa seleção, não foi utilizado o procedimento normal de linhas puras.

Mais de trinta anos já se passaram e essa cultivar continua sendo amplamente utilizada em praticamente todo o território brasileiro, sendo, sem dúvida nenhuma, um dos casos de maior sucesso no melhoramento de uma planta cultivada. É preciso mencionar que, devido ao seu cultivo sucessivo durante todo esse período e, considerando as causas da variação genética dentro das cultivares autógamas, é esperado que ocorra variabilidade dentro dessa cultivar. Trata-se, portanto, de um germoplasma promissor para a seleção de linha pura. Uma inspeção rápida da variabilidade genética existente pode ser realizada por meio de marcadores moleculares (Santos, 2001).

## **2.5 Marcadores Genéticos**

Marcadores genéticos são quaisquer características, processos bioquímicos ou fragmentos de DNA, que permitem a distinção de indivíduos geneticamente diferentes (Borém, 1997).

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 serem conhecidas e possuem herança mendeliana (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Já Sakiyama (1993), em uma definição mais abrangente, relata que a palavra marcador, 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.

Com base nesses fatores e avaliando as particularidades dos vegetais, pode-se destacar três classes de marcadores genéticos; marcadores morfológicos, marcadores bioquímicos e marcadores moleculares.

Um marcador morfológico consiste de um caráter qualitativo de alta herdabilidade normalmente determinado por um único gene. 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, sendo o principal o baixo número, além de apresentarem a desvantagem de somente serem identificados, em sua maioria, no nível de planta inteira ou adulta (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

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 apresente a desvantagem de ser pouco variável, principalmente quando se analisam populações de genótipos altamente

aparentados. Além disso, também pode sofrer influência do ambiente e 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 da genética e melhoramento de plantas, com aplicações nas áreas de genética de populações, identificação de cultivares e genética evolutiva (Muniz, 1994). Têm sido utilizados, ainda, na caracterização de germoplasma e de forma mais limitada, na seleção indireta. Devido a estas características, os marcadores bioquímicos/enzimáticos têm sido gradualmente substituídos por marcadores que detectem o polimorfismo direto na molécula de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Os marcadores moleculares surgiram recentemente, com o advento da biologia molecular, o que permitiu que fossem detectados polimorfismos genéticos no DNA. O número de marcadores disponíveis para análise genética passou a ser virtualmente ilimitado e sua utilização pode ser estendida às espécies menos estudadas (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Os marcadores moleculares comportam-se como características qualitativas de herança mendeliana simples. São de grande interesse para o melhoramento de plantas, como uma fonte de informação genética, na seleção indireta de fenótipos de interesse agrônômicos (Kelly & Miklas, 1998).

Os marcadores moleculares vêm sendo utilizados na construção de mapas genéticos e na seleção de germoplasma, em programas de melhoramento, permitindo a caracterização de diferentes genótipos (fingerprinting), o estabelecimento de filogenias, a seleção assistida de genes para caracteres de interesse, a determinação de similaridades entre indivíduos, usando análises de agrupamentos e a clonagem de genes, baseado em mapa (positional cloning ou map-based cloning) (Stirling et al., 1995; Painting, 1996).

Marcadores baseados no DNA apresentam várias vantagens sobre os outros tipos de marcadores. Dentre essas estão: o número elevado, o alto grau

de polimorfismo, a não-influência do meio ambiente e a não apresentação de efeitos pleiotrópico e epistáticos.

Os distintos tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade no DNA. Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização, estão os marcadores RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism e Minissatélites ou locos VNTR (Variable Number of Tandem Repeats). Já aqueles revelados por amplificação, incluem os marcadores do tipo PCR (Polymerase Chain Reaction), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), Microsatelites ou SSR (Simple Sequence Repeats) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Destes, Milack (1998) destaca o PCR e o RAPD, em função da simplicidade, baixos custos e viabilidade de uso por qualquer melhorista.

### **2.5.1 Marcadores PCR e RAPD**

A técnica PCR foi desenvolvida em 1984, por Kary Mullis (Mullis & Fafoona, 1987; Saiki et al., 1985) e consiste na amplificação, *in vitro*, de fragmentos de DNA, usando oligonucleotídeos ou primers de seqüência conhecida, geralmente com 20 a 25 nucleotídeos e complementares às extremidades do segmento a ser amplificado, direcionando a síntese do DNA alvo, em ciclos repetidos (Mullis, 1990; Vas, 1985).

Cada ciclo de amplificação na técnica de PCR compreende três etapas: (1) desnaturação da molécula de DNA; (2) pareamento dos primers às regiões complementares no DNA e (3) extensão a partir dos primers pela DNA polimerase. Essas etapas são realizadas em um termociclador, que fornece as

temperaturas e respectivos tempos adequados para desnaturação do DNA, anelamento dos primers e extensão do DNA, em cada ciclo de replicação, durante 25 a 40 ciclos (Passos-Bueno & Zatp, 1995).

No entanto, a técnica PCR apresenta, uma desvantagem, que é o fato de requerer o seqüenciamento do fragmento de DNA de interesse, para só assim, obter os primers que permitirão a amplificação do mesmo.

A partir do PCR foram desenvolvidas outras classes de marcadores, como, por exemplo, o RAPD. A técnica de RAPD foi proposta no início da década de 90, como uma variação da técnica de PCR, por Williams et al. (1990) e Welsh & Mc Clelland (1990), que a denominaram de AP-PCR (Arbitrarily-Primer PCR), sendo a denominação criada por Williams a mais conhecida. O RAPD consiste no uso de primers de seqüência conhecida, em torno de 10 nucleotídeos, porém, arbitrária, eliminando a necessidade do seqüenciamento prévio da seqüência a ser amplificada. Essa técnica está entre as mais utilizadas devido a sua facilidade de uso, rapidez e baixo custo.

Para realização de uma reação de RAPD, geralmente um único primer é misturado com o DNA genômico, na presença de uma DNA polimerase termoestável, obtida de uma bactéria termófila, *Thermus aquaticus*, em um tampão adequado e, em seguida, submetido a vários ciclos de amplificação, como em uma reação de PCR. Em condições ideais de temperatura ocorre a ligação entre o primer e o DNA genômico em dois sítios, nas cadeias complementares do DNA molde. Caso esses sítios estejam separados por uma distância entre 200 e 2000 pares de bases, o produto da amplificação será formado (Williams et al., 1990).

Os produtos de amplificação são geralmente separados em um gel de agarose e visualizados sob luz ultravioleta, quando corados com brometo de etídio ou por coloração com prata em géis de poliacrilamida (Williams et al., 1990).

A técnica RAPD permite detectar polimorfismos, ocasionados por mutações de ponto, nos sítios do primer e inserções ou deleções entre sítios de pareamento, deixando-os a uma distância tal, que impossibilita a amplificação (Willians et al., 1990; Willians et al., 1993). O polimorfismo identificado nos fragmentos gerados pelo RAPD apresentam herança mendeliana simples e interação alélica dominante.

Análises de polimorfismo de DNA com marcadores do tipo RAPD são muito úteis, para a caracterização de recursos biológicos (Fairbanks et al., 1993), através da obtenção fingsprinting genômicos de indivíduos, cultivares, populações, análise da estrutura e diversidade genética em populações (Ferreira & Gattapaglia, 1995); estudos de similaridade genética (Duarte et al., 1999a; Duarte et al., 1999b), estabelecendo relacionamento filogenético, entre diferentes espécies e cultivares.

Os marcadores RAPD possuem diversas vantagens além da simplicidade e rapidez, como não fazer uso de radioatividade, necessidade de uma quantidade mínima de DNA e serem altamente apropriados para uso em larga escala (Ferreira & Gattapaglia, 1995). A rapidez na obtenção de dados faz com que esses marcadores se constituam em ferramenta muito útil para a compreensão dos mecanismos genéticos e para a seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento (Marin, 1996). Entretanto, os marcadores RAPD possuem algumas limitações, como a baixa reprodutibilidade dos resultados devido à sensibilidade da técnica e o caráter dominante dos marcadores obtidos, o qual não permite a distinção entre os locos heterozigotos e homozigotos dominantes (Milach, 1998).

Os problemas de reprodutibilidade do RAPD podem ser superados pela padronização da técnica (Ferreira & Gattapaglia, 1995). Atualmente é possível aumentar a utilidade e a reprodutibilidade de um marcador RAPD de interesse,

convertendo-o em um marcador mais específico e reprodutível, denominado SCAR (Melotto et al., 1996) transformando o RAPD em PCR.

## **2.6 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 et al., 1999a), uma vez que, informação molecular de diversidade pode auxiliar no enriquecimento da base genética, durante o andamento de um programa de melhoramento (Neusbury & Ford-Lloyd, 1993). A avaliação da diversidade genética, por marcadores moleculares, apresentam algumas vantagens sobre outros métodos, pois, além de identificarem grande polimorfismo, não apresentam interações entre caracteres, podendo, ainda serem avaliados em qualquer estágio do desenvolvimento (Willians et al., 1990).

A estimativa da diversidade genética, utilizando marcadores moleculares, pode ser obtida a partir de amostradas dos genótipos disponíveis para os melhoristas. 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. Embora a diversidade genética estimada por meio dos marcadores RAPD aleatórios não expliquem a variação de caracteres individuais, eles permitem uma identificação segura do parentesco entre os genótipos (Castanheiras, 2001; Hagiwara et al., 2001)

Um aspecto a ser considerado é que a utilidade de marcadores para o melhoramento genético será tanto maior quanto maior for sua capacidade de prever o comportamento dos cruzamentos no campo. Assim, a utilização de primers, que amplificam fragmentos de DNA associados a QTLs, de caracteres de importância agrônômica, 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, como o amendoim (Halward et al., 1992), o cacau (Wilde et al., 1992), o mamão (Stiles et al., 1993), o alho (Wilkie et al., 1993) e o feijão (Skock et al., 1995; Duarte, 1999b; Machado, 1999; Castanheiras, 2001; Hagiwara et al., 2001).

### **2.6.1 Coeficientes de Similaridade Usados em Estudo com Marcadores RAPD**

O coeficiente de similaridade/dissimilaridade entre dois indivíduos é uma técnica de análise multivariada, que permite melhor visualização dos relacionamentos entre os mesmos (Duarte, 1999a). Devido à sua importância, um grande número de coeficientes de similaridade tem 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 esses 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 apresentado na Tabela 1.

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

		Genótipo "1"	
		1	0
Genótipo "2"	1	A (1,1)	b (0,1)
	0	C (1,0)	d (0,0)

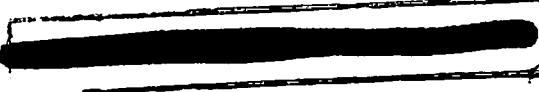
A partir dos padrões de coincidência ou não coincidência das variáveis, na comparação de dois genótipos, vários coeficientes de similaridade têm sido propostos, combinando quantidades diferentes de a, b, c e d. No coeficiente de Gower (Gower, 1971), a similaridade entre qualquer par de genótipos i e j ( $sg_{ij}$ ) é calculado como:  $sg_{ij} = a/(a + b + c)$ , avaliando assim a similaridade em comparações onde ocorrem coincidência para a presença de variáveis, ignorando para a ausência de variáveis e descreve a similaridade entre plantas i e j como a proporção de fragmentos RAPD comuns às plantas (Mumm et al., 1994). O coeficiente de Dice (Dice, 1945) enfatiza as comparações onde ocorrem coincidência para a presença de variáveis, calculando a similaridade como:  $sg_{ij} = 2a/(2a + b + c)$ . 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 et al., 1995). Existem ainda vários outros coeficientes na literatura, que são específicos para variáveis dicotômicas e que podem ser empregados como dados de marcadores moleculares do tipo RAPD, tais como os coeficientes de Roger e Tanimoto, Andenberg, Russel e Rao, Ochiai e Ochiai II (Duarte et al., 1999a).

## 2.6.2 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 pela simples observação do conjunto de estimativas disponíveis torna-se difícil ou impraticável (Machado, 1999).

A análise de agrupamento constitui uma metodologia numérica com o objetivo de propor uma estrutura classificatória ou de reconhecimento da existência de grupos sendo, o seu resultado final um gráfico ou um 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 de uma medida de dissimilaridade entre os indivíduos a serem agrupados e a adoção de uma técnica de agrupamento visando à formação de grupos.

Conforme Sokal & Sneath (1963) existem vários métodos de agrupamento, sendo os mais utilizados, os hierárquicos e os de otimização. Nos hierárquicos, os indivíduos são agrupados por um processo que se repete em vários níveis, estabelecendo-se um dendrograma, sem se preocupar com o número ótimo de grupos. Entre os métodos de agrupamentos mais utilizados está o método das médias das similaridade (UPGMA). Segundo Cruz (1990), as delimitações dos grupos podem ser definidas por meio de exame visual do dendrograma, quando o objetivo concentra-se em detectar os pontos de alta mudança de nível. Ao efetuar cortes, esses pontos do dendrograma, estabelecem-se os grupos e os números de indivíduos de cada grupo. Entretanto, há a possibilidade de se estimarem os erros das similaridades genéticas e por meio de um simples teste  $t$ , identificar o ponto de corte no dendrograma (Castanheira, 2001).



Já nos métodos de otimização, os grupos são estabelecidos, otimizando-se determinados critérios de agrupamento e a sua diferença, com relação aos hierárquicos reside no fato dos grupos formados serem mutuamente exclusivos (Cruz, 1990). No método de otimização de Tocher, por exemplo, adota-se o critério de manter a distância média intragrupo sempre inferior a qualquer distância intergrupos (Rao, 1952).

## **2.7 Estimativas de Similaridade/Distância Genética em feijão**

Com base na amplificação de 144 bandas polimórficas, Vasconcelos (1996) determinou as distâncias genéticas entre as 28 cultivares de feijão e obteve a classificação das cultivares nos dois centros de domesticação, o mesoamericano e o andino, sendo que as menores distâncias genéticas foram obtidas dentro de centros de domesticação e as maiores distâncias genéticas foram obtidas entre centros de domesticação. Vale ressaltar, também, que os dados obtidos foram coincidentes em separar as cultivares por tipo de faseolina e tamanho de semente. Resultados semelhantes foram obtidos por Duarte et al. (1999b), Franco (2001), Metais (2000). Além disso, Duarte et al. (1999b), constataram que as similaridades genéticas das cultivares são equivalentes às diversidades determinadas a partir de caracteres morfo-agronômicos.

A necessidade de descritores estáveis, homogêneos e distintos, os quais possam ser usados tanto na certificação como na identificação de cultivares, tem aumentado, significativamente, com a lei de proteção de cultivares. Com o objetivo de estudar marcadores para certificação da pureza genética de sementes de feijão do grupo carioca, Vieira (2000) caracterizou as cultivares de feijão Carioca, Carioca MG, Aporé, Pérola, IAPAR 57 e IAPAR 81, por meio de um estudo de similaridade genética. As características morfológicas estudadas foram as descritas na Lei de Proteção de Cultivares. Para as características

morfológicas quantitativas foi estimada a distância Euclidiana Média e constituído um dendrograma (UPGMA), o qual separou as cultivares em três grupos: 1) Carioca, Carioca MG; 2) Aporé, IAPAR 57; 3) Pérola, IAPAR81. Já para as características morfológicas qualitativas, a similaridade genética foi estimada através do coeficiente de Jaccard e construído um dendrograma, obtendo os grupos: 1) Carioca, Carioca MG, Aporé, Pérola, IAPAR 57; 2) IAPAR81. Posteriormente foram estimados os padrões eletroforéticos de proteínas de reserva, através da modalidade eletroforética SDS- PAGE, revelando uma similaridade entre as cultivares Aporé e Pérola. Também, a sua focalização isoeétrica e estimada através dela, a similaridade genética pelo coeficiente de Jaccard, sendo constituído um dendrograma, e obtidos os grupos: 1) Carioca, Carioca MG, IAPAR 57; 2) Aporé, Pérola, IAPAR 81.

A similaridade genética entre famílias obtidas a partir de diferentes métodos de condução de população segregante foi estimada por Castanheira (2001), por meio de marcadores RAPD. O método da população foi o que liberou maior variabilidade entre famílias, seguido do “Bulk” dentro de famílias  $F_2$ , do “SSD”, do “Bulk” dentro de famílias  $F_1$  e genealógicos, concordando com os resultados de produtividade de grãos obtidos por Raposo (1999).

A similaridade genética entre plantas de diferentes retrocruzamentos, provenientes do cruzamento do genitor não adaptado G2333 com os recorrentes ESAL 696 e CI 140, ambos com grãos do tipo carioca, foram estimadas por Hagiwara et al. (2001), com o objetivo de identificar plantas com maior similaridade genética aos genitores recorrentes. Os marcadores RAPD empregados nesse estudo foram úteis para selecionar plantas mais similares aos genitores recorrentes já nos dois primeiros retrocruzamentos.

A divergência genética entre genótipos foi estimada também em várias espécies, além do feijão comum, utilizando diversos marcadores de DNA e, também, de isoenzimas. Alguns exemplos são a soja (Abdelnoor et al., 1994), a

pupunha (Barbosa, 1997), a mandioca (Mühlen, 1999), algumas espécies de brássicas (Santos et al., 1994), feijão fava (Nienhuis et al., 1995), Garcia-Mas et al., 2000), amendoim (Raina et al., 2001), algumas espécies florestais (Seoane, 1998; Castellen, 2000), algumas espécies de fungos patogênicos de feijão (Nelson et al., 1997; Balardin et al., 1997; Sicard et al., 1997) e até mesmo em bactérias (Tseng et al., 2001).

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Local**

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

### **3.2 Material utilizado**

Foram utilizadas 98 linhagens de feijão, selecionadas dentro das cultivares Carioca e Pérola, em 18 propriedades do município de Sete Lagoas, MG (Tabela 2).

Além das linhagens foram incluídas cinco cultivares testemunhas, comumente usadas no Estado de MG, sendo denominadas por: 99 – Carioca 1, 100 – Carioca 2, 101 – Carioca MG, 102 – Aporé, 103 – Pérola. A testemunha Carioca 1 foi incluída durante a avaliação prévia das linhagens em experimento de campo. As linhagens de 89 a 98 foram selecionadas dentro da cultivar Pérola. O experimento de campo e as avaliações prévias foram realizadas por Abreu et al. (1997). As demais foram adicionadas para realizar o presente estudo e a Carioca 2 foi tomada de lote diferente e em época diferente em relação à Carioca 1.

Para o estudo de similaridade genética as linhagens coletadas de produtores foram plantadas em casa de vegetação, em bandejas de isopor de 128 células, tendo 2 plantas por célula, perfazendo 16 plantas por linhagens.

**TABELA 2: Identificação das linhagens de feijão e suas respectivas origens.**

Linhagem	Produtor	Linhagem	Produtor	Linhagem	Produtor	Linhagem	Produtor
1	Barreiras	31	Nilson	61	Lourenço	91	Pérola13
2	M.Flora	32	Nilson	62	Lourenço	92	Pérola16
3	J.Souza	33	Nilson	63	Lourenço	93	Pérola14
4	Nicodemos	34	Nilson	64	Lourenço	94	Pérola5
5	NovaUnião	35	Barbara	65	Lourenço	95	Pérola10
6	D.Joaquim	36	Waldir	66	Lourenço	96	Pérola6
7	D.Joaquim	37	Waldir	67	Lourenço	97	Pérola9
8	Jaime	38	Waldir	68	Lourenço	98	Pérola8
9	Jaime	39	Waldir	69	Lourenço		
10	Damásio	40	Waldir	70	Lourenço		
11	Damásio	41	Waldir	71	J.Carvalho		
12	Damásio	42	Waldir	72	J.Carvalho		
13	Damásio	43	Waldir	73	J.Carvalho		
14	Damásio	44	Waldir	74	J.Carvalho		
15	Damásio	45	Waldir	75	Raimundo		
16	Damásio	46	Domenico	76	Raimundo		
17	Damásio	47	Domenico	77	Raimundo		
18	Damásio	48	Domenico	78	Raimundo		
19	Damásio	49	Domenico	79	Raimundo		
20	Fortuna	50	Domenico	80	Raimundo		
21	Fortuna	51	Lourenço	81	Carlos		
22	Fortuna	52	Lourenço	82	Carlos		
23	Fortuna	53	Lourenço	83	Carlos		
24	Fortuna	54	Lourenço	84	Carlos		
25	Fortuna	55	Lourenço	85	Carlos		
26	Nilson	56	Lourenço	86	Ubaldo		
27	Nilson	57	Lourenço	87	Ubaldo		
28	Nilson	58	Lourenço	88	Ubaldo		
29	Nilson	59	Lourenço	89	Pérola12		
30	Nilson	60	Lourenço	90	Pérola4		

### 3.3 Extração de DNA

A partir de folhas jovens de cada uma das 98 linhagens e das cinco testemunhas foi extraído o DNA, de acordo com o procedimento descrito por Nienhuis et al. (1995) com algumas modificações.

As folhas jovens foram trituradas em 10 ml de tampão de extração e 20  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol e sílica em um almofariz. O tampão de extração foi constituído de 2% de CTAB, 100mM de TRIS (pH 8,0), 20mM de EDTA (pH 8,0), 1,4 M de NaCl e 1% de PVP (polivinilpirrolidona). O material triturado foi incubado por 30 minutos, em tubos de centrifuga, em banho-maria a 65° C. Em seguida, os ácidos nucléicos foram extraídos com 10ml da mistura clorofórmio/álcool isoamil (24:1) e centrifugados para separar as fases orgânica e aquosa, sendo coletado o sobrenadante. Os ácidos nucléicos assim extraídos foram precipitados pela adição de 30ml da mistura de etanol 95%/acetato de amônio 7,5 M (6:1) e mantidos em um freezer a -20° C por uma noite. Após a precipitação, foram transferidos para tubos de microcentrifuga tipo "Eppendorf", centrifugados e secos. Sendo, posteriormente, reidratados em tampão TE (1mM de TRIS e 0,1mM de EDTA). E, em seguida, realizou-se a segunda extração com clorofórmio/álcool isoamil (24:1). Os ácidos nucléicos do sobrenadante desta extração foram coletados e precipitados pela adição de cerca três volumes de uma mistura de acetato de sódio 3M/etanol 95% (1:20). Após a precipitação foi eliminado o álcool/acetato dos ácidos nucléicos e foram novamente reidratados em tampão TE. Para a posterior análise de RAPD, o DNA foi quantificado, usando um fluorímetro (Hoeffer Scientific TKO 100) e, quando necessário, diluído com TE, para a concentração de 10 ng/ $\mu$ l, que efetivamente foi utilizada no RAPD.

### 3.4 Análise de RAPD

O DNA obtido foi amplificado pelo método RAPD onde foram usados primers, que identificaram polimorfismo nas linhagens. Cada reação de RAPD foi preparada em volume de 10  $\mu$ l, de acordo com o procedimento utilizado por Nienhuis et al. (1995), com algumas modificações. Cada mistura da reação

conteve 20 ng de DNA genômico, 100 $\mu$ M de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,4  $\mu$ M do primer, 0,6 unidades da enzima Taq DNA Polimerase e tampão de reação (50mM de TRIS (pH 8,3), 20 mM de KCl, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5  $\mu$ g. $\mu$ l<sup>-1</sup> de BSA, 0,25% de Ficol 400, 10mM de tartrazine) e água pura, dando um total de 10 $\mu$ l de mistura de reação. 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° C, sete segundos para o anelamento do primer a 42° C e 70 segundos para a elongação a 72° C. Os 38 ciclos subseqüentes diferiram em relação aos dois primeiros apenas no tempo de desnaturação, que foi reduzido para um segundo. Uma etapa de quatro minutos a 72° C foi programada depois dos 40 ciclos 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 V por quatro horas. Os fragmentos de DNA foram corados com brometo de etídio a uma concentração de 0,5  $\mu$ g/ml e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

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 e que apresentaram ocorrência regular na maioria dos genótipos. No gel, cada banda foi considerada um caráter único. A partir das bandas obtidas foi construída uma matriz de 0 e 1, onde 1 indica a presença de banda e 0 a ausência (Tabela 1A). Essa matriz foi usada para obter as estimativas da similaridade genética entre as linhagens comparadas duas a duas.

### 3.5 Análise da similaridade genética

A similaridade genética ( $sg_{ij}$ ) foi estimada por meio do procedimento de Nei e Li (Rohlf, 1992), através da expressão  $sg_{ij} = 2a / (2a + b + c)$ , sendo  $a$  correspondente à presença de uma determinada banda nos indivíduos  $i$  e  $j$ ,  $b$  a presença da banda em  $i$  e ausência em  $j$ ; e  $c$  ausência da banda em  $i$  e presença em  $j$ .

O erro associado ( $s_{ij}$ ) a cada similaridade ( $sg_{ij}$ ) foi estimado de forma semelhante ao sugerido por Skroch et al. (1992) pela expressão:

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

onde  $n$  é o número total das combinações  $a$ ,  $b$ ,  $c$  para cada par de genótipos.

A análise de agrupamento das similaridades foi realizada por meio do método da média das similaridades (UPGMA), gerando um dendrograma, utilizando-se o programa NTSYS-PC 2,0 (Rohlf, 1992).

Os genótipos geneticamente diferentes foram identificados nos dendrogramas, a partir da estimativa do valor mínimo da similaridade ( $sg_m$ ), acima do qual, as famílias são semelhantes. O  $sg_m$  foi estimado por meio do teste de  $t$ , no nível de 1% e 0,1% de probabilidade, utilizando-se a seguinte expressão (Castanheira, 2001):

$$sg_m = 1 - (t \cdot \bar{s}_{ij}),$$

onde  $t$  é o valor tabelado de  $t$  com  $n-2$  graus de liberdade e  $\bar{s}_{ij}$  é a média dos erros  $s_{ij}$ .

Foi estimado o coeficiente de correlação de Sperman (Steel & Torrie, 1980), entre os valores médios de similaridade de cada linhagem e sua produtividade média de grãos (Abreu et al., 1997). O valor médio de similaridade de cada linhagem ( $s_i$ ) foi obtido por meio da seguinte expressão:

$$\bar{s}_i = \sum_{j=1}^{102} s_{ij} / 102$$

O coeficiente de correlação foi testado pelo teste de t.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seleção de linhas puras é uma forma de explorar a variabilidade genética já disponível em cultivares autógamas. Ela é viável, quando as cultivares já são utilizadas por longo tempo e em extensas áreas, como é o caso da cultivar Carioca, que é amplamente utilizada em todo Brasil, desde o começo da década de 1980. Uma avaliação prévia da diversidade genética entre as linhagens provenientes dessa cultivar pode ser realizada por meio da estimativa das similaridades genéticas, a partir de um marcador molecular simples como o RAPD.

### 4.1 RAPD

Foram utilizados 18 primers, que identificaram polimorfismo nas linhagens e testemunhas e geraram 81 bandas polimórficas. O número médio de bandas por primers foi de 4,5, variando de duas a oito (Tabela 3)

O número de bandas utilizado para a estimativa da diversidade genética em feijão tem sido variável. Quando os genótipos são mais divergentes, há mais facilidade em se encontrar bandas polimórficas, sendo utilizadas 169 por Nienhuis et al. (1995), 144 por Vasconcelos et al. (1996) e 137 por Duarte et al. (1999a). Nesses estudos foram utilizados cultivares de *Phaseolus* de origem mesoamericana e andina. A diversidade entre linhagens provenientes de retrocruzamento foi estimada a partir de 70 bandas polimórficas, por Hagiwara et al. (2001). Já em cultivares caboclas chilenas foram utilizadas 106 bandas por Johns et al. (1997), embora eles tenham verificado por reamostragem, que 50 bandas foram suficientes para realizar o agrupamento. Nienhuis et al. (1995), também reamostrando diferentes números de bandas para a estimativa da

TABELA 3: Primers e o respectivo número de bandas polimórficas nas linhagens de feijão e testemunhas

Primers	Nº Bandas	Primers	Nº Bandas	Primers	Nº Bandas
OPA04	6	OPG16	4	OPM06	5
OPB10	3	OPG19	5	OPN07	7
OPE06	4	OPH19	4	OPS16	2
OPE20	3	OPI03	4	OPS19	8
OPF10	4	OPI06	7	OPS20	7
OPG04	2	OPI07	2	OPW11	4

diversidade genética entre acessos de *Phaseolus lunatus*, verificaram que mais de 100 bandas polimórficas não melhoram as estimativas. Estudos de simulação com marcadores, visando auxiliar na seleção sugerem de 40 a 120 para o feijão, que possui um número básico de 11 cromossomos (Openshaw et al., 1994; Visscher et al., 1996). Portanto, as 81 bandas utilizadas no presente estudo podem ser consideradas suficientes, principalmente, porque as linhagens de feijão são altamente aparentadas, por serem todas do grupo Carioca.

#### 4.2 Similaridade Genética

Foram obtidas 5253 estimativas de similaridade genética entre as 98 linhagens e cinco testemunhas, que variam de 0,51 a 0,94. Para facilitar a visualização dos agrupamentos entre elas, as similaridades foram representadas no dendrograma na Figura 1. O agrupamento pode ser considerado adequado, porque a correlação das similaridades originais, com os valores estimados para a construção do dendrograma foi de 0,66 ( $P > 0,99$ ).

Nota-se que a amplitude da variação das similaridades foi pequena, em razão do maior parentesco entre os genótipos utilizados. A amplitude aumenta com o crescimento da divergência entre os genótipos. Por exemplo, ela variou

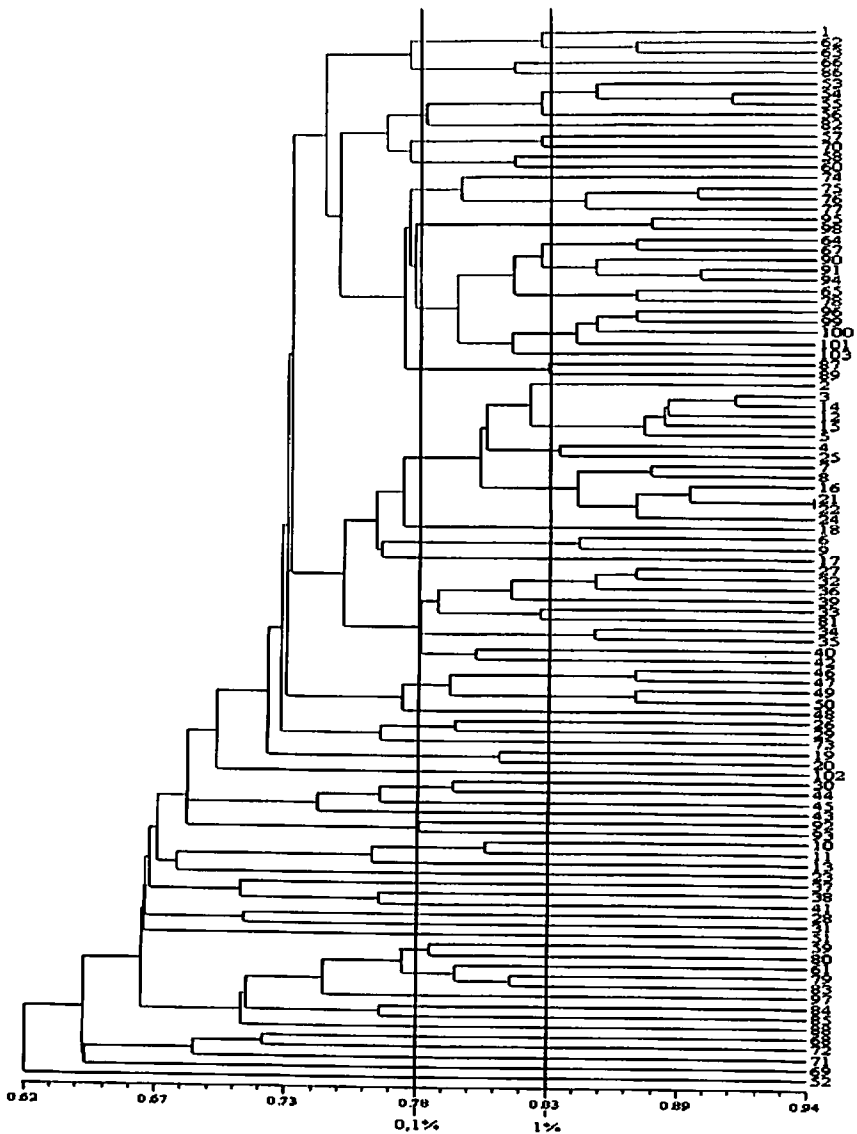


FIGURA 1: Dendrograma das similaridades genéticas das linhagens e testemunhas baseadas em marcadores RAPD

de 0,4 a 0,99 entre as linhagens segregantes, provenientes de dois retrocruzamentos e de 0,41 a 0,93 entre cultivares adaptadas, nas regiões Sul e Alto Paranaíba de Minas Gerais (Machado et al.2000; Hagiwara et al 2001). No

entanto, entre cultivares muito mais divergentes provenientes das regiões andinas e mesoamericanas, as estimativas variaram de 0,01 a 0,97 (Vasconcelos et al., 1996; Duarte et al., 1999b).

Observa-se na Tabela 2 que das 98 linhagens que foram selecionadas dentro de culturas com as cultivares Carioca e Pérola, 18 propriedades continham linhagens que se supunham ser Carioca e, apenas, uma continha a cultivar Pérola.

Entre as 10 linhagens selecionadas dentro da cultivar Pérola, sete foram, geneticamente idênticas ou muito similares à cultivar Pérola, considerando o valor mínimo significativo de similaridade ( $sg_m=0,78$ ) ao nível de 0,1% de probabilidade. Apenas três foram diferentes, sendo a 92 e 93 iguais entre si e a 97, diferente das demais. Portanto, apenas 30% das linhagens selecionadas dentro da cultivar Pérola mostraram-se geneticamente diferentes. Vale salientar que a cultivar Pérola é uma linhagem selecionada dentro da cultivar Apuré pela EMBRAPA Arroz e Feijão, há cerca de uma década e após ser avaliada experimentalmente, foi recomendada para cultivo em Minas Gerais, em 1997, (EPAMIG, 1997). Portanto, apesar da cultivar estar sendo cultivada em extensas áreas no Estado, a sua origem recente justifica a pequena variação genética dentro dela. As linhagens divergentes são provavelmente provenientes de mistura de duas linhagens com grãos do tipo Carioca, porém, geneticamente diferentes das cultivares Pérola e Apuré (Figura 1).

As linhagens selecionadas dentro das propriedades onde foi utilizada a cultivar Carioca, ao contrário do que ocorreu com a cultivar Pérola, foram geneticamente mais variáveis (Figura 1, Tabela 4 e Tabela 5). Esse resultado já era esperado em função do longo tempo que a cultivar vem sendo usada em grande parte do Brasil e em todo estado de Minas Gerais. Portanto, houve oportunidade de gerar acentuada variação genética, a partir de mutação e sua

manutenção na cultivar, misturas mecânicas com outras cultivares e os cruzamentos naturais entre elas (Borém, 1999; Vieira et al., 1999; Santos, 2001).

TABELA 4: Número de linhagens por propriedade e respectivos grupos com aquelas geneticamente similares

Propriedade	N Linhagem	N Grupos	
		1%	0,10%
Barreiras	1	1	1
Sogra	1	1	1
J.Souza	1	1	1
Nicodemos	1	1	1
Nova União	1	1	1
Bárbara	1	1	1
D.Joaquim	2	2	2
Jaime	2	2	2
Ubaldo	3	3	3
J.Carvalho	4	4	4
Domenico	5	3	2
Carlos	5	5	5
Fortuna	6	4	3
Raimundo	6	4	4
Nilson	9	8	6
Damásio	10	7	6
Waldir	10	10	8
Pérola	10	7	6
Lourenço	20	16	12
Total	98	81	69

TABELA 5: Linhagens agrupadas segundo o valor mínimo significativo de similaridade e suas respectivas origens.

Grupos 1%	Linhagens 1%	Origem 1%	Grupos 0,1%	Linhagens 0,1%	Origem 0,1%
1	1	Barreiras	1	1	Barreiras
2	62,63	Lourenço		62,63	Lourenço
3	66	Lourenço	2	66	Lourenço
4	86	Ubaldo		86	Ubaldo
5	53,54,55	Lourenço	3	53,54,55,56	Lourenço
6	56	Lourenço		82	Carlos
7	82	Carlos	4	57,70	Lourenço
8	57	Lourenço	5	58,60	Lourenço
9	70	Lourenço	6	74	J.Carvalho
9	58	Lourenço		75,76,77	Raimundo
10	60	Lourenço	7	95,98	Pérola
11	74	J.Carvalho	8	64,65,67	Lourenço
12	75,76,77	Raimundo		78	Raimundo
13	95,98	Pérola		90,91,94,96	Pérola
14	64,67	Lourenço		99	Carioca 1
15	65	Lourenço		100	Carioca 2
	78	Raimundo		101	CariocaMG
16	90,91,94	Pérola		103	Pérola
17	96	Pérola	9	87	Ubaldo
	99	Carioca 1		89	Pérola
	100	Carioca 2	10	2	M.Flora
	101	CariocaMG		3	J.Souza
18	103	Pérola		12,14,15,16	Damásio
19	87	Ubaldo		4	Nicodemos
	89	Pérola		5	Nova União
20	2	M.Flora		7	D.Joaquim
21	3	J.Souza		8	Jaime
	5	Nova União		21,22,24,25	Fortuna
	12,14,15	Damásio	11	18	Damasio
22	4	Nicodemos	12	6	D.Joaquim
	25	Fortuna		9	Jaime
23	7	D.Joaquim	13	17	Damásio
	8	Jaime	14	27,32,33	Nilson
	16	Damásio		36,39	Waldir
	21,22,24	Fortuna		81	Carlos

TABELA 5 Cont.: Linhagens agrupadas segundo o valor mínimo significativo de similaridade e suas respectivas origens.

Grupos 1%	Linhagens 1%	Origem 1%	Grupos 0,1%	Linhagens 0,1%	Origem 0,1%
24	18	Damásio		34	Barbara
25	6	D.Joaquim		35	Nilson
	9	Jaime		40,42	Waldir
26	17	Damásio	15	46,47,49,50	Domenico
27	27,32	Nilson	16	48	Domenico
	36	Waldir	17	26,29	Nilson
28	39	Waldir	18	73	J.Carvalho
29	33	Nilson	19	19	Damasio
30	81	Carlos		20	Fortuna
31	34	Barbara	20	102	Aporé
	35	Nilson	21	30	Nilson
32	40	Waldir		44	Waldir
33	42	Waldir	22	45	Waldir
34	46,47	Domenico	23	43	Waldir
35	49,50	Domenico	24	92	Pérola
36	48	Domenico		93	Pérola
37	26	Nilson	25	10,11	Damásio
38	29	Nilson	26	13	Damásio
39	73	J.Carvalho	27	23	Fortuna
40	19	Damasio	28	37	Waldir
41	20	Fortuna	29	38	Waldir
42	102	Aporé	30	41	Waldir
43	30	Nilson	31	28	Nilson
44	44	Waldir	32	31	Nilson
45	45	Waldir	33	51	Lourenço
46	43	Waldir	34	59	Lourenço

TABELA 5 Cont.: Linhagens agrupadas segundo o valor mínimo significativo de similaridade e suas respectivas origens.

Grupos 1%	Linhagens 1%	Origem 1%	Grupos 0,1%	Linhagens 0,1%	Origem 0,1%
47	92	Pérola		80	Raimundo
48	93	Pérola	35	61	Lourenço
49	10,11	Damásio		79	Raimundo
50	13	Damásio		83	Carlos
51	23	Fortuna	36	97	Pérola
52	37	Waldir	37	84	Carlos
53	38	Waldir	38	85	Carlos
54	41	Waldir	39	88	Ubaldo
55	28	Nilson	40	72	J.Carvalho
56	31	Nilson	41	71	J.Carvalho
57	51	Lourenço	42	69	Lourenço
58	59	Lourenço	43	52	Lourenço
59	80	Raimundo			
60	61	Lourenço			
61	79	Raimundo			
62	83	Carlos			
63	97	Pérola			
64	84	Carlos			
65	85	Carlos			
66	88	Ubaldo			
67	72	J.Carvalho			
68	71	J.Carvalho			
69	69	Lourenço			
70	52	Lourenço			

Essa variação já havia sido previamente constatada em ensaios de avaliação de linhagens quanto à produtividade de grãos e reação a patógenos (Ramalho et al., 2001). É necessário mencionar que não houve correlação entre as similaridades médias das linhagens e as respectivas produtividades de grãos, estimadas por Abreu et al. (1997). No entanto, esse resultado já era previsto, pois a diversidade detectada pelo RAPD inclui a variação genética total, a qual tem sido positivamente correlacionada apenas com a variação conjunta de vários caracteres morfo-agronômicos do feijão (Duarte et al., 1999a; Duarte et al., 1999b; Machado et al., 2000). Uma causa da não correlação da similaridade genética, especificamente com a produção de grãos, é por que esta representa uma parcela muito pequena da variação morfo-agrônoma, menor de 2%, entre as cultivares avaliadas por Abreu et al. (1997).

Outro fato que é necessário salientar é a origem do polimorfismo gerado pelo RAPD, que corresponde a fragmentos aleatórios do genoma, amplificados ou não entre as linhagens utilizadas (Nienhuis et al., 1995). Há grandes chances de parcela considerável dos fragmentos serem provenientes de regiões que não codificam e independentes dos locos, que controlam os caracteres de interesse agrônomo. Daí a ausência de correlação com caracteres individuais como a produção de grãos. Contudo, é importante lembrar que a similaridade genética identifica com grande segurança o parentesco entre genótipos (Skrock et al. 1992; Hagiwara et al., 2001).

Considerando que o parentesco entre as linhagens apresentado na Figura 1 seja preciso, nota-se ampla diversidade entre as linhagens, mesmo entre aquelas tomadas em pequeno número por agricultor (Tabela 2). Houve a tendência de ocorrência de maior número de linhagens idênticas, nos agricultores de onde selecionou-se maior número. Por exemplo, na cultura do agricultor Lourenço, de onde foram selecionadas 20 linhagens, elas agruparam-se em 12 grupos. Apenas um dos grupos com três linhagens, que eram iguais à

cultivar Carioca. Portanto, a cultivar por ele utilizada possuía apenas 15% de sementes semelhantes à verdadeira cultivar Carioca. Contudo, é importante notar que 11 outras linhagens do mesmo produtor eram geneticamente pouco divergentes da Carioca (Figura 1). Dada a natureza aleatória do RAPD (Nienhuis et al., 1995), as linhagens acima poderiam ser consideradas linhagens da cultivar Carioca e terem sido provenientes, provavelmente por mutação. Nesse caso, cerca de 67% das sementes utilizadas pelo agricultor Lourenço devem pertencer à cultivar Carioca. Porém, 33% das linhagens são acentuadamente diferentes da Carioca. Entre elas, duas, a 59 e 61 são semelhantes e as demais são distintas. A origem dessas linhagens certamente é proveniente de cruzamento com outras cultivares bem diferentes da Carioca. Tais cruzamentos ocorreram naturalmente ou provavelmente foram realizados artificialmente, nos vários programas de melhoramento que vêm sendo conduzidos no Brasil, já há longo tempo. Nesse último caso, houve uma mistura das linhagens obtidas nesses programas com a cultivar Carioca.

Entre as 68 linhagens restantes, a maioria é também drasticamente diferente da cultivar Carioca e devem ter sido geradas a partir de cruzamentos com cultivares geneticamente contrastantes. Apenas uma, a linhagem 78, é igual à Carioca, selecionada na cultura do agricultor Raimundo. E, além dela, somente oito linhagens diferem da Carioca, porém são semelhantes e, igualmente, podem ter se originado por mutações espontâneas (Figura 1).

O elevado número de linhagens, geneticamente muito diferentes da cultivar Carioca, provavelmente é o resultado do desempenho superior dessas linhagens e a seleção delas, entre as 485 originalmente tomadas nas culturas dos agricultores por Abreu et al. (1997). Como as linhagens originais foram previamente avaliadas e selecionadas as 98 superiores, sobressaíram aquelas que certamente foram produtos de cruzamentos em programas de melhoramento.

Alguns resultados foram inesperados como a semelhança genética entre as testemunhas Carioca, Pérola e Carioca MG (Figura 1). Apesar disso, elas são diferentes em vários caracteres, como: porte, tipo de grãos e resistência a algumas raças de *C.lindemuthiranum* e *P.griseola*. Entretanto, a Pérola e a Carioca MG são descendentes de cruzamento em que participou como genitora a cultivar Carioca, além de terem sido selecionadas, tendo como padrão de referência a cultivar Carioca, o que significa que elas devem ter a maioria dos alelos e das regiões genômicas em comum. É importante mencionar que as três testemunhas foram utilizadas por Machado et al. (2000) os quais verificaram que elas também não diferiram geneticamente a partir do uso de 137 bandas polimórficas de RAPD. Aliás, um resultado que permite inferir mais uma vez, que as 81 bandas polimórficas, utilizadas no presente trabalho, foram suficientes para determinar o parentesco entre as linhagens.

Outro resultado também inesperado é a ocorrência isolada da testemunha Aporé. Ela foi igualmente selecionada de cruzamentos em que a cultivar Carioca foi genitora (Machado et al., 2000). Além disso, a cultivar Pérola é uma linhagem selecionada dentro da cultivar Aporé. Contudo, outros genitores da cultivar Aporé foram o México 168 e o BAT 76, que devem ter contribuído para diversidade genética da mesma. Assim, embora se esperasse que pelo menos a Pérola e Aporé fossem geneticamente semelhantes com base nas suas origens, o presente resultado foi também confirmado por Machado et al. (2000), que obtiveram uma estimativa de similaridade genética entre elas de 0,82, enquanto a estimativa no presente estudo foi de 0,80 - ambas indicando a diferença entre as duas cultivares ao nível de 1% de probabilidade. Além disso, nota-se na Figura 1, linhagens selecionadas dentro da cultivar Carioca, que foram ainda mais divergentes do que a Aporé. Como já enfatizado, elas devem ser provenientes de misturas de outras cultivares ou linhagens descendentes de genitores diferentes da Carioca.

Finalmente, vale mencionar que genótipos de milho com 88-89% de similaridade genética, baseada em marcadores aleatórios, exibiram acentuadas diferenças em produção de grãos e outros caracteres agronômicos (Troyer & Rocheford, 2002). Esses autores recomendam que deve se utilizar similaridade de 90% ou mais, para que linhagens de milho sejam consideradas cultivares essencialmente derivadas, para fins de proteção das mesmas. Esses resultados confirmam a ampla diversidade genética entre as linhagens utilizadas no presente estudo.

## 5 CONCLUSÕES

1. A similaridade genética, baseada em RAPD, permitiu identificar ampla divergência genética entre as linhagens.
2. A divergência genética foi maior entre as linhagens da cultivar Carioca do que entre as selecionadas na cultivar Pérola.
3. A cultivar Carioca utilizada pelos agricultores é muito diferente da cultivar original.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNOOR, R. V. **Uso de marcadores moleculares na avaliação da diversidade genética em cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 1994. 54 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

ABREU, A. de F. B. **Predição do potencial genético de populações segregantes do feijoeiro utilizando genitores inter-raciais**. 1997. 79 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ALMEIDA, L. D'A. de. **O feijão Carioca: reflexos de sua adoção**. Campinas: IAC, 2000. n. p.

ALMEIDA, L. D'A. de; LEITÃO FILHO, H. F.; MIYASAKA, S. **Características do feijão Carioca, um novo cultivar**. *Bragantia*, Campinas, v. 30, p. 33-38, abr. 1971. (Nota, 7)

**A REVOLUÇÃO DO CARIOQUINHA**. *Informação Apta*. São Paulo, v. 1, n. 1, p. 3-5, maio/jun. 2000.

BALARDIN, R. S.; JAROSZ, A. M.; KELLY, D. J. **Viluranc and molecular diversity in *Colletotrichum lindermuthianum* from South, Central and North America**. *Phytopathology*, St. Paul, v. 87, n. 12, p. 1189-1191, Dec. 1997.

BARBOSA, A. M. M. **Análise da variabilidade genética em progênis de Pupunha (*Bactris gavipaes* H. B. K.) por caracteres agrônômicos e RAPD**. 1997. 110 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual de São Paulo, Jabotocaba, SP.

BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. 716 p.

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

CASTANHEIRA, A. L. **Marcadores RAPD na avaliação de potencial de métodos de condução segregante**. 2001. 76 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CASTELLEN, M. da S. **Uso de marcadores RAPD e Isoenzimática na quantificação da diversidade genética em populações naturais de *Esenbeckia leocarpa* Engl.** 2000. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

COSTA, J. G. C.; ANTUNES, J. F. Determinação da porcentagem de cruzamentos naturais em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no município de Pelotas, RS. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 27., 1975, Belo Horizonte. **Resumos...** Belo Horizonte: SBPC, 1975. p. 252.

COSTA, J. G. C. da; ZIMMERMANN, M. J. de O. **Melhoramento Genético.** In: ZIMMERMANN, M. J. de O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. de. **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade.** Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa de Potassa e do Fosfato, 1988. 589 p.

CRUZ, C. D. **Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas.** 1990. 188 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

DEBOUCK, D. G.; THOME, J. Implications for bean breeders of studies on the origin of common beans, *Phaseolus vulgaris*, L. In: CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Current topics in breeding of common bean.** Cali, 1989. p. 3-47 (CIAT Working document, 47).

DICE, L. R. Measures of amount of ecological association between species. **Ecology**, Durham, v. 26, p. 297-302, 1945.

DUARTE, J. M.; SANTOS, J. B. dos; MELO, L. C. Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 3, p. 427-432, Sept. 1999a.

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**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 3, p. 419-426, Sept. 1999b.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. Lançamento do feijão pérola, nova cultivar para minas gerais. **Fazenda experimental de Felixlândia.** EPAMIG, 1997.

FAIRBANKS, D. J.; WALDRIGUES, A.; RUAS, C. R. et al. Efficient characterization of biological diversity using field DNA and random amplified

- polymorphic DNA markers. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 16, n. 1, p. 11-22, mar. 1993.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1995. 220 p.
- FRANCO, M. C.; CASSINI, S. T. A.; OLIVEIRA, V. R.; TSAI, S. M. Caracterização da diversidade genética em feijão por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 381-385, fev. 2001.
- GARCIA-MAS, J.; OLIVER, M.; GÓMEZ-PANIAGUA, H.; VICENTE, M. C. de. Comparing AFLP, RAPD, and RFLP markers for measuring genetic diversity in Melon. **Theoretical and Applied Genetics**. Berlin, v. 101, n. 1, p. 860-864, Jan. 2000.
- GEPTS, P.; DEBOUCK, D. Origin, domestication and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L. ). In: VAN SCHOONHOVEN, A.; VOYSEST, O. (Ed.). **O Common bean: research for crop improvement**. Cali: CIAT, 1991. v. 1, p. 7-53.
- GOWER, J. C. A general coefficient of similarity and some of its properties. **Biometrics**, Washington, v. 27, n. 4, p. 857-874, Dec. 1971.
- HAGIWARA, W. E.; Santos, J. B. dos; Carmo, S. L. M. Use of RAPD to aid selection in common bean backcross breeding programs. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, n. 4, p. 355-362, 2001
- HALWARD, T.; STALKER, T.; LARUE, E.; KOCHERT, G. Use of single-primer DNA amplifications in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L. ). **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 18, n. 2, p. 315-325, Jan. 1992.
- HARLAN, J. R. Agricultural origins: centers and noncenters. **Science**, Washington, v. 174, n. 4008, p. 468-474, Oct. 1971.
- HARLAN, J. R. Geographic patterns of variation in some cultivated plants. **Journal of Heredity**, Baltimore, v. 66, n. 3, p. 184-191, May/June 1975.
- JOHANNSEN, W. L. **Veber erblichkeit in popilationen and in reinen leinem**. Jena: Gustav. Fischer, 1903.

- JOHNS, M. A.; SKROCH, P. W.; NIENHUIS, J. et al. 1997. Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. **Crop Science**, Madison, v. 35, n. 2, p. 605-613, Mar./Apr. 1997.
- 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.
- 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, Feb. 1998
- KRZANOWSKI, W. J. **Principles of multivariate analysis: a user's perspective**. Oxford: Oxford Science, 1988. 563 p.
- LOVE, H. H. **Report on rice investigations, 1950-54**. Bangkok: United States Operations Mission to Thailand, 1955. 148 p.
- MACHADO, C. de F. **Procedimentos para a escolha de genitores de feijão**. 1999. 118 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- MACHADO, G. F.; SANTOS, J. B. dos; NUNES, G. H. de S.; DUARTE, J. M. Efficiency of genetic distance based on RAPD markers for choosing parents of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal Genetics & Breeding**, Rome, v. 54, n. 4, p. 251-258, Dec. 2000.
- MARIN, A. L. A. **Identificação de marcadores moleculares RAPD ligados a resistência à antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1996. 53 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- 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. **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**. 2000. 148 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MELOTTO, M.; ALFANADOR, L.; KELLY, J. D. Development of a SCAR marker linked to the I gene in common bean. *Genome*, Ottawa, v. 39, n. 6, p. 1216-1219, Dec. 1996.

METAIS, I.; AUBRY, C.; JALOUZOT, R. & PELTIER, D. Description and analysis of genetic diversity between commercial bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 101, n. 1, p. 1204-1214, Mar. 2000.

MILACH, S. C. K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S. C. K. *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 17-28.

MORAIS, O. P. **Análise de divergência genética dos progenitores, índices de seleção e seleção combinada numa população de arroz oriunda de inter cruzamentos usando macho-esterilidade.** 1992. 251 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MOSS, D. W. *Isoenzymes*. New York: Capman & Hall, 1982.

MÜHLEN, G. S. **Avaliação da diversidade genética de etnovarietades de mandioca (*Manihot exculenta* Crantz) com marcadores de DNA, RAPD, AFLP e Microssatélites.** 1999. 176 p. Tese (Doutorado Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

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; 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.

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, n. 4, p. 842-851, July/Aug. 1994.

MUMM, R. H.; DUDLEY, J. W. A PC SAS computer program to generate dissimilarity matrix for cluester 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, n. 4, p. 852-865, July/Aug. 1994.
- MUNIZ, J. A. **Inferência sobre parâmetros relativos à estrutura genética de populações com dados de frequências gênicas**. 1994. 223 p. Tese (Doutorado em Estatística e Experimentação Agronômica) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.
- NELSON, A. J.; ELIAS, K. S.; AREVALO, G. E.; DARLINGTON, L. C. & BAILEY, B. A. Genetic characterization by RAPD analysis of isolates on *Fusarium oxysporum* f. sp. *erythroxyli* associated with a emerging epidemie in Peru. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 12, p. 1220-1225, Sept. 1997.
- NEWBURY, H. J.; FORD-LLOYD, B. V. The use of RAPD for assessing variation in plants. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 12, n. 1/2, p. 43-51, Jan. 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, Sept. 1995
- 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.
- PACOVA, B. E. V.; ROCHA, A. C. de M. Hibridação natural no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Linhares, Espírito Santo. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 22, n. 120, p. 157-158, mar./abr. 1975.
- PAINTING, K. **Measuring genetic variation using molecular markers**. Unit 10. 1. 4. **International Plant Genetic Resource**. Rome: Brain Ford-Lloyd, University of Birmingham, 1996. 82 p.
- PASSOS-BUENO, M. R.; ZATZ, M. A. A técnica de PCR e suas aplicações em doenças genéticas humanas. In: LARA, F. J. S. (Org.). **Hibridação de ácidos nucléicos**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. p. 72-88.
- 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.

PETERNELLI, L. A.; BORÉM, A. Hibridação em feijão. In: BORÉM, A. (Ed.). **Hibridação artificial de Plantas**, Viçosa: UFV, 1999. p. 269-294.

PHILLIPS, R. L. Ucoventional sources of genetic diversity: de novo variation and elevated epistasis. In: **BIOWORK II – PLANT BREEDING IN THE TURN OF THE MILLENNIUM**. Viçosa: UFV, 1999. p. 103-131.

POMPEU, A. S. Polinização cruzada natural no feijoeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 22, n. 5, p. 55-57, jan. 1963.

RAINA, S. N.; RANI, V.; KAJIMA, T.; OGIHARA, Y.; SINGH, K. P.; DEVARUMATH, R. M. Rapid and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogne*) cultivars and wild species. **Genome**, Ottawa, v. 44, n. 5, p. 763-772, Oct. 2001.

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. de F. B. Cultivares. In: VIEIRA, C.; PAULA Jr. T. J. de; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão: aspectos gerais e culturais no Estado de Minas**. Viçosa: UFV, 1998. p. 435-449.

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. de F. B.; GONÇALVES, F. M. A. Seleção de linhas puras na cultivar de feijão Carioca. In: ENCONTRO MINEIRO DE GENETICISTAS, 6., 2001, Lavras. 2001. **Anais...** Lavras: Sociedade Brasileira de Genética Regional, 2001. p. 51

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. de F. B.; SANTOS, J. B. dos  
Melhoramento de plantas autógamas. In: NASS, L. L.; MELO, D. I. S. (Ed.). **Melhoramento de plantas e microorganismos**. . Viçosa: UFV, 1998. p. 435-449.

RAMALHO, M. A. P.; PINTO, C. A. B. P. P.; SANTA CECÍLIA, F. C.  
Avaliação de amostras de cultivares de feijão roxo e seleção de progênies. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 35-43, jan./jun. 1982.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; ZIMMERMANN, M. J. O.  
**Genética quantitativa em plantas autógamas: aplicações no melhoramento do feijoeiro**. Goiânia: UFG, 1993. 271 p.

RAO, C. R. **Advanced statistical methods in biometrics research**. New York: Wiley, 1952. 230 p.

RAPOSO, F. V. **Comparação de métodos de condução de população segregante na cultura do feijoeiro.** 1999. 73 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

RASMUSSEN, D. C.; PHILLIPS, R. L. Plant breeding progress and genetic diversity from de novo variation and elevated epistasis. **Crop Science**, Madison, v. 37, n. 2, p. 303-310, Mar./Apr. 1997.

REGAZZI, A. J. Análise multivariada. In: ENCONTRO MINEIRO DE GENETICISTAS, 5., 1998, Viçosa. **Anais...** Viçosa: Sociedade Brasileira de Genética Regional, 1998. p. 55.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system.** New York, version 1. 70, 1992. 470 p.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALLONA, 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.

SAKYAMA, N. S. Marcadores moleculares e as hortaliças. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 10, p. 1203-1211, out. 1993.

SANTOS, J. B. dos; GALVILANES, M. L. Botânica. In: VIEIRA, C.; PAULA JR. T. J. de; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão: aspectos gerais e culturais no Estado de Minas.** Viçosa: UFV, 1998. p. 55-8.

SANTOS, J. B. dos; GAVILANES, M. L. Botânica. In: VIEIRA, L.; PAULA, J. R. T. J. de; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão: aspectos gerais e culturais no Estado de Minas Gerais.** Viçosa: UFV, 1998. p. 55-81.

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, n. 8, p. 909-915, Mar. 1994.

SANTOS, P. S. J. **Seleção de linhas puras na cultivar de feijão Carioca.** 2001. 59 p. Dissertação (Mestrado em Genética Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SEOANE, C. E. **Variação genética e os efeitos da fragmentação florestal em populações de guarantã (*Esenbeckia leiocarpa*) – Um exemplo de espécie tropical arbórea climática de distribuição agregada.** 1998. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Campinas, Campinas, SP.

SICARD, D.; MICHALAKIS, Y.; DRON, M.; NEEMAN, C. Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the Three centers of diversity of its hosts, *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 8, p. 807-813, Aug. 1997.

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. 359 p.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach.** 2 ed. New York: McGraw-Hill, 1980. 633 p

STILES, J. I.; LEMME, C.; SONDUR, S.; MORSHIDI, M. B.; MANSIHARDT, R. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationship among papaya cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, n. 6/7, p. 748-749, 751, Feb. 1993.

STIRLING, G. R.; EDEN, L.; AITKEN, E. The role of molecular biology in developing biological controls for parasitic nemates. In: GUNASSEKARAN, M.; WEBER, D. J. (Ed.). **Molecular biology of the biological control of pest and diseases of plants.** Boca Raton, Florida: CRC, 1995. p. 71-89.

TROYER, A. F.; ROCHEFORD, T. R. Germplasm ownership: related corn inbreds. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 1, p. 3-9, Jan./Feb. 2002.

TSENG, C.; TING, E.; JOHNSON, D.; SALUTA, M.; DUNST, R. Use of RAPD fingerprinting for differentiating *E. coli* isolates from human and animal sources. In: **Life Science News. Amershan Pharmacia Biotech**, n. 7, p. 10-11, 2001.

VAS, A. Polymerase chain reaction and other gene techniques in pharmacogenetics: na introduction and review. **Acta Physiologica Hungarica**, Budapest, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

- VASCONCELOS, M. J. V. de. Genetic diversity of common bean *Phaseolus vulgaris*. L. determined by DNA-based molecular markers. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 19, n. 3, p. 447-450, Sept. 1996
- VIEIRA, C.; BORÉM, A.; RAMALHO, M. A. P. Melhoria do Feijoeiro. In: BORÉM, A. (Ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 273-349.
- VIEIRA, E. S. N. **Similaridade genética entre cultivares de feijão do grupo carioca por meio de marcadores morfológicos e moleculares visando a certificação da pureza genética**. 2000. 84 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- VISSCHER, P. M.; HARLEY, C. S.; THOMPSON, R. Marker-assisted introgression in backcross breeding programs. **Genetics**, n. 144, p. 1923-1932, 1996
- VOYSEST, O. **Variedades de frijol em America Latina y su origen**. Cali: CIAT, 1983. 87 p.
- WEINSTEIN, A. I. Cytological studies on *Phaseolus vulgaris*. **American Journal of Botany**, New York, v. 13, p. 248-263, 1926.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, Nov. 1990.
- WILDE, J.; WAUGH, R.; POWELL, W. Genetic fingerprinting of *Teobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 83, n. 6/7, p. 871-877, Apr. 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**, Berlin, v. 86, p. 497-504, 1993.
- WILLIAMS, J. G. K.; HANAFEY, M. K.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods Enzymology**, San Diego, v. 218, p. 704-740, 1993.
- 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, Nov. 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; RAFALSKI, A. R.; TINGEY, S. V. Genetic analysis using RAPD markers. *Method Enzymology*, San Diego, v. 218, p. 704-740, 1993.

## **ANEXO**

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1 A - Matriz de zero e um das 103 linhagens, obtidas a partir do padrão de bandas polimórficas.....</b>	<b>56</b>

**Tabela 1A: Matriz de zero e um das 103 linhagens, obtidas através do padrão de bandas**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
a4	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
a4	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1
a4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
a4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
a4	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1
a4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1
b10	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
b10	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
b10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
e6	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
e6	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
e6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
e6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
e20	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
e20	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
e20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
f10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
f10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
f10	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
f10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
g4	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
g4	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0
g16	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
g16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
g16	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
g16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
g19	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
g19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
g19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
g19	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
h19	0	1	1	1		1	0	1	0	1	0	1	1	1	1			1	0			1	1	1	1
h19	1	1	1	1		1	1	1	0	1	0	0	0	1	0			0	0			1	1	1	1
h19	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			1	0			1	1	1	1
h19	0	0	0	0		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0			1	1			1	1	0	0





Tabela 1A Cont.: Matriz de zero e um das 103 linhagens, obtidas através do padrão de bandas

26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1
1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1
0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1
1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1

Tabela 1A Cont.: Matriz de zero e um das 103 linhagens, obtidas através do padrão de bandas

0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1		
1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0		
1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0		
1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0		
1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1		1	0	0	0	0	1	1	1	0	0		
1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1		1	0	0	0	1	1	1	1	0	1		
1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	0	1		
1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1		1	0	0	0	1	0	0	1	0	1		
0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1		
1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1		
1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1		
0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1		1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	
1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	0	1	0	1		
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1		0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1		1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0		1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0		0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1		1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	
1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1		0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	
1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1		1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1		1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1		1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1		0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0		0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1		0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1

Tabela 1A Cont.: Matriz de zero e um das 103 linhagens, obtidas através do padrão de bandas

1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1
1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0
0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1
1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1
1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1

Tabela 1A Cont.: Matriz de zero e um das 103 linhagens, obtidas através do padrão de bandas

51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	
1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	
1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	
1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	
0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	
1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	
1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	
1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	
0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	
0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
1	1	1	1	1	1		0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	
1	0	1	1	1	1		1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	
1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	
0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	
0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	
1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

Tabela 1A Cont.: Matriz de zero e um das 103 linhagens, obtidas através do padrão de bandas

0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1
1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0
0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1
0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0
1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0
0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0
1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1
0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1
1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabela 1A Cont.: Matriz de zero e um das 103 linhagens, obtidas através do padrão de bandas

1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	
1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1
1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1

Tabela 1A Cont.: Matriz de zero e um das 103 linhagens, obtidas através do padrão de bandas

76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103			
1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0			
1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0		
1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1		
1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1		
1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0		
0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1		
1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	
1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0		
0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	



Tabela 1A Cont.: Matriz de zero e um das 103 linhagens, obtidas através do padrão de bandas

0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1
0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1
1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1
0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1
1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1

Tabela 1A Cont.: Matriz de zero e um das 103 linhagens, obtidas através do padrão de bandas

1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	
1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	
1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	
1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1