

VILMAR ANTONIO RAGAGNIN

SELEÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E COMPORTAMENTO DE ISOLINHAS DE  
FEIJOEIRO-COMUM RESISTENTES À FERRUGEM, ANTRACNOSE E  
MANCHA-ANGULAR

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Genética e  
Melhoramento, para obtenção do título  
de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2001

VILMAR ANTONIO RAGAGNIN

SELEÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E COMPORTAMENTO DE ISOLINHAS DE  
FEIJOEIRO-COMUM RESISTENTES À FERRUGEM, ANTRACNOSE E  
MANCHA-ANGULAR

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Genética e  
Melhoramento, para obtenção do título  
de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de janeiro de 2001.

---

Prof. Maurílio Alves Moreira  
(Conselheiro)

---

Dra. Ana Lilia Alzate-Marin  
(Conselheira)

Prof. Cosme Damião Cruz

Dr. Ivan Schuster

---

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros  
(Orientador)

Aos meus pais Aldemiro e Dinorá.

*Aos meus irmãos Dirceu, Eneli, Sueli, Clarice,*

*Darci, Deloci, Luís, Rosane e Osmar.*

*Aos meus sobrinhos Max, Maxiel, Tiago, Alexandre,*

*Paulo Henrique, Lucas, Jean Carlos,*

*Geovani, Diemerson, Carlos Murilo, Matheus,*

*Daniela, Jéssica e Ana Maria.*

*Aos meus amigos.*

## AGRADECIMENTO

A Deus, por ter me concedido vitória nas lutas enfrentadas e possibilitado alcançar mais este importante objetivo.

Aos meus queridos pais Aldemiro Agnelo Ragagnin e Dinorá Albina Ceolin Ragagnin, pelos exemplos de amor e dedicação aos filhos.

Aos meus estimados irmãos Dirceu, Eneli, Sueli, Clarice, Darci, Deloci, Luís Carlos, Rosane e Osmar, pelo apoio e pela compreensão durante a minha ausência.

Ao povo brasileiro, por, mantendo a escola pública e gratuita do básico ao universitário, ter possibilitado-me a conquista das oportunidades oferecidas.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), especialmente ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros, pela competente orientação, pela confiança e amizade, pelo apoio e incentivo desde o período de minha Iniciação Científica e por sua colaboração em todas as etapas dessa minha formação e dos meus trabalhos.

Ao professor Conselheiro Maurílio Alves Moreira, pelas sugestões, pelo zelo incansável com as condições de pesquisa, pelo exemplo de dedicação à UFV e pela eficiência no planejamento e na sugestão da pesquisa científica.

À Dra. Ana Lilia Alzate-Marin, pelos ensinamentos, pelos conselhos, pela atenção dispensada e pelas valiosas sugestões.

Ao meu amigo Fábio Gelape Faleiro, pelo acompanhamento desde a época de Iniciação Científica, pelo companheirismo, pelos conselhos e ajuda no início do programa, pelos primeiros ensinamentos com técnicas de experimentação e técnicas de Biologia Molecular, pelos conselhos durante a execução deste projeto e pela colaboração na compreensão dos resultados.

A todos os professores que ministraram as disciplinas do Programa, pelos ensinamentos.

À Diretoria do CNPq, pelo auxílio financeiro, sem o qual nada teria sido realizado.

Aos colegas de trabalho Ivan, Sílvia, Eveline, Valéria, Ronan, Marta, Marcio Antônio, Marco Antônio, Jay, Cynthia, Márcia, Cláudia, Wagner, Rita, Abelmon, Francisco, Pedro Ivo, Maria Luiza, João Paulo, Marcelo, Thiago, Samir, Renato, Cristyano, Clever e funcionários do BIOAGRO/UFV, pela ajuda e agradável convivência.

Aos colegas de República Márcio, Leandro e Catalunha, pelo convívio democrático e alegre.

Ao Sr. José Pinto Rosa, pelo apoio constante nas atividades na casa de vegetação.

A todos os meus amigos e colegas do Programa, por terem contribuído, direta ou indiretamente, para a conclusão desta tese.

## BIOGRAFIA

VILMAR ANTONIO RAGAGNIN, filho de Aldemiro Agnelo Ragagnin e Dinorá Albina Ceolin Ragagnin, nasceu em Vicente Dutra, RS, em 09 de fevereiro de 1971.

Cursou o primário de 1ª a 5ª série na Escola Municipal Aluísio Braun, na localidade de Ferminão, e de 6ª a 7ª série na Escola Estadual de Primeiro Grau Engº. Álvaro Leitão, no Distrito de Laranjeiras, Município de Vicente Dutra, RS.

Cursou a 8ª série ginásial na Escola Estadual Polivalente Dante Mosconi, em Jataí, GO.

Cursou o segundo grau científico na Escola Paroquial Santa Helena, em Santa Helena de Goiás, GO.

Em 1994, iniciou o curso superior na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, colando grau em março de 1999 como Engenheiro-Agrônomo.

No período de 1997/98 – 1998/99, na UFV, desenvolveu atividades de Iniciação Científica na área de Genética Molecular Aplicada ao Melhoramento Genético Vegetal.

Em abril de 1999, iniciou o Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Genética e Melhoramento, área de Genética Molecular, na UFV, submetendo-se à defesa de tese em janeiro de 2001.

## CONTEÚDO

	Página
RESUMO .....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. O melhoramento do feijoeiro no Brasil.....	4
3.2. Principais doenças do feijoeiro .....	4
3.3. Uso de marcadores moleculares no melhoramento do feijoeiro .....	7
CAPÍTULO 1.....	9
SELEÇÃO DE ISOLINHAS DE FEJJOEIRO HOMOZIGOTAS PARA GENES DE RESISTÊNCIA A FERRUGEM, ANTRACNOSE E MANCHA- ANGULAR.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	11
2.1. Materiais genéticos e cruzamentos .....	11
2.2. Patótipos utilizados e preparo do inóculo .....	12
2.3. Inoculação e avaliação da doença.....	13
2.4. Análise de segregação dos genes de resistência .....	14
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
3.1. Isolinhas RC <sub>3</sub> F <sub>2</sub> – Cruzamento entre Rudá e Ouro Negro .....	15
3.2. Isolinhas RC <sub>4</sub> F <sub>2</sub> – Cruzamento entre Rudá e TO .....	17

3.3. Isolinhas RC <sub>4</sub> F <sub>2</sub> – Cruzamento entre Rudá e AB 136 .....	19
3.4. Isolinhas RC <sub>4</sub> F <sub>2</sub> – Cruzamento entre Rudá e AND 277 .....	20
3.2. Análise de segregação dos genes de resistência .....	21
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	23
CAPÍTULO 2.....	24
SELEÇÃO DE ISOLINHAS DE FEIJOEIRO RESISTENTES A FERRUGEM, ANTRACNOSE E MANCHA-ANGULAR GENETICAMENTE MAIS PRÓXIMAS DO GENITOR RECORRENTE .....	24
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	26
2.1. Material genético.....	26
2.2. Extração do DNA .....	26
2.3. Amplificação pela técnica de RAPD.....	27
2.4. Análise dos dados .....	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	37
CAPÍTULO 3.....	39
REAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE ISOLINHAS DE FEIJOEIRO A DIFERENTES PATÓTIPOS DE <i>Uromyces appendiculatus</i> , <i>Colletotrichum</i> <i>lindemuthianum</i> e <i>Phaeoisariopsis griseola</i> .....	39
1. INTRODUÇÃO.....	39
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	41
2.1. Material genético.....	41
2.2. Reação de resistência a <i>Uromyces appendiculatus</i> .....	42
2.3. Reação de resistência a <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	43
2.4. Reação de resistência a <i>Phaeoisariopsis griseola</i> .....	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
3.1. Análise da reação de resistência à ferrugem .....	46
3.2. Análise da reação de resistência à antracnose.....	47
3.3. Análise da reação de resistência à mancha-angular.....	48
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	50

CAPÍTULO 4.....	52
CARACTERIZAÇÃO DE ISOLINHAS DE FEIJOEIRO COM MARCADORES MOLECULARES LIGADOS À RESISTÊNCIA A DIFERENTES PATÓTIPOS DE FERRUGEM, ANTRACNOSE E MANCHA-ANGULAR .....	52
1. INTRODUÇÃO.....	52
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	54
2.1. Material genético.....	54
2.2. Caracterização molecular.....	55
2.2.1. Extração do DNA .....	55
2.2.2. Amplificação pela técnica de RAPD .....	55
2.2.3. Amplificação pela técnica de SCAR .....	55
2.2.4. Amplificação utilizando SSR.....	56
2.2.5. Marcadores moleculares utilizados .....	57
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	62
CAPÍTULO 5.....	63
ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS GENÉTICOS, CORRELAÇÕES GENOTÍPICAS, FENOTÍPICAS E AMBIENTAIS, COMPARAÇÃO ENTRE MÉDIAS E ANÁLISE DE TRILHA EM NIL's DE FEIJOEIROS RESISTENTES A FERRUGEM, ANTRACNOSE E MANCHA-ANGULAR .....	63
1. INTRODUÇÃO.....	63
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	65
2.1. Material genético.....	65
2.2. Ensaio de campo.....	65
2.2.1. Delineamento experimental .....	66
2.2.2. Caracteres avaliados .....	66
2.4. Análises de variância conjunta .....	67
2.5. Parâmetros genéticos e seus estimadores .....	70
2.6. Comparação entre médias.....	70
2.6.1. Teste de Tukey.....	70
2.6.2. Teste de Dunnett .....	71
2.7. Coeficientes de correlações genotípicas, fenotípicas e ambientais.....	71
2.8. Análise de trilha.....	72
2.8.1. Diagrama causal único.....	72

2.8.2. Diagrama em cadeia .....	75
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
3.1. Análise de variância individual .....	77
3.2. Análise de variância conjunta .....	79
3.3. Comparação entre médias.....	81
3.4. Coeficientes de correlação.....	83
3.5. Análise de trilha.....	86
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	90
CONCLUSÕES GERAIS .....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	95

## RESUMO

RAGAGNIN, Vilmar Antonio, M. S., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2001.

**Seleção, caracterização e comportamento de isolinhas de feijoeiro-comum resistentes à ferrugem, antracnose e mancha-angular.** Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Conselheiros: Maurílio Alves Moreira e Dra. Ana Lília Alzate-Marin.

Isolinhas de feijoeiro-comum obtidas por cruzamentos em que o cultivar Rudá foi o genitor recorrente foram inoculadas com diferentes patótipos de ferrugem, antracnose e mancha-angular, analisadas com marcadores moleculares de DNA e avaliadas por meio de características quantitativas. As inoculações feitas em isolinhas RC<sub>n</sub>F<sub>2:3</sub> indicaram que as proporções entre as famílias heterozigotas e homozigotas para a resistência foram 2:1 em todos os cruzamentos. Para resistência à ferrugem e antracnose simultaneamente, foram selecionadas 13 isolinhas do retrocruzamento Rudá x Ouro Negro. Para resistência à antracnose, foram selecionadas, ainda, outras 16 isolinhas, sendo 10 isolinhas provenientes do retrocruzamento Rudá x TO e seis do retrocruzamento Rudá x AB 136. Cinco isolinhas homozigotas do retrocruzamento Rudá x AND 277 foram selecionadas para resistência à mancha-angular. De todas as isolinhas homozigotas, foram selecionadas aquelas geneticamente mais próximas do genitor recorrente, pela utilização de marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Essas isolinhas foram utilizadas para avaliar a reação de resistência a ferrugem, antracnose e mancha-angular causadas pelos patótipos *Uromyces appendiculatus*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Phaeoisariopsis griseola*, respectivamente. As isolinhas ON-25-99 e ON-48-99 se comportavam como resistentes a todos os patótipos de ferrugem inoculados. As isolinhas TO-41-5-6-24 e AB-74-1-13 foram resistentes a todos os patótipos de antracnose testados. A isolinha AN-7-2-9-4-6 foi resistente aos seis isolados de mancha-angular testados. As isolinhas mais próximas geneticamente do recorrente foram caracterizadas com marcadores moleculares fortemente ligados aos genes de resistência dos genitores doadores. Treze marcadores foram testados, e oito deles (OPAZ20<sub>940</sub>, OPB03<sub>1800</sub>, OPH13<sub>490</sub>, ScarBA08<sub>560</sub>, ScarF10<sub>1050</sub>, OPX11<sub>630</sub>, OPY20<sub>830</sub> e Satt174) podem ser potencialmente utilizados para dar continuidade ao processo de pirimidização dos genes de resistência no cultivar Rudá. Os outros cinco marcadores sofreram recombinação no processo de

retrocruzamento. As isolinhas foram, ainda, testadas para características quantitativas, em que foram estimados diferentes parâmetros genéticos, correlações fenotípicas, genotípicas e ambientais e efeitos diretos e indiretos de cada característica sobre a produção, mediante o uso da análise de trilha conduzido em dois ambientes diferentes. Os caracteres “número de vagens por planta” e “número de sementes por vagem” apresentaram maiores correlações genotípicas com a produção por planta. A média das características e a precisão experimental foram semelhantes nos dois ensaios. Os resultados encontrados neste trabalho são importantes para dar continuidade ao processo de piramidização de genes visando à resistência a ferrugem, antracnose e mancha-angular no cultivar Rudá atualmente sendo conduzido pelo BIOAGRO/UFV.

## ABSTRACT

RAGAGNIN, Vilmar Antonio, M. S., Universidade Federal de Viçosa, January 2001.

**Selection, characterization and behavior of common bean isolines resistant to rust, anthracnose, and angular leaf spot.** Advisor: Everaldo Gonçalves de Barros. Committee Members: Maurílio Alves Moreira and Dr. Ana Lilia Alzate-Marin.

Common bean isolines obtained from crosses in which cultivar Rudá was the recurrent parent were inoculated with different rust, anthracnose, and angular leaf spot pathotypes, and also characterized with DNA molecular markers and evaluated for quantitative traits. The inoculations done in BC<sub>n</sub>F<sub>2:3</sub> isolines showed that the proportion between heterozygous and homozygous resistant plants was 2:1 for all crosses. Thirteen homozygous isolines resistant to rust and anthracnose simultaneously were selected from the cross Rudá x Ouro Negro. Sixteen isolines resistant to anthracnose were selected, 10 from the cross Rudá x TO, and six isolines from the cross Rudá x AB 136. Six homozygous isolines resistant to angular leaf spot were selected from the cross Rudá x AND 277. The isolines genetically closer to the recurrent parent were identified with the use of the random amplified DNA (RAPD) technique. These lines were tested against different pathotypes of the causing agents of rust, anthracnose and angular leaf spot, *Uromyces appendiculatus*, *Colletotrichum lindemuthianum* and *Phaeoisariopsis griseola*, respectively. Isolines ON-25-99 and ON-48-99 were resistant to all rust pathotypes tested. Isolines TO-41-5-6-24 and AB-74-1-13 were resistant to all anthracnose pathotypes tested. Isoline AN-7-2-9-4-6 was resistant to six angular spot pathotypes tested. The isolines which were genetically closer to the recurrent parent were characterized with molecular markers previously shown to be tightly linked to disease resistance genes in the donor parents. Thirteen markers were tested and eight of them (OPAZ20<sub>940</sub>, OPB03<sub>1800</sub>, OPH13<sub>490</sub>, ScarBA08<sub>560</sub>, ScarF10<sub>1050</sub>, OPX11<sub>630</sub>, OPY20<sub>830</sub> and Satt174) proved to be potentially useful in a breeding program to pyramid the resistance genes in the same cultivar. The other five markers separated from the resistance loci due to recombinations during the backcrossing process. The isolines were also tested for quantitative traits and different genetic parameters, phenotypic, genotypic and environmental correlations, and the direct effect of each characteristic on productivity by using path analysis in two different environments. The characters 'number of pods per plant' and 'number of seeds per pod' presented the

highest correlations with productivity per plant. The mean values for the traits and the experimental precision were similar for both assays. Our results will be important to continue the pyramidation process of resistance genes for rust, anthracnose, and angular leaf spot in the cultivar Rudá presently being conducted at BIOAGRO/UFV.

## 1. INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um importante alimento para a população brasileira, constituindo fonte básica de proteína na dieta de milhões de pessoas de diferentes classes sociais. O hábito de consumo de feijão pela família brasileira, associado à ampla adaptação climática dessa cultura, faz com que o feijão esteja distribuído por todo o território nacional. O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão-comum, apresentando área de plantio superior a cinco milhões de hectares e consumo anual “per capita” de mais de 10 kg (IBGE, 1994).

Apesar de alta, a produção brasileira “per capita” vem decaindo nos últimos anos, em razão do incremento populacional do país. Com isso, o preço do produto sobe, há necessidade de sua importação e cai o seu consumo, com evidente prejuízo para a alimentação do brasileiro em geral. Além disso, a produtividade média da cultura no país está estacionada ao redor de 600 kg/ha, mesmo considerando que, no Brasil, a cultura do feijão tem potencial para produzir até 3.800 kg/ha (ARAUJO et al., 1996).

Um dos importantes fatores que limitam a produtividade do feijoeiro e o desempenho da cultura como um todo são as enfermidades. VIEIRA (1983) citou mais de 30 doenças que podem atingir o feijoeiro, das quais cerca de oito são de maior importância. As demais, em geral de menor importância, podem, no entanto, ocasionar danos severos em condições específicas. Entre as doenças consideradas de maior importância no território nacional, merecem destaque: a ferrugem, causada por *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger var. *appendiculatus*; a antracnose, por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) Scrib.; e a mancha-angular, por *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.), sendo todas de origem fúngica. Essas enfermidades são especialmente problemáticas, porque os fungos causadores destas apresentam grande número de formas patogênicas especializadas, as chamadas “raças fisiológicas ou patótipos”.

A existência de patótipos dificulta o trabalho de desenvolvimento de cultivares resistentes. A concentração de genes de resistência numa único cultivar comercial (piramidização de genes) é uma solução que pode ser sugerida para solucionar esse problema.

O controle da doença por produtos químicos, principalmente em culturas não-irrigadas, é pouco utilizado pelos agricultores, porque aumenta o custo de produção e demanda conhecimento tecnológico adequado. Além disso, os produtos químicos contaminam o ambiente e prejudicam a saúde do homem. Assim, o uso de cultivares resistentes no controle de doenças tem recebido atenção de pesquisas por ser uma estratégia eficiente, segura, barata e acessível a produtores de qualquer nível econômico.

Nos últimos anos, o Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV tem concentrado esforços na piramidização de genes de resistência a ferrugem, antracnose e mancha-angular, com o auxílio de marcadores moleculares. Ao longo desse processo, várias linhas isogênicas tem sido desenvolvidas, principalmente no *background* genético Rudá. Nesse processo, a caracterização das linhas produzidas é de grande importância para facilitar a piramidização dos genes de resistência e o seu teste no ensaio preliminar de linhagens. Além disso, as isolinhas contrastantes para resistência a ferrugem, antracnose e mancha-angular constituem excelente material genético para trabalhos de biologia molecular visando à clonagem de genes associados ao processo de resistência a essas doenças, bem como ao entendimento da interação molecular planta\_patógeno.

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos principais deste trabalho foram selecionar e caracterizar isolinhas homozigotas resistentes à ferrugem, à antracnose e à mancha-angular.

Os objetivos específicos foram:

- Selecionar, por meio do teste de progênie, as isolinhas de feijoeiro resistentes a ferrugem, antracnose e mancha-angular.
- Selecionar isolinhas mais próximas ao genitor recorrente (Rudá), por meio do uso de marcadores moleculares RAPD.
- Caracterizar as isolinhas com marcadores moleculares previamente identificados no Programa de Melhoramento do BIOAGRO/UFV.
- Avaliar a reação de resistência ou suscetibilidade dessas isolinhas quanto à resistência a diferentes patótipos de ferrugem, antracnose e mancha-angular.
- Selecionar isolinhas contrastantes para a resistência a essas doenças.
- Avaliar o comportamento das isolinhas resistentes em condições de campo.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. O melhoramento do feijoeiro no Brasil

De acordo com VIEIRA et al. (1999), os programas de melhoramento do feijoeiro no Brasil têm visado, sobretudo, ao aumento da capacidade de produzir sementes e à resistência a doenças. Outros objetivos, entretanto, têm recebido atenção, como a resistência à seca e a criação de cultivares mais apropriados à colheita mecanizada, mas, em geral, tais caracteres têm importância secundária.

Num programa de melhoramento que visa aumentar a produtividade, devem ser consideradas as grandes diferenças de capacidade produtiva entre os cultivares dos distintos conjuntos gênicos (SINGH, 1991). Em geral, os melhoristas de feijão têm empregado, no processo de hibridação, materiais do mesmo conjunto genético, o que explica o limitado progresso no aumento do rendimento. Os resultados desses programas de melhoramento têm sido, em muitos casos, limitados (VIEIRA et al., 1999).

A maioria dos programas de melhoramento de feijoeiro utiliza a hibridação de dois ou mais materiais, visando reunir características favoráveis em um único genótipo. Na utilização desse método, um aspecto importante a ser considerado é a escolha dos genitores. Para solucionar problemas específicos da cultura, os genitores são selecionados com base em características como resistência a doenças, boa arquitetura e tipo de grãos (RAMALHO et al., 1988). No entanto, quando o objetivo é a obtenção de genótipos superiores para características de baixa herdabilidade, os genitores escolhidos devem possuir boa capacidade de combinação e cruzamento.

Outro aspecto a ser considerado após a realização da hibridação é o modo de condução da população segregante para se proceder à seleção de progênies. Entre os métodos mais utilizados no feijoeiro estão o método da população (*bulk*), o genealógico (*pedigree*) e o de retrocruzamento (ALLARD, 1971; RAMALHO e SANTOS, 1982; VIEIRA, 1967).

#### 3.2. Principais doenças do feijoeiro

A produção de feijão no Brasil é afetada por diversos aspectos, como as enfermidades se destacando como causa da redução da produtividade (VIEIRA, 1983). De maneira geral, os principais fitopatógenos causadores de doenças no feijoeiro são bactérias, fungos, nematóides e vírus.

VIEIRA (1983) citou mais de 45 enfermidades que podem prejudicar a cultura do feijoeiro em maior ou menor grau de importância, sendo as mais importantes que ocorrem no Brasil o mosaico-dourado, o crestamento-bacteriano-comum, a antracnose, a ferrugem e a mancha-angular. As de natureza fúngica são de grande importância durante o ciclo da cultura do feijão devido às graves perdas que provocam, reduzindo a produtividade.

A ferrugem do feijoeiro é causada pelo fungo *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger var. *appendiculatus*. Esse fungo é um parasita obrigatório que se caracteriza por apresentar alta variabilidade, o que dificulta muito o trabalho de melhoramento visando à resistência. À medida que os cultivares resistentes a determinados patógenos vão surgindo, por seleção natural ou artificial, aparecem novas formas biológicas capazes de vencer a resistência, originando as raças fisiológicas, ou patótipos. *Uromyces appendiculatus* é reconhecido como um dos patógenos de plantas mais variáveis patogenicamente (STAVELY, 1984c; MORA-NUÑES, 1992; FALEIRO, 1997).

Os estudos genéticos de resistência à ferrugem têm evidenciado que o caráter é controlado por gene dominante único (ou bloco gênico) e que em feijão existem muitos genes de efeito menor atuando na determinação da resistência (STAVELY, 1984a e b; GRAFTON et al., 1985; STAVELY e GRAFTON, 1985; WEBSTER e AINSWORTH, 1988; FALEIRO, 1997). Há evidências experimentais de que ocorre interação gene a gene entre o feijoeiro e o fungo causador da ferrugem (STAVELY e PASTOR-CORRALES, 1989; SINGH, 1991), à semelhança do que acontece no sistema hospedeiro-parasita formado pelo linho e pelo agente causador da ferrugem do linho (FLOR, 1955).

A herança monogênica dominante para a ferrugem tem sido relatada em vários trabalhos (AUGUSTIN et al., 1972; CARVALHO et al., 1978; MEINERS, 1981; STAVELY, 1984a e b; ZAUMEYER e HARTEK, 1941); no entanto, ZAITER et al. (1989) demonstraram que um gene recessivo determina a resistência à ferrugem. Além disso, o cultivar Olathe apresenta gene que tem comportamento complementar a outro presente na linhagem T-39, conferindo resistência ao patótipos 44 de *U. appendiculatus* (GRAFTON et al., 1985), enquanto dois genes independentes parecem estar envolvidos na resistência aos patótipos 44 e 52 no cruzamento entre os cultivares Olathe e Aurora (GRAFTON et al., 1985). Estudando a herança da resistência do cv. Ouro Negro a quatro patótipos de *U. appendiculatus*, FALEIRO (1997) mostrou que um gene "maior", possivelmente associado a genes "menores", seria responsável pela resistência à ferrugem.

A antracnose é causada por um fungo cujo nome científico, em estado assexual, é *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn), sendo este classificado como forma imperfeita na subdivisão Deuteromycotina. Em estado sexual, é conhecido como *Glomerella cingulata* (Stonem Spauld e V. Schrenk) (PASTOR-CORRALES, 1985; PASTOR-CORRALES e TU, 1989; PASTOR-CORRALES, 1992).

A alta umidade relativa do ar e temperaturas entre 13 e 26°C favorecem o surgimento dessa enfermidade. Entre os fatores que contribuem para disseminação do patógeno, encontram-se as chuvas moderadas freqüentes acompanhadas de ventos e, na disseminação a curta distância, o salpico de chuva sobre os resíduos de colheita (PASTOR-CORRALES, 1985). A disseminação a longas distâncias realiza-se,

principalmente, por meio de sementes (SINGH, 1991; PASTOR-CORRALES, 1985), de insetos e do próprio homem (PASTOR-CORRALES, 1985).

Quando a fonte de infecção é a semente, os primeiros sintomas aparecem como lesões necróticas nas folhas cotiledonares ou nos cotilédones. A infecção pode também ocorrer na haste da folha, onde, em casos severos, a folha se dobra no sítio da lesão. As lesões foliares ocorrem, inicialmente, na parte inferior das folhas e nas extensões das nervuras principais, na forma de manchas angulares pequenas de cor vermelho-alaranjada a purpúrea, tornando-se, posteriormente, de cor escura. Nas vagens, as lesões apresentam-se como cancos deprimidos, de formas arredondadas, com margens ligeiramente proeminentes, delimitadas por um anel preto com borda laranja-avermelhada (PASTOR-CORRALES e TU, 1989).

As perdas causadas por *C. lindemuthianum* podem ser de até 100% quando são empregadas sementes contaminadas em regiões onde prevaleçam condições ideais para o desenvolvimento da doença (PELOSO, 1992).

A mancha-angular é causada pelo fungo *P. griseola*, sendo moléstia de ocorrência comum no Brasil. Temperaturas entre 16 e 28°C, com ótimo em 24°C, e alta umidade são condições favoráveis à infecção: uma vez formados os esporos, a baixa umidade favorece-lhes a disseminação (CARDONA-ALVAREZ e WALKER, 1956). Quase todos os cultivares plantados no país são, em maior ou menor grau, suscetíveis à mancha-angular. Entretanto, fontes de resistência têm sido encontradas (VIEIRA et al., 1999). Em muitos cruzamentos, os pesquisadores notaram que a resistência é recessiva e controlada por dois ou três genes independentes (BARROS et al., 1957). Em outros casos, verificou-se que a resistência é monogênica e dominante (CARDONA-ALVAREZ, 1958). NIETSCHE et al. (1997) avaliaram diversas fontes potenciais de resistência no Estado de Minas Gerais, sendo México 54, AND 277, MAR 2 e Cornell 49-242 identificados como as mais promissoras fontes de resistência aos principais patótipos do Estado de Minas Gerais.

### 3.3. Uso de marcadores moleculares no melhoramento do feijoeiro

Atualmente, com o grande avanço na utilização de técnicas envolvendo marcadores moleculares, as informações a respeito da diversidade genética do germoplasma das grandes culturas vêm ganhando importantes aplicações nos programas de melhoramento, uma vez que a determinação apurada acerca do grau de parentesco de linhas ou de populações pode auxiliar os melhoristas na obtenção de combinações genéticas mais favoráveis. Desse modo, os marcadores moleculares são utilizados no estabelecimento de filogenia, localização de genes, determinação de similaridade genética, mapeamento genômico e estudos evolucionários, dentre outros (FU et al., 1993).

Muitos trabalhos visando compreender a relação planta-patógeno são relatados na literatura. Exemplo de estudos de co-evolução entre patógeno e hospedeiro tem sido mostrado em trabalhos com mancha-angular (GUZMAN et al., 1995), antracnose (BALARDIN e KELLY, 1997; ALZATE-MARIN et al., 1999d) e ferrugem do feijoeiro (MACLEAN et al., 1995).

Outra importante aplicação dos marcadores moleculares é a possibilidade da sua utilização na seleção indireta de genes de resistência a doenças sem a necessidade de inoculações com vários patógenos. A identificação de marcadores moleculares fortemente ligados aos genes de resistência tem facilitado o processo de piramidização desses genes (MIKLAS et al., 1993; KELLY et al., 1994). Ao mesmo tempo, o uso do conceito de genótipos gráficos (YOUNG e TANKSLEY, 1989) de marcadores moleculares tem boa aplicabilidade em programas de melhoramento que utilizam o método de retrocruzamentos, permitindo a seleção de indivíduos que, além de possuírem o gene em introgressão, apresentam maior proporção do genoma recorrente, reduzindo, assim, o número de gerações de retrocruzamento necessárias para o desenvolvimento de cultivares melhorados (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995). De maneira análoga, a seleção auxiliada por marcadores pode ser utilizada durante o procedimento de autofecundação de linhagens e identificação de híbridos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

Nesse aspecto, alguns marcadores RAPD ligados a genes que conferem resistência à antracnose (*Co-1*, *Co-2*, *Co-4*, *Co-5*, *Co-6*) foram identificados, e marcadores SCAR para dois desses genes (*Co-2* e *Co-4*) foram desenvolvidos (ADAM-BLONDON et al., 1994; YOUNG e KELLY, 1996; YOUNG e KELLY, 1997). No entanto, marcadores ligados a genes de resistência à ferrugem foram identificados por vários grupos de pesquisadores (HALEY et al., 1994; HALEY et al., 1993; JOHNSON et al., 1997; JUNG et al., 1996). KELLY e MIKLAS (1998b) catalogaram 23 marcadores RAPD ligados à resistência a essa doença.

No Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV foi iniciado o desenvolvimento de linhas quase isogênicas (NILs, *near isogenic lines*), do tipo carioca, contendo os genes de resistência à ferrugem provenientes do cultivar Ouro Negro (FALEIRO et al., 1997); e os genes de resistência à antracnose *Co-6* e *Co-4*, dos cultivares AB 136 e TO, respectivamente (ALZATE-MARIN et al., 1999c), bem como os genes de resistência à mancha-angular da linhagem AND 277 (CARVALHO et al., 1998). Vários marcadores RAPD foram identificados para os genes citados anteriormente, com base na amplificação do DNA (NILs, *near isogenic lines*) e de grupos de indivíduos segregantes (BSA, *bulked segregant analysis*). RAGAGNIN et al. (1998) identificaram o marcador OPX11<sub>630a</sub> ligado ao gene de resistência à ferrugem a uma distância de 5,8 cM do gene na população resultante do cruzamento Ouro Negro x

US Pinto 111. ARRUDA (1998), trabalhando com populações F<sub>2</sub> do cruzamento Rudá x TO, verificou que o marcador OPY20<sub>830a</sub> se encontrava ligado a 0,0 cM do gene *Co-4*. MENARIM et al. (1998), em trabalho de identificação de marcador molecular RAPD ligado ao gene de resistência para antracnose do feijoeiro em população F<sub>2</sub> do cruzamento envolvendo os cultivares AB 136 e Rudá, relataram que o marcador OPAZ20<sub>940a</sub> está ligado ao gene *Co-6* a uma distância de 7,4 cM. CARVALHO et al. (1998) citaram que o marcador OH-13<sub>490</sub> está ligado em acoplamento ao gene de resistência à mancha-angular presente na linhagem AND 277, a uma distância de 5,5 cM.

O grupo do BIOAGRO/UFV tem identificado os primeiros marcadores ligados a genes de resistência à mancha-angular dos cultivares AND 277, México 54, MAR 2 e Cornell 49-242 (CARVALHO et al., 1997; SARTORATO et al., 1999; FERREIRA et al., 1999; NIETSCHKE, 2000).

## CAPÍTULO 1

### SELEÇÃO DE ISOLINHAS DE FEIJOEIRO HOMOZIGOTAS PARA GENES DE RESISTÊNCIA A FERRUGEM, ANTRACNOSE E MANCHA-ANGULAR

#### 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), sendo Minas Gerais o segundo estado maior produtor. A importância social do feijão como importante fonte alimentar e o seu consumo generalizado pela população brasileira justificam o esforço de pesquisas na busca de obter melhores níveis de produtividade e a garantia do abastecimento interno do produto (VIEIRA et al., 1998).

As doenças que acometem a cultura do feijoeiro são uma das principais causas da baixa produtividade no Brasil e no Estado de Minas Gerais. Dentre as doenças mais importantes, a ferrugem, causada por *Uromyces appendiculatus*, a antracnose, por *Colletotrichum lindemuthianum*, e a mancha-angular, por *Phaeoisariopsis griseola*, podem levar a sérios prejuízos, principalmente durante os meses de abril a julho, quando são observadas, nas principais regiões produtoras, temperaturas amenas e ocorrência de orvalho (PAULA JÚNIOR e ZAMBOLIM, 1998).

É fundamental que o controle dessas doenças seja feito de forma integrada, adotando-se conjuntamente diferentes medidas e tendo em vista as características desses patógenos. Dentre os métodos de controle, a utilização de cultivares resistentes merece destaque especial, por ser um método eficiente, seguro, barato e acessível a produtores de qualquer nível econômico.

Dentre os métodos de melhoramento utilizados para obtenção de cultivares resistentes, o método dos retrocruzamentos tem sido largamente empregado para transferir genes de cultivares resistentes a cultivares com ótimas características agrônomicas, comercial, culinária e nutricional. Por meio desse método, na maioria dos casos, os genes de resistência são transferidos

individualmente. No entanto, existem situações em que se pode ter o interesse em transferir dois ou mais genes de resistência para um mesmo genitor recorrente. Nesse caso, três estratégias têm sido utilizadas: a seqüencial, a paralela e a simultânea. Na estratégia seqüencial, transfere-se um gene ou uma característica de cada vez. Na estratégia da transferência paralela, é feita a condução de tantos subprogramas quanto o número envolvido de características a serem transferidas. No programa simultâneo, todos os genes favoráveis para cada característica são transferidas de uma só vez (BORÉM, 1997).

O Programa de Melhoramento do Feijoeiro realizado no BIOAGRO/UFV tem utilizado a estratégia de transferência paralela, ou seja, estão sendo conduzidos diferentes subprogramas para a introdução de genes de resistência à ferrugem, à antracnose e à mancha-angular de diferentes fontes de resistência no cultivar recorrente Rudá. No presente trabalho, que está inserido no referido programa de melhoramento, foram realizados testes de progênie em cada um dos subprogramas, visando à seleção de isolinhas homozigotas para a resistência a ferrugem, antracnose e mancha-angular, que possam ser intercruzadas na etapa de piramidização desse programa.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Materiais genéticos e cruzamentos

Para realização do presente trabalho, foram utilizadas progênies resultantes de quatro populações obtidas por retrocruzamentos conduzidos pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, visando à piramidização da resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular, no cultivar Rudá.

As progênies desenvolvidas para resistência à ferrugem foram resultantes de três retrocruzamentos (RC<sub>3</sub>), enquanto as progênies desenvolvidas para resistência à antracnose e à mancha-angular foram resultantes de quatro retrocruzamentos (RC<sub>4</sub>)

Na Figura 1 estão esquematizados os retrocruzamentos visando à obtenção das linhas avançadas de feijoeiro resistentes aos principais patótipos de ferrugem, antracnose e mancha-angular. As isolinhas homozigotas para essas doenças foram utilizadas para caracterizações fenotípica e molecular.

O genitor recorrente utilizado em todos os retrocruzamentos foi o cultivar Rudá (CIAT,1986), desenvolvido a partir do cruzamento entre os cultivares Carioca e Rio Tibagi, sendo introduzido no Brasil como linhagem A285 pela EMBRAPA Arroz e Feijão (Goiânia, GO). Esse cultivar possui características agrônômicas desejáveis, como tipo de grão, aspectos culinários e nutricionais e alta produtividade. Entretanto, é suscetível a diversas doenças.

O material genético utilizado como fonte de resistência à ferrugem foi o cultivar Ouro Negro, que apresenta tegumento preto, alta produtividade e boas qualidades culinárias. Esse cultivar, introduzido no Brasil como Honduras 35 e relançado como cultivar em 1991 (ARAÚJO et al., 1991), apresenta resistência à maioria dos patótipos de *U. appendiculatus* e também a diferentes patótipos de *C. lindemuthianum* (FALEIRO et al., 1996; FALEIRO et al., 2000a; LANZA et

al., 1997). Tais características justificam seu freqüente uso em programas de melhoramento.

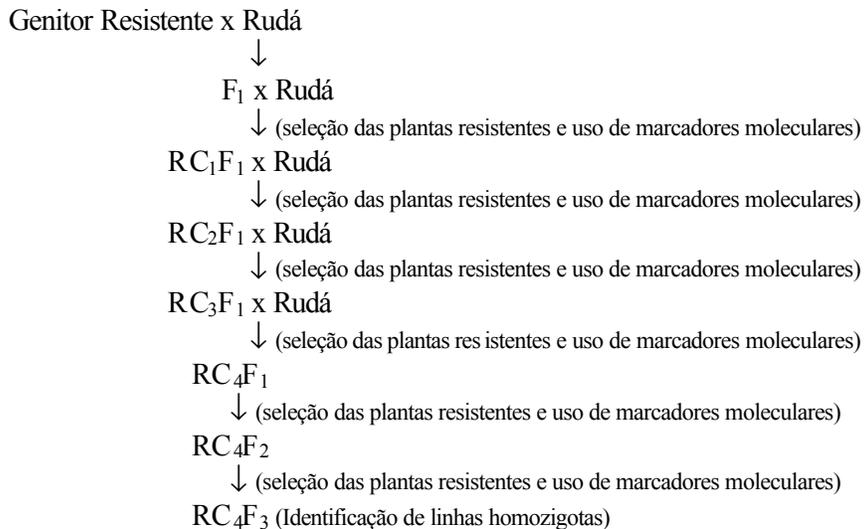


Figura 1 - Esquema dos cruzamentos dos subprogramas visando à obtenção das linhas avançadas homozigotas para a resistência a doenças.

Os materiais genéticos utilizados como fonte de resistência à antracnose foram os cultivares diferenciadores TO e AB 136 (PASTOR-CORRALES, 1992), os quais carregam os genes *Co-4* e *Co-6*, respectivamente (YOUNG e KELLY, 1996). O cultivar TO teve origem no cruzamento de “Tanderette” (suscetível) com a linhagem mexicana “Acapulco” (resistente); possui o gene dominante *Co-4*, diferente e independente dos outros genes de resistência à antracnose (FOUILLoux, 1976). Esses cultivares foram utilizados como genitores por apresentarem resistência à maioria dos patótipos de *C. lindemuthianum* no Brasil.

O material genético utilizado como fonte de resistência à mancha-angular foi o cultivar AND 277. No estudo realizado por NIETSCHE (1997), esse cultivar mostrou-se resistente a 9 dos 13 patótipos de *P. griseola* testados, apresentando resistente aos patótipos mais freqüentemente encontrados no Estado de Minas Gerais.

## 2.2. Patótipos utilizados e preparo do inóculo

Foi utilizado para avaliação da resistência a *U. appendiculatus* uma mistura de uredósporos, incluindo-se os patótipos identificados por FALEIRO et al. (1999a) mantidos na micoteca do BIOAGRO/UFV. As culturas monospóricas armazenadas a 5°C e 50% de umidade relativa foram multiplicadas no hospedeiro suscetível US Pinto 111, 20 dias antes da inoculação, visando recuperar a viabilidade dos uredósporos. O inóculo foi preparado utilizando uma concentração de aproximadamente  $2,0 \times 10^4$  uredósporos/mL (DAVISON e VAUGHAN, 1964), suspensos em água destilada contendo 0,05% de Tween 20, para melhor dispersão dos uredósporos.

Para avaliação da resistência à antracnose foram utilizados os patótipos 65 e 89 de *C. lindemuthianum*, os quais possuem significativa importância no Estado de Minas Gerais. O patótipo 65 de *C. lindemuthianum* foi utilizado para inocular as isolinhas originadas do cruzamento entre Rudá x TO, enquanto o patótipo 89 o foi para avaliação das isolinhas originadas dos cruzamentos entre Rudá x Ouro Negro e Rudá x AB 136. As culturas monospóricas originais foram obtidas na micoteca da EMBRAPA Arroz e Feijão (Goiânia, GO) e mantidas na micoteca do BIOAGRO/UFV. Para confirmar o fenótipo de virulência do isolado, este foi inoculado nos 12 cultivares diferenciadores citados por PASTOR-CORRALES (1992). O inóculo foi preparado segundo a metodologia de PIO-RIBEIRO e CHAVES (1975). A esporulação do patógeno para obtenção do inóculo foi conseguida, transferindo-se o micélio, em condições assépticas, do meio BDA (batata -dextrose-ágar) para tubos de ensaios contendo vagens esterilizadas e parcialmente imersas em meio ágar-água. Em seguida, esses tubos foram incubados por 10 dias à temperatura de 23°C. A concentração final do inóculo utilizada foi de  $1,2 \times 10^6$  esporos/mL, determinada com hemacitômetro.

Para inoculação do fungo causador da mancha-angular foi utilizado o patótipo 63.23, identificado por NIETSCHKE (1997), cuja escolha se justifica por estar presente em três das cinco regiões de coleta no Estado de Minas Gerais. O inóculo consistiu de uma suspensão de conídios preparada, raspando-se superficialmente colônias do fungo de 12 dias de idade, crescendo a 24°C, sobre placas contendo meio V8 (“Campbell Soup Company”, USA). Essa suspensão foi filtrada em gaze e, posteriormente, ajustada para a concentração final de  $2 \times 10^4$  conídios/mL.

### **2.3. Inoculação e avaliação da doença**

A inoculação de *U. appendiculatus* foi realizada quando as folhas primárias apresentavam aproximadamente 2/3 do seu desenvolvimento completo, aproximadamente 10 dias após a semeadura. A suspensão contendo o inóculo foi aplicada em ambas as superfícies foliares, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº15, acionado por um compressor elétrico (CARRIJO, 1975; PEREIRA, 1976), evitando-se atingir o ponto de escoamento. Após a inoculação, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa >95%), onde permaneceram por 48 horas, sob fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, foram transferidas para casa de vegetação ( $20 \pm 5^\circ\text{C}$ ), aí permanecendo até a sua avaliação.

O grau de infecção foi determinado pela observação das pústulas na face superior das folhas primárias. A avaliação foi realizada visualmente, com o auxílio de um diagrama de representação gráfica idealizado por CASTAÑO (1985). Plantas com graus 1 a 3 foram designadas resistentes e aquelas com graus 4 a 6, suscetíveis.

As inoculações com *C. lindemuthianum* foram realizadas 15 dias após a semeadura. A atomização e a transferência para câmara de nevoeiro foram semelhantes à inoculação com ferrugem. As plantas foram incubadas por sete dias em câmara úmida, mantida entre 20 e 22°C e com 100% de umidade relativa. Após esse período, cada planta foi avaliada visualmente com relação a sintomas da doença, por meio de uma escala de infecção de nove graus, atribuindo-se grau 1 para plantas sem sintomas visíveis e grau 9 para as severamente doentes ou com danos letais - morte da planta (RAVA et al., 1993). Plantas com graus 1 a 3 foram designadas resistentes, enquanto aquelas com graus 4 a 9 foram consideradas suscetíveis (RAVA et al., 1993).

A inoculação com *P. griseola* foi realizada após o aparecimento da primeira folha trifoliolada. A atomização e transferência para câmara de nevoeiro foi semelhante à inoculação com ferrugem. As plantas foram incubadas por 48 horas em câmara úmida mantida a 20 ± 1°C e UR > 95% e, depois, levadas para casa de vegetação, cuja temperatura média durante o experimento foi de 28°C. A severidade da doença foi avaliada visualmente aos 18, 25 e 30 dias após a inoculação, utilizando-se uma escala com nove graus de severidade proposta por PASTOR-CORRALES e JARA (1995). As plantas que apresentaram graus de severidade 1 a 3 foram consideradas resistentes (em que a nota 1 foi dada às plantas com folhas apresentando ausência total de lesões e a nota 3 àquelas com folhas apresentando poucas lesões, sem haver esporulação do patógeno). Plantas apresentando graus de severidade 4 a 9 foram consideradas suscetíveis (em que a nota 4 foi dada às plantas com folhas contendo poucas lesões, porém havendo a esporulação do patógeno).

## 2.4. Análise de segregação dos genes de resistência

O teste de significância do  $\chi^2$  foi utilizado para comparar a razão teórica esperada para segregação monogênica dominante dos genes de resistência, com as razões fenotípicas obtidas entre isolinhas F<sub>2:3</sub> homozigotas resistentes (RR) e isolinhas heterozigotas (Rr). Neste caso, a segregação esperada era de 1:2 (RR:Rr), uma vez que as isolinhas suscetíveis foram descartadas.

O teste de progênie das plantas RC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> (população 1) foi feito com base na informação de 12 plantas, enquanto nas plantas RC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> (populações 2, 3 e 4) o teste foi realizado com base na informação de 15 plantas. O teste de progênie de genes que segregam independentemente com base em 12 ou 15 plantas F<sub>3</sub> permite afirmar com certeza de 96,8% e 98,6%, respectivamente, qual o genótipo das plantas F<sub>2</sub>.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Isolinhas RC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> – Cruzamento entre Rudá e Ouro Negro

Foram analisadas 47 isolinhas RC<sub>3</sub>F<sub>2:3</sub> com relação à resistência à ferrugem (*U. appendiculatus*) e à antracnose (patótipo 89 de *C. lindemuthianum*). Dezesete das 47 isolinhas exibiram genótipo R<sub>f</sub>R<sub>f</sub> (homozigotas para resistência à ferrugem), e 30 isolinhas apresentaram genótipo R<sub>f</sub>r<sub>f</sub> (heterozigotas para resistência à ferrugem). Quanto à resistência à antracnose, 19 das 47 isolinhas apresentaram genótipo R<sub>a</sub>R<sub>a</sub> (homozigotas resistentes à antracnose), e 28 isolinhas exibiram genótipo R<sub>a</sub>r<sub>a</sub> (heterozigotas para resistência à antracnose) (Quadro 1).

Uma análise simultânea da resistência às duas doenças indicou que, entre 47 isolinhas RC<sub>3</sub>F<sub>2:3</sub>, foram identificadas 13 com o genótipo R<sub>f</sub>R<sub>f</sub>R<sub>a</sub>R<sub>a</sub> (homozigotas para resistência à ferrugem e à antracnose), oito isolinhas com o genótipo R<sub>f</sub>r<sub>f</sub>R<sub>a</sub>R<sub>a</sub> (heterozigotas para a resistência à ferrugem e homozigotas para resistência à antracnose), quatro isolinhas com o genótipo R<sub>f</sub>R<sub>f</sub>R<sub>a</sub>r<sub>a</sub> (homozigotas para a resistência à ferrugem e heterozigotas para a resistência à antracnose) e 22 com o genótipo R<sub>f</sub>r<sub>f</sub>R<sub>a</sub>r<sub>a</sub> (heterozigotas para a resistência à ferrugem e à antracnose).

FALEIRO et al. (2000a) demonstraram, segundo a teoria gene a gene, que existem em Ouro Negro blocos de genes de resistência à ferrugem e à antracnose localizados no mesmo grupo de ligação. A ocorrência de tal ligação

Quadro 1 - Segregação para resistência à ferrugem e à antracnose das isolinhas RC<sub>3</sub>F<sub>2:3</sub> obtidas a partir do cruzamento entre Rudá x Ouro Negro (ON)

N <sup>o</sup> de Campo	Avaliação Ferrugem		Avaliação Antracnose		Genótipo na F <sub>3</sub>
	Plantas R	Plantas S	Plantas R	Plantas S	
02-99	3	9	8	2	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
03-99	12	0	9	0	R <sub>f</sub> R <sub>f</sub> R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
04-99	10	2	6	6	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
05-99	10	2	8	4	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
06-99	12	0	9	0	R <sub>f</sub> R <sub>f</sub> R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
07-99	10	1	9	2	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
08-99	12	0	6	6	R <sub>f</sub> R <sub>f</sub> R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
09-99	9	3	8	4	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
11-99	9	3	6	6	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
12-99	10	2	7	4	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
13-99	12	0	10	0	R <sub>f</sub> R <sub>f</sub> R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
14-99	12	0	10	0	R <sub>f</sub> R <sub>f</sub> R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
15-99	10	2	7	5	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
17-99	8	4	8	4	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
18-99	12	0	3	7	R <sub>f</sub> R <sub>f</sub> R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
19-99	10	2	11	1	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
20-99	11	1	10	2	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
21-99	10	2	11	0	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
22-99	11	1	8	2	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
23-99	8	4	5	4	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
24-99	12	0	10	0	R <sub>f</sub> R <sub>f</sub> R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
25-99	12	0	11	0	R <sub>f</sub> R <sub>f</sub> R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
26-99	11	1	10	0	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
27-99	10	2	10	2	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
28-99	12	0	9	3	R <sub>f</sub> R <sub>f</sub> R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
29-99	11	1	9	2	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
30-99	10	2	8	4	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
31-99	8	4	11	0	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
32-99	9	3	10	2	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
33-99	9	3	12	0	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
34-99	7	5	10	0	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
35-99	12	0	11	0	R <sub>f</sub> R <sub>f</sub> R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
36-99	8	4	8	4	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
37-99	11	1	10	0	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
38-99	12	0	8	4	R <sub>f</sub> R <sub>f</sub> R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
39-99	10	2	11	1	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
40-99	12	0	12	0	R <sub>f</sub> R <sub>f</sub> R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
41-99	8	4	7	4	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
42-99	12	0	11	0	R <sub>f</sub> R <sub>f</sub> R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
43-99	12	0	10	0	R <sub>f</sub> R <sub>f</sub> R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
44-99	12	0	10	0	R <sub>f</sub> R <sub>f</sub> R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
45-99	12	0	12	0	R <sub>f</sub> R <sub>f</sub> R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
46-99	10	2	11	0	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
47-99	10	2	9	3	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
48-99	12	0	12	0	R <sub>f</sub> R <sub>f</sub> R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
49-99	8	4	8	4	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
50-99	9	3	10	2	R <sub>f</sub> r <sub>f</sub> R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
Rudá	0	12	0	12	r <sub>f</sub> r <sub>f</sub> r <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
ON	12	0	12	0	R <sub>f</sub> R <sub>f</sub> R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>

gênica facilitou a introdução simultânea do bloco gênico de resistência à ferrugem e do gene de resistência à antracnose no cultivar recorrente Rudá. Segundo HULBERT (1997), a resistência à maioria das doenças fúngicas é determinada por membros de famílias de genes dominantes, ou seja, cada membro conferindo resistência a um patótipo específico. Os genes de resistência apresentam-se, freqüentemente, agrupados no genoma. Esses grupos contêm genes que conferem resistência a vários patótipos do mesmo patógeno, sendo o que, provavelmente, acontece com relação à resistência à ferrugem. Além disso, SHEN et al. (1998) relataram que os genes agrupados podem determinar resistência a patógenos não-relacionados taxonomicamente, sendo o que acontece na resistência à ferrugem e à antracnose.

A existência de ligação gênica entre os genes que conferem resistência à ferrugem e à antracnose é um dado útil para orientar novas estratégias de melhoramento e estudos genéticos.

### **3.2. Isolinhas RC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> – Cruzamento entre Rudá e TO**

Na população derivada do cruzamento entre Rudá x TO, avaliada para resistência à antracnose, foi obtida a relação 15:25 (R<sub>a</sub>R<sub>a</sub>: R<sub>a</sub>r<sub>a</sub>) na geração RC<sub>4</sub>F<sub>2:3</sub> (Quadro 2). Após eliminar as plantas RC<sub>4</sub>F<sub>2:3</sub> suscetíveis, essa relação se ajustou à herança monogênica dominante (Quadro 5), cujos dados estão de acordo com os que já haviam sido obtidos por ALZATE-MARIN et al. (1999b) e ARRUDA (1998).

Quadro 2 - Segregação para resistência à antracnose das isolinhas RC<sub>4</sub>F<sub>2:3</sub> obtidas a partir do cruzamento entre Rudá x TO

Nº de Campo	Avaliação Antracnose		Genótipo na F <sub>3</sub>
	Plantas R	Plantas S	
41-5-1-1	15	0	R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
41-5-1-10	11	4	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
41-5-1-18	7	8	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
41-5-1-19	10	5	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
41-5-1-25	13	2	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
41-5-1-30	10	5	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
41-5-2-5	15	0	R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
41-5-2-23	13	2	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
41-5-2-24	13	2	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
41-5-6-4	15	0	R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
41-5-2-18	14	1	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
41-5-2-3	15	0	R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
41-5-6-1	15	0	R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
41-5-6-7	10	5	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
41-5-6-12	15	0	R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
41-5-6-14	10	5	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
41-5-6-17	11	4	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
41-5-6-24	15	0	R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
41-5-6-25	11	4	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
41-5-6-30	15	0	R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
368-1-3-1	15	0	R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
368-1-3-6	11	4	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
368-1-3-10	15	0	R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
368-1-3-14	12	3	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
368-1-3-28	5	10	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
Rudá	0	10	r <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
TO	10	0	R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>

### 3.3. Isolinas RC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> – Cruzamento entre Rudá e AB 136

Na população derivada do cruzamento entre Rudá x AB 136, avaliada quanto à resistência à antracnose, foi obtida a relação 6:21 (R<sub>a</sub>R<sub>a</sub>: R<sub>a</sub>r<sub>a</sub>) na geração RC<sub>4</sub>F<sub>2:3</sub> (Quadro 3). Após a eliminação das plantas RC<sub>4</sub>F<sub>2:3</sub> suscetíveis, essa relação se ajustou à herança monogênica dominante (Quadro 5). Resultados semelhantes foram observados em trabalho realizado por ALZATE-MARIN et al. (1999b).

Quadro 3 - Segregação para resistência à antracnose das isolinas RC<sub>4</sub>F<sub>2:3</sub> obtidas a partir do cruzamento entre Rudá x AB 136

Nº de Campo	Avaliação Antracnose		Genótipo na F <sub>3</sub>
	Plantas R	Plantas S	
74-1-3	15	0	R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
74-1-5	10	5	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
74-1-8	4	11	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
74-1-9	15	0	R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
74-1-10	15	0	R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
74-1-13	15	0	R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
74-1-15	4	11	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
74-1-16	15	0	R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
74-1-18	15	0	R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>
74-1-24	12	3	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
68-2-3	10	5	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
68-2-4	10	5	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
68-2-5	14	1	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
68-2-9	10	5	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
68-2-14	11	4	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
68-2-15	14	1	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
68-2-16	13	2	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
68-2-18	14	1	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
68-2-19	12	3	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
76-1-6	14	1	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
76-1-7	14	1	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
68-2-22	4	11	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
76-1-9	9	6	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
76-1-16	13	2	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
76-1-17	11	4	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
76-1-19	3	11	R <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
Rudá	0	10	r <sub>a</sub> r <sub>a</sub>
AB136	10	0	R <sub>a</sub> R <sub>a</sub>

A herança monogênica dominante para resistência à antracnose tem sido relatada por outros autores (MASTENBROEK, 1960; PASTOR-CORRALES e ERAZO, 1994; ALZATE-MARIN, 1996; ARRUDA, 1998). Segundo RAVA et al. (1993), os cultivares TO e AB 136 carregam, respectivamente, os genes *Co-4* e *Co-6*, os quais conferem resistência a 23 (*Co-4*) e 25 (*Co-6*) patótipos de *C. lindemuthianum* presentes no Brasil. ALZATE-MARIN et al. (1999b) relataram que um único gene presente no cultivar AB 136 confere resistência aos patótipos 64, 73, 81 e 89 de *C. lindemuthianum*.

### **3.4. Isolinas RC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> – Cruzamento entre Rudá e AND 277**

No teste de progênie das isolinhas quanto à resistência à mancha-angular, verificou-se que, entre 19 isolinhas, cinco apresentaram genótipo R<sub>m</sub>R<sub>m</sub> (homozigotas para a resistência à mancha-angular) e 14, genótipo R<sub>m</sub>r<sub>m</sub> (heterozigotas para a resistência à mancha-angular) (Quadro 4).

Os genes de resistência foram herdados a partir da linhagem AND 277 de forma dominante. Verificou-se a proporção de uma linhagem resistente a duas suscetíveis (Quadro 5). Essa proporção é típica de resistência conferida por um gene dominante, uma vez que as isolinhas suscetíveis foram descartadas, resultado que está de acordo com os obtidos por CARVALHO et al. (1998).

A herança monogênica dominante para resistência à mancha-angular tem sido relatada em outros trabalhos (CARDONA-ALVAREZ, 1958; CARVALHO et al., 1998; SARTORATO et al., 1999). Segundo relato de CARVALHO et al. (1998), a linhagem AND 277 apresenta resistência monogênica dominante.

Quadro 4 - Segregação para resistência à mancha-angular das isolinhas RC<sub>4</sub>F<sub>2:3</sub> obtidas a partir do cruzamento entre Rudá x TO

Nº de Campo	Avaliação Mancha-Angular		Genótipo na F <sub>3</sub>
	Plantas R	Plantas S	
7-2-9-4-1	13	2	R <sub>m</sub> r <sub>m</sub>
7-2-9-4-2	12	3	R <sub>m</sub> r <sub>m</sub>
7-2-9-4-3	8	7	R <sub>m</sub> r <sub>m</sub>
7-2-9-4-4	15	0	R <sub>m</sub> R <sub>m</sub>
7-2-9-4-5	6	3	R <sub>m</sub> r <sub>m</sub>
7-2-9-4-6	15	0	R <sub>m</sub> R <sub>m</sub>
7-2-9-4-7	8	4	R <sub>m</sub> r <sub>m</sub>
7-2-9-4-9	13	2	R <sub>m</sub> r <sub>m</sub>
7-2-9-4-10	15	0	R <sub>m</sub> R <sub>m</sub>
7-2-9-4-12	15	0	R <sub>m</sub> R <sub>m</sub>
7-2-9-4-13	12	3	R <sub>m</sub> r <sub>m</sub>
7-2-9-7-2	10	5	R <sub>m</sub> r <sub>m</sub>
7-2-9-7-4	14	1	R <sub>m</sub> r <sub>m</sub>
7-2-9-7-10	15	0	R <sub>m</sub> R <sub>m</sub>
7-2-13-2	11	4	R <sub>m</sub> r <sub>m</sub>
7-2-13-4	10	5	R <sub>m</sub> r <sub>m</sub>
7-2-13-6	13	2	R <sub>m</sub> r <sub>m</sub>
57-12-7-2	9	6	R <sub>m</sub> r <sub>m</sub>
57-12-7-3	11	3	R <sub>m</sub> r <sub>m</sub>
Rudá	0	15	r <sub>m</sub> r <sub>m</sub>
AND 277	15	0	R <sub>m</sub> R <sub>m</sub>

### 3.2. Análise de segregação dos genes de resistência

Os valores de  $\chi^2$  obtidos indicam que a resistência aos patógenos nos respectivos subprogramas é determinada por um único gene dominante ou por um bloco gênico que se comporta como característica monogênica dominante (Quadro 6). Esses resultados estão de acordo com análises realizadas por pesquisadores do Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, indicando que a resistência é controlada, principalmente, por genes de efeito maior (FALEIRO, 2000a; ARRUDA, 1998; NIETSCHKE, 1997; ALZATE-MARIN et al., 1999c).

Em programas de melhoramento que utilizam o método dos retrocruzamentos, é importante que a característica seja controlada por um ou poucos genes, facilitando a transferência para o cultivar recorrente. Um dos fatores do sucesso desse programa deve-se ao tipo de herança que controla a resistência às doenças.

Quadro 5 - Análise da segregação da resistência a ferrugem, antracnose e mancha-angular das isolinhas selecionadas em cada população de retrocruzamento

Retrocruzamentos	Doença	Nº de Isolinhas		Relação Esperada	$\chi^2$	Probabilidade (%)
		RR	Rr			
Rudá x Ouro Negro	Ferrugem	17	30	1:2	0,17	68,0

Rudá x Ouro Negro	Antracnose	19	28	1:2	1,06	30,2
Rudá x TO	Antracnose	10	15	1:2	0,5	47,9
Rudá x AB 136	Antracnose	6	21	1:2	1,5	22,1
Rudá x AND 277	Mancha-Angular	5	14	1:2	0,42	51,6

---

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Dentre as principais doenças do feijoeiro, merecem destaque a ferrugem, a antracnose e a mancha-angular, as quais provocam severas perdas na cultura. O uso de cultivares resistentes é importante estratégia de controle de todas as doenças. O Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV tem utilizado o método dos retrocruzamentos para a introdução de genes de resistência à ferrugem, à antracnose e à mancha-angular no cultivar recorrente Rudá, sendo conduzidos subprogramas de retrocruzamentos paralelos para cada gene de resistência. O presente trabalho, inserido no referido programa, teve como objetivo principal a realização dos testes de progênie em cada um dos cruzamentos visando à seleção de isolinhas homozigotas para a resistência a ferrugem, antracnose e mancha-angular.

Na condução de cada cruzamento, foram realizadas inoculações com diferentes patótipos de cada patógeno e posteriores avaliação e seleção das plantas resistentes. O teste de progênie em cada população foi feito com base na informação de 12 ou 15 plantas  $RC_nF_3$ . Como resultados, foram selecionadas 13 isolinhas homozigotas para resistência a uma mistura de patótipos de *U. appendiculatus* e ao patótipo 89 de *C. lindemuthianum* a partir do cruzamento entre Rudá x Ouro Negro, 10 isolinhas homozigotas resistentes ao patótipo 65 de *C. lindemuthianum* a partir do cruzamento entre Rudá x TO, seis isolinhas homozigotas para a resistência ao patótipo 89 de *C. lindemuthianum* a partir do cruzamento entre Rudá x AB 136 e cinco isolinhas homozigotas para a resistência à mancha-angular a partir do cruzamento entre Rudá x AND 277.

Com base no teste de  $\chi^2$ , verificou-se segregação de 1:2 (RR:Rr) em todos os cruzamentos, indicando que a resistência aos patógenos é determinada por um único gene dominante ou por um bloco gênico que se comporta como característica monogênica dominante, no caso da resistência à ferrugem herdada do cultivar Ouro Negro (FALEIRO, 1997). A obtenção das isolinhas homozigotas para a resistência a cada uma das doenças será de grande importância para o processo de piramidização dos genes de resistência no cultivar recorrente Rudá.

## CAPÍTULO 2

### SELEÇÃO DE ISOLINHAS DE FEIJOEIRO RESISTENTES A FERRUGEM, ANTRACNOSE E MANCHA-ANGULAR GENETICAMENTE MAIS PRÓXIMAS DO GENITOR RECORRENTE

#### 1. INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é suscetível a um grande número de patógenos que podem afetar qualitativa e quantitativamente o crescimento das plantas e a produtividade da cultura (VIEIRA, 1983; STAVELY e PASTOR-CORRALES, 1994). Dentre estes, *Uromyces appendiculatus*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Phaeoisariopsis griseola*, fungos causadores da ferrugem, antracnose e mancha-angular, respectivamente, merecem destaque.

O controle da doença por produtos químicos é pouco utilizado em culturas não-irrigadas, uma vez que essa técnica demanda conhecimento tecnológico adequado e aumenta o custo de produção. Além disso, os produtos químicos contaminam o ambiente e prejudicam a saúde do homem. Nesse sentido, o controle das doenças pela utilização de cultivares resistentes tem recebido atenção da pesquisa por ser um método eficiente, seguro, barato e acessível a produtores de qualquer nível econômico.

Os procedimentos de melhoramento pelo método dos retrocruzamentos têm sido largamente utilizados para transferência de características simples, como resistência a doenças, geralmente controladas por um único gene, em cultivares-elite (OPENSHAW et al., 1994; SHAVER, 1976). Por esse método, a proporção esperada do genoma do parental doador é reduzida pela metade em cada geração de retrocruzamento, e, após seis retrocruzamentos, a recuperação do genoma do genitor recorrente (GR) é maior que 99%, calculada pela fórmula  $\%GR = 100[1 - (0,5)^{n+1}]$ , em que n é o número de retrocruzamentos (OPENSHAW et al., 1994).

Segundo OPENSHAW et al. (1994), a utilização de marcadores moleculares para identificação de indivíduos com maior proporção do genoma recorrente pode

reduzir o número de retrocruzamentos requeridos para sua recuperação. Os marcadores de DNA oferecem consideráveis vantagens para os retrocruzamentos, como seleção indireta de genes desejáveis, seleção para regiões do genitor recorrente não-ligadas à região introgridida e redução do arrasto de DNA (*linkage drag*) de região indesejada do genoma do parental doador, situada próxima à região introduzida. Isso reduz consideravelmente o número de gerações necessárias para recuperar o genoma do parental recorrente na progênie retrocruzada (LEE, 1995).

Nos últimos anos, o Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV tem se concentrado na obtenção de isolinhas resistentes a ferrugem, antracnose e mancha-angular, por meio de retrocruzamentos assistidos por marcadores moleculares.

Visando dar continuidade a esse programa de melhoramento, o presente trabalho teve como objetivo principal selecionar isolinhas resistentes geneticamente mais próximas do genitor recorrente, com o auxílio de marcadores moleculares RAPD. Essas isolinhas servirão para dar continuidade àquele programa de melhoramento, em que serão intercruzadas para promover a piramidização de genes de resistência no *background* “carioca” do cultivar Rudá.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material genético

Foram utilizadas isolinhas homozigotas no *background* genético Rudá resistentes à ferrugem, à antracnose e à mancha -angular, derivadas de subprogramas de retrocruzamentos do Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV (Quadro 1). Essas isolinhas tiveram origem de cruzamentos envolvendo o genitor recorrente Rudá e os genitores doadores Ouro Negro (resistente à ferrugem e à antracnose), TO e AB 136 (resistentes à antracnose) e AND 277 (resistente à mancha -angular).

### 2.2. Extração do DNA

Foram coletadas folhas de cada isolinha e de todos os genitores, as quais foram armazenadas em *freezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$  até serem utilizadas para extração do DNA, que foi realizada de acordo com o protocolo de DOYLE e DOYLE (1990), com algumas modificações (ABDELNOOR et al., 1995).

### 2.3. Amplificação pela técnica de RAPD

Amostras de DNA de cada isolinha e dos genitores foram amplificadas pela técnica de RAPD de acordo com WILLIAMS et al. (1990). Os *primers* foram adquiridos da “Operon Technologies” (Alameda, CA, EUA).

As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 25 µl, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 100 µM de cada um dos desoxinucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 µM de um *primer*, uma unidade da enzima Taq DNA polimerase e, aproximadamente, 25 ng de DNA. As amplificações foram efetuadas em termociclador Perkin-Elmer Cetus, modelo 9600, programado para 40 ciclos, cada um constituído da seguinte seqüência: 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 35°C e um minuto a 72°C. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de sete minutos a 72°C, e, finalmente, a temperatura foi reduzida a 4°C.

Após a amplificação foram adicionados, a cada amostra, 3 µl do corante tipo IV (0,25% de azul-de-bromofenol e 60% de glicerol). Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml), e submersas em tampão TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi de quatro horas, aproximadamente, a 100 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, no sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

Quadro 1 - Isolinhhas homozigotas para a resistência a ferrugem, antracnose e mancha-angular e isolinhhas suscetíveis utilizadas como controle

Cruzamentos			
1 - Ouro Negro x Rudá	2 - TO x Rudá	3 - AB 136 x Rudá	4 - AND 277 x Rudá
Linhagem	Linhagem	Linhagem	Linhagem
03-99	41-5-1-1	74-1-3	7-2-9-4-4
06-99	41-5-2-5	74-1-9	7-2-9-4-6
13-99	41-5-6-4	74-1-10	7-2-9-4-10
14-99	41-5-2-3	74-1-13	7-2-9-4-12
24-99	41-5-6-1	74-1-16	7-2-9-7-10
25-99	41-5-6-12	74-1-18	7-2-9-4-11*
35-99	41-5-6-24	76-1-1*	7-2-9-7-3*
40-99	41-5-6-30	76-1-3*	7-2-9-4-14*
42-99	368-1-3-1	74-1-2*	
43-99	368-1-3-10		
44-99	41-5-6-13*		
45-99	368-1-3-2*		
48-99	41-5-2-7*		
01-99*			
10-99*			
16-99*			

\* Isolinhhas suscetíveis-controle.

## 2.4. Análise dos dados

Os dados foram registrados como presença (1) ou ausência (0) de bandas entre os diferentes indivíduos, gerando uma matriz de valores binários.

Foram calculadas distâncias genéticas ( $D_{ij}$ ) entre as isolinhhas homozigotas resistentes, isolinhhas suscetíveis e genitores com base no complemento aritmético do coeficiente de coincidências simples (SNEATH e SOKAL, 1973):

$$D_{ij} = \frac{b + c}{a + b + c + d}$$

em que

$D_{ij}$  = distância genética entre a linhagem ou genitor  $i$  e a linhagem ou genitor  $j$ ;

$a$  = número de encontros 1, 1;

$b$  = número de encontros 1, 0;

$c$  = número de encontros 0, 1; e

$d$  = número de encontros 0, 0.

Para cálculo das distâncias genéticas relativas ( $DR_{ij}$ ), a maior  $D_{ij}$  foi transformada para 100% e as demais  $D_{ij}$ , corrigidas proporcionalmente.

Com base nas distâncias genéticas foram selecionadas, em cada cruzamento, as isolinhhas que apresentaram as menores distâncias genéticas em relação ao genitor recorrente e as isolinhhas contrastantes para resistência a ferrugem, antracnose e mancha-angular com menores distâncias genéticas entre si.

Foi utilizada a técnica de componentes principais para representar graficamente o inter-relacionamento entre os genótipos estudados, com base na matriz de distâncias genéticas. O método de agrupamento de Tocher foi utilizado para agrupar os indivíduos em grupos mutuamente exclusivos. As análises de divergência genética, componentes principais e agrupamento foram realizadas com o auxílio do Programa GENES (CRUZ, 1997).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 1 estão apresentados os resultados obtidos da amplificação com marcadores RAPD nas isolinhas dos quatro retrocruzamentos. Embora o número de *primers* testado fosse igual para todos os retrocruzamentos, os dados moleculares revelaram diferenças no número de *primers* polimórficos entre os genitores, confirmando que a divergência genética é maior entre genótipos andinos e mesoamericanos (Rudá e AND 277). Genótipos pertencentes ao mesmo centro de domesticação apresentaram semelhança no número de *primers* polimórficos (Rudá, Ouro Negro, TO e AB 136). Da mesma forma, o número de bandas polimórficas foi semelhante entre genótipos de um mesmo centro de domesticação e diferente de genótipos de centros de domesticação distintos. As distâncias genéticas calculadas mostraram-se semelhantes em todos os retrocruzamentos, independentemente da geração em que as isolinhas se encontravam, do número de *primers* polimórficos, do número de bandas polimórficas e da origem dos genitores doador e recorrente.

Na análise dos componentes principais, verificou-se que a variância acumulada nos dois primeiros componentes principais foi superior a 99,20% para todos os retrocruzamentos. As análises de agrupamento definiram dois grupos, um contendo o genitor doador e o outro contendo todas as isolinhas e o genitor recorrente (Figuras 1, 2, 3 e 4).

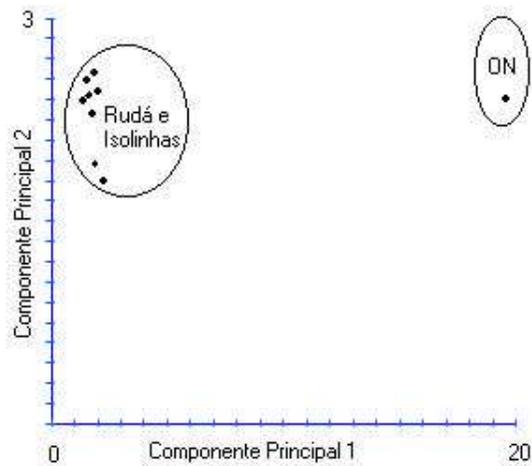


Figura 1 - Dispersão das isolinhas pertencentes à população originada do cruzamento entre Rudá x ON em relação aos dois primeiros componentes principais. A variância acumulada nesses dois componentes principais foi de 99,72%. Os grupos indicados foram obtidos pelo método de Tocher.

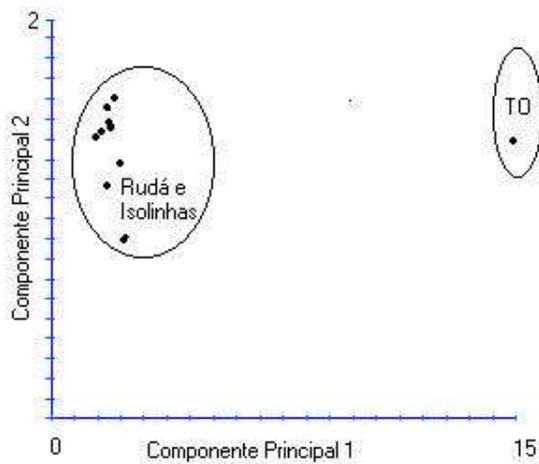


Figura 2 - Dispersão das isolinhas pertencentes à população originada do cruzamento entre Rudá x TO em relação aos dois primeiros componentes principais. A variância acumulada nesses dois componentes principais foi de 99,21%. Os grupos indicados foram obtidos pelo método de Tocher.

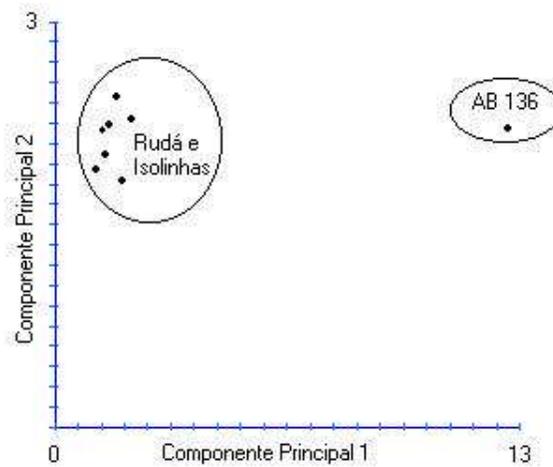


Figura 3 - Dispersão das isolinhas pertencentes à população originada do cruzamento entre Rudá x AB 136 em relação aos dois primeiros componentes principais. A variância acumulada nesses dois componentes principais foi de 99,50%. Os grupos indicados foram obtidos pelo método de Tocher

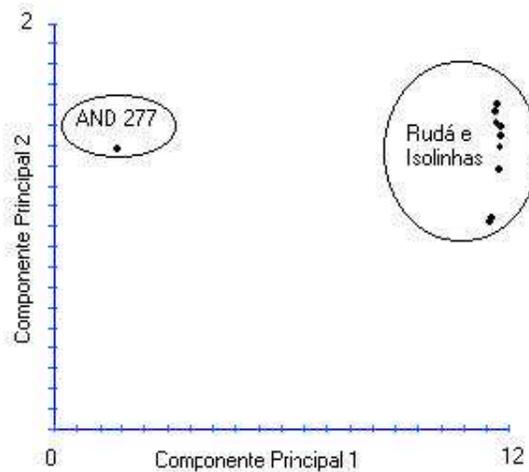


Figura 4 - Dispersão das isolinhas pertencentes à população originada do cruzamento entre Rudá x AND 277 em relação aos dois primeiros componentes principais. A variância acumulada nesses dois componentes principais foi de 99,92%. Os grupos indicados foram obtidos pelo método de Tocher.

Quadro 1 - Genitores envolvidos, geração, resistência e número de isolinhas obtidas em cada subprograma de retrocruzamento do Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV

Retrocruzamento	Genitor Doador	Geração	Primers		Bpl*	Distância Genética	Nis*
			Tst*	Pol*			
Rudá x Ouro Negro	Mesoamericano	RC <sub>3</sub> F <sub>2,3</sub>	65	26	51	00,0 - 1,50	5
Rudá x TO	Mesoamericano	RC <sub>4</sub> F <sub>2,3</sub>	65	27	51	0,56 - 1,97	4
Rudá x AB 136	Mesoamericano	RC <sub>4</sub> F <sub>2,3</sub>	65	24	40	0,52 - 1,04	6
Rudá x AND 277	Andino	RC <sub>4</sub> F <sub>2,3</sub>	65	42	153	0,22 - 1,99	3

(\*) Tst - *Primers* testados, Pol - *Primers* polimórficos, Bpl - Bandas polimórficas e Nis - Número de isolinhas selecionadas.

A rápida recuperação do genoma recorrente com o uso de marcadores moleculares permitiu que na geração RC<sub>3</sub>F<sub>3</sub>, analisada neste trabalho, fossem encontradas isolinhas com 0% de distância genética em relação ao genitor recorrente (Quadros 2, 3, 4 e 5). Além disso, é possível reafirmar que os marcadores de DNA representam uma ferramenta muito útil nesse tipo de programa de melhoramento (OPENSHAW et al., 1994; MIKLAS et al., 1993; KELLY e MIKLAS, 1998a; YOUNG e KELLY, 1997). Outro fator importante na recuperação do genoma recorrente está na divergência genética entre os genitores. De maneira geral, espera-se que, quanto maior a divergência entre os genitores, maior será o tempo necessário para recuperação do genoma recorrente. Entretanto, a divergência genética não é o único fator que interfere na recuperação do genoma recorrente com o auxílio de marcadores. ARRUDA (1998), em trabalho de introgressão do gene *Co-4* usando marcadores RAPD, obteve distâncias genéticas relativas entre as plantas do RC<sub>1</sub> e RC<sub>2</sub>, em relação ao genitor recorrente, que variaram de 29 - 72% e 27 - 60%, respectivamente. No entanto, a ausência de descendentes de algumas plantas RC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> selecionadas para o segundo retrocruzamento pode ter contribuído para a baixa recuperação do genoma recorrente. Pelo exposto, pode-se concluir que o melhorista, ao utilizar marcadores moleculares RAPD em programas de retrocruzamento, deve preocupar-se em obter um número grande de descendentes em cada ciclo de retrocruzamento e utilizar um número de *primers* representativo.

Quadro 2 - Distâncias genéticas (%) entre os progenitores e as linhagens obtidas a partir do cruzamento inicial entre Rudá e Ouro Negro

	ON	Rudá	03-99	06-99	13-99	14-99	24-99	25-99	35-99	40-99	42-99	43-99	44-99	45-99	48-99	01-99*	10-99*
Rudá	19,17																
03-99	18,80	0,75															
06-99	18,80	0,38	0,00														
13-99	18,05	1,13	0,75	0,75													
14-99	18,05	1,13	0,75	0,75	0,75												
24-99	18,42	0,75	0,38	0,38	0,38	0,38											
25-99	18,80	0,38	0,00	0,00	0,75	0,75	0,38										
35-99	18,05	1,13	0,75	0,75	1,50	1,50	1,13	0,75									
40-99	17,67	1,50	1,13	1,13	1,88	1,13	1,50	1,13	1,88								
42-99	18,42	0,75	0,38	0,38	1,13	1,13	0,75	0,38	0,38	1,50							
43-99	18,80	0,75	0,00	0,00	0,75	0,75	0,38	0,00	0,75	1,13	0,38						
44-99	18,80	0,38	0,00	0,00	0,75	0,75	0,38	0,00	0,75	1,13	0,38	0,00					
45-99	18,80	0,38	0,00	0,00	0,75	0,75	0,38	0,00	0,75	1,13	0,38	0,00	0,00				
48-99	19,17	0,00	0,38	0,38	1,13	1,13	0,75	0,38	1,13	1,50	0,75	0,38	0,38	0,38			
01-99*	18,05	1,13	0,75	0,75	1,50	0,75	1,13	0,75	1,50	0,38	1,13	0,75	0,75	0,75	1,13		
10-99*	18,42	0,75	0,38	0,38	0,38	0,38	0,00	0,38	1,13	1,50	0,75	0,38	0,38	0,38	0,75	1,13	
16-99*	18,42	0,75	0,38	0,38	0,38	0,38	0,00	0,38	1,13	1,50	0,75	0,38	0,38	0,38	0,75	1,13	0,00

\* Isolinhhas suscetíveis-controle.

# Isolinhhas resistentes selecionadas.

Quadro 3 - Distâncias genéticas (%) entre os genitores e as linhagens obtidas a partir do cruzamento inicial entre Rudá e TO

	TO	Rudá	41-5-1-1	41-5-2-5	41-5-6-4	41-5-2-3	41-5-6-1	41-5-6-12	41-5-6-24	41-5-6-30	368-1-3-1	368-1-3-10	41-5-6-13*	368-1-3-2*
Rudá	14,37													
41-5-1-1	13,80	0,56												
41-5-2-5	13,80	0,56	0,00											
41-5-6-4	13,80	0,56	0,00	0,00										
41-5-2-3	13,24	1,13	0,56	0,56	0,56									
41-5-6-1	12,39	1,97	1,41	1,41	1,41	1,97								
41-5-6-12	12,68	1,69	1,13	1,13	1,13	1,69	1,41							
41-5-6-24	13,52	0,85	0,28	0,28	0,28	0,85	1,69	0,85						
41-5-6-30	12,39	1,97	1,41	1,41	1,41	1,97	0,56	1,97	1,69					
368-1-3-1	13,24	1,13	0,56	0,56	0,56	1,13	1,97	1,13	0,28	1,97				
368-1-3-10	12,96	1,41	0,85	0,85	0,85	0,28	2,25	1,97	1,13	2,25	0,85			
41-5-6-13*	12,96	1,41	0,85	0,85	0,85	0,28	1,69	1,41	1,13	1,69	1,41	0,56		
368-1-3-2*	13,24	1,13	0,56	0,56	0,56	1,13	0,85	1,69	0,85	0,85	1,13	1,41	1,41	
41-5-2-7*	13,80	0,56	0,00	0,00	0,00	0,56	1,41	1,13	0,28	1,41	0,56	0,85	0,85	0,56

\* Isolinhhas suscetíveis-controle.

# Isolinhhas resistentes selecionadas.

Quadro 4 - Distâncias genéticas (%) entre os genitores e as linhagens obtidas a partir do cruzamento inicial entre Rudá e AB 136

	AB136	Rudá	# 74-1-3	# 74-1-9	# 74-1-10	# 74-1-13	# 74-1-16	# 74-1-18	* 76-1-1*	* 76-1-3*
Rudá	10,36									
74-1-3	9,59	0,78								
74-1-9	9,59	0,78	0,00							
74-1-10	9,59	0,78	0,52	0,52						
74-1-13	9,59	0,78	0,52	0,52	0,00					
74-1-16	9,84	0,52	0,26	0,26	0,26	0,26				
74-1-18	9,59	0,78	0,52	0,52	0,52	0,52	0,26			
76-1-1*	9,33	1,04	0,78	0,78	0,78	0,78	0,52	0,78		
76-1-3*	9,33	1,04	0,78	0,78	0,78	0,78	0,52	0,78	0,52	
74-1-2*	9,59	0,78	0,52	0,52	0,52	0,52	0,26	0,00	0,78	0,78

\* Isolinhas suscetíveis-controle.

# Isolinhas resistentes selecionadas.

Quadro 5 - Distâncias genéticas (%) entre os genitores e as linhagens obtidas a partir do cruzamento inicial entre Rudá e AND 277

	AND 277	Rudá	7-2-9-4-4	# 7-2-9-4-6	# 7-2-9-4-10	7-2-9-4-12	# 7-2-9-7-10	* 7-2-9-4-11*	* 7-2-9-7-3*
Rudá	33,77								
7-2-9-4-4	31,79	1,99							
7-2-9-4-6	33,55	0,22	2,21						
7-2-9-4-10	33,11	0,66	1,32	0,88					
7-2-9-4-12	32,01	1,77	0,22	1,99	1,10				
7-2-9-7-10	33,55	0,22	1,77	0,44	0,88	1,55			
7-2-9-4-11*	32,67	1,10	2,65	0,88	1,77	2,43	1,32		
7-2-9-7-3*	32,67	1,10	2,21	0,88	1,32	2,43	1,32	0,88	
7-2-9-4-14*	32,89	0,88	2,87	0,66	1,55	2,65	1,10	0,22	0,66

\* Isolinhas suscetíveis-controle.

# Isolinhas resistentes selecionadas.

Com o objetivo de reduzir o número de isolinhas para o processo de caracterização fenotípica, foram selecionadas aquelas mais próximas do genitor recorrente (Quadro 2). Foram selecionadas 18 isolinhas, sendo cinco resistentes à ferrugem e à antracnose simultaneamente, 10 à antracnose e três à mancha-angular.

Além das isolinhas resistentes, em todos os cruzamentos foram obtidas isolinhas suscetíveis, que eram isogênicas com relação às resistentes. Do cruzamento 1 foram identificadas três isolinhas com 0% de distância genética entre si, sendo uma delas homozigota resistente. Do cruzamento 2 foram identificadas quatro isolinhas com 0% de distância genética entre si, sendo três delas homozigotas resistentes. Do cruzamento 3 foram identificadas duas isolinhas com 0% de distância genética entre elas, sendo uma delas homozigota resistente. Do cruzamento 4 foram identificadas duas isolinhas com 0,66% de distância genética entre elas, sendo uma homozigota resistente.

A seleção de isolinhas resistentes mais próximas ao genitor recorrente, nesses retrocruzamentos, será de grande utilidade nos processos de piramidização de genes de resistência no *background* “carioca”, cultivar Rudá. As isolinhas contrastantes para a resistência podem ser utilizadas para isolamento dos genes R envolvidos, facilitando o entendimento da interação molecular planta-patógeno.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Objetivando maximizar a eficiência do programa de retrocruzamento que visa à introgressão de genes de resistência à ferrugem, à antracnose e à mancha -angular no cultivar de feijoeiro Rudá, marcadores moleculares do tipo RAPD foram empregados na seleção de isolinhas resistentes mais próximas do genitor recorrente Rudá e isolinhas contrastantes nas três doenças citadas acima.

O DNA das folhas de todas as isolinhas e dos cinco genitores envolvidos foi extraído, quantificado e amplificado com 65 *primers*. Com base na informação dos marcadores moleculares foram calculadas distâncias genéticas entre as isolinhas e seus genitores e feitas análises de agrupamento com base nessas distâncias.

As análises de agrupamentos em todos os cruzamentos definiram dois grupos, um contendo o genitor doador e, o outro, todas as isolinhas e o genitor recorrente. As distâncias genéticas entre as isolinhas de todos os cruzamentos e o genitor recorrente variaram entre 0 e 1,99%. Da população originada do retrocruzamento 1 foram selecionadas cinco isolinhas resistentes com distâncias genéticas em relação ao genitor recorrente, as quais variaram entre 0 e 0,38%. Da população originada do retrocruzamento 2 foram selecionadas quatro isolinhas resistentes com distâncias genéticas em relação ao genitor recorrente, que variaram entre 0,56 e 0,85%. Da população originada do cruzamento 3 foram selecionadas todas as isolinhas resistentes obtidas, pois não houve como discriminar as isolinhas, considerando-se que as variações das distâncias genéticas em relação ao genitor recorrente foram muito pequenas, variando entre 0,52 e 0,78%. Da população originada do retrocruzamento 4 foram selecionadas três isolinhas resistentes, cujas distâncias genéticas em relação ao genitor recorrente variaram entre 0,22 e 0,66%.

Além das isolinhas resistentes, em todos os cruzamentos foram obtidas isolinhas suscetíveis, que foram isogênicas com relação às resistentes. Da população originada do cruzamento 1 foram identificadas três isolinhas com 0% de distância genética entre si, sendo uma delas homozigota resistente. Da população originada do cruzamento 2 foram identificadas quatro isolinhas com 0% de distância genética entre si, sendo três delas homozigotas resistentes. Da população originada do cruzamento 3 foram identificadas duas isolinhas com 0% de distância genética entre elas, sendo uma delas homozigota resistente. Da população originada do cruzamento 4 foram identificadas duas isolinhas com 0,66% de distância genética entre elas, sendo uma homozigota resistente.

A seleção de isolinhas resistentes mais próximas ao genitor recorrente, nesses retrocruzamentos, será de grande utilidade nos processos de piramidização de genes de resistência no *background* “carioca”, cultivar Rudá. As isolinhas contrastantes para a resistência podem ser utilizadas no isolamento dos genes R envolvidos, facilitando o entendimento da interação molecular planta-patógeno.

## CAPÍTULO 3

### REAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE ISOLINHAS DE FEIJOEIRO A DIFERENTES PATÓTIPOS DE *Uromyces appendiculatus*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Phaeoisariopsis griseola*

#### 1. INTRODUÇÃO

A cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é de grande importância para a população, por ser reconhecidamente excelente fonte de proteína e constituinte alimentar de baixo custo. Além de sua relevância na dieta do brasileiro, o feijão é um produto agrícola de grande importância econômica e social, por ser cultivado por agricultores de subsistência até produtores que utilizam alta tecnologia em todas as etapas do processo de produção.

Vários problemas fitossanitários, no entanto, ocorrem nessa cultura. As doenças foliares causadoras da ferrugem (*Uromyces appendiculatus*), antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) e mancha-angular (*Phaeoisariopsis griseola*) se encontram entre as principais responsáveis por prejuízos na produção de grãos. Entretanto, por meio do melhoramento genético, cultivares resistentes a diversos patógenos poderão ser obtidos. A introgressão de genes de resistência em um cultivar-elite (piramidização) é uma estratégia que vem sendo adotada em muitos programas de melhoramento de plantas autógamas. O método a ser escolhido para piramidização depende do tipo de resistência com que se está trabalhando. Quando se trabalha com a transferência paralela de genes de resistência em vários subprogramas de retrocruzamento, obtêm-se isolinhas resistentes para cada patógeno.

Uma das etapas importantes no processo de piramidização dos genes de resistência é a caracterização fenotípica das isolinhas obtidas nos vários subprogramas. A caracterização fenotípica é feita utilizando patótipos dos diferentes patógenos envolvidos no processo de piramidização, para se ter informação do tipo de reação que

essas isolinhas apresentam diante dos patótipos e da tomada de decisão no processo de escolha das isolinhas com maior espectro de resistência na etapa de intercruzamento.

Nos últimos anos, o Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV tem se concentrado na obtenção de isolinhas resistentes à ferrugem, à antracnose e à mancha-angular que possam ser intercruzadas para obter cultivar com grãos do tipo “carioca” resistente a essas três doenças.

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar as isolinhas selecionadas pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, quanto à resistência/suscetibilidade a vários patótipos de *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* e *P. griseola*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material genético

Este trabalho foi realizado com a utilização de isolinhas  $RC_nF_3$ , desenvolvidas e selecionadas com base em marcadores moleculares pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BOAGRO/UFV. Essas isolinhas pertencem a quatro subprogramas de retrocruzamentos em que o genitor recorrente utilizado foi o cultivar Rudá. Incluíram-se os genitores envolvidos em cada retrocruzamento (Quadro 1).

Quadro 1 - Isolinhas homozigotas para a resistência a ferrugem, antracnose e mancha-angular selecionadas com base em marcadores RAPD

Retrocruzamentos			
1 - Ouro Negro x Rudá	2 - TO x Rudá	3 - AB 136 x Rudá	4 - AND 277 x Rudá
Isolinhas	Isolinhas	Isolinhas	Isolinhas
06-99	41-5-1-1	74-1-3	7-2-9-4-6
25-99	41-5-2-5	74-1-9	7-2-9-4-10
43-99	41-5-6-4	74-1-10	7-2-9-7-10
45-99	41-5-6-24	74-1-13	
48-99		74-1-16	
		74-1-18	

## 2.2. Reação de resistência a *Uromyces appendiculatus*

A caracterização da resistência à ferrugem foi realizada utilizando todos os genitores e todas as isolinhas dos quatro subprogramas de retrocruzamento (Quadro 1). Para cada avaliação com *U. appendiculatus* foram cultivadas 10 sementes de cada genótipo. As sementes foram semeadas diretamente em bandejas plásticas contendo a mistura de solo e esterco curtido, na proporção de 4:1, adubada no momento do preparo com 5 kg do adubo 4-14-8 por m<sup>3</sup> de substrato. As plantas foram mantidas em casa de vegetação até o momento da inoculação.

Foram utilizados para avaliação da resistência a *U. appendiculatus* os patótipos descritos no Quadro 2, identificados por FALEIRO et al. (1997). As culturas monospóricas armazenadas a 5°C e 50% de umidade relativa foram multiplicadas no hospedeiro suscetível US Pinto 111 antes da inoculação, visando recuperar a viabilidade dos uredósporos. A inoculação foi realizada quando as folhas primárias apresentavam aproximadamente 2/3 do seu desenvolvimento completo, cerca de 10 dias após a semeadura. Os uredósporos, na concentração de 2,0 x 10<sup>4</sup> esporos/mL, foram suspensos em água destilada contendo 0,05% de Tween 20 e aspergidos em ambas as superfícies foliares, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº 15, acionado por um compressor elétrico. Após a inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro (20 ± 1°C e umidade relativa >95%), onde permaneceram por 48 horas, sob fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, foram novamente transferidas para a casa de vegetação (20 ± 5°C), onde permaneceram até serem avaliadas.

Na avaliação dos sintomas foram considerados seis graus de reação segundo a escala proposta no “The Bean Rust Workshop”: 1- ausência de pústulas, 2- manchas necróticas sem esporulação, 3- pústulas esporulando com diâmetro < 300 µm, 4- pústulas esporulando com diâmetro de 300 a 499 µm, 5- pústulas esporulando com diâmetro de 500 a 800 µm e 6- pústulas esporulando com diâmetro > 800 µm (STAVELY et al., 1983). Neste trabalho, as plantas que apresentaram graus 1 a 3 foram consideradas resistentes e as com grau 4 ou maior, suscetíveis. O grau de reação foi determinado mediante a observação visual das pústulas na face superior das folhas primárias, sendo utilizado, como auxílio nas observações, o diagrama de representação gráfica idealizado por CASTAÑO (1985).

Quadro 2 - Isolados de *Uromyces appendiculatus* previamente identificados por FALEIRO et al. (1997)

A	B	C
15-F	13	32
11-F	9	45
12-F	10	46
14-F	12	47
3-F	2	49
13-F	11	50
7-F	6	52
1-F	1	54
5-F	4	58
9-F	8	59

A- Isolados obtidos e classificados em patótipos por FALEIRO et al. (1997) (-F).

B- Designação dos patótipos atribuída pelos autores.

C- Nova designação das raças fisiológicas classificadas pelo sistema simplificado por FALEIRO et al. (1999b).

### 2.3. Reação de resistência a *Colletotrichum lindemuthianum*

A caracterização da resistência à antracnose foi realizada utilizando todos os genitores e todas as isolinhas dos quatro subprogramas de retrocruzamento. Para cada patótipo de *C. lindemuthianum* testados foram cultivadas 10 sementes de cada genótipo. O preparo do solo, a adubação e a condução das plantas até o momento da inoculação foram semelhantes aos do ensaio com ferrugem.

Para avaliação da resistência à antracnose, foram utilizados os patótipos descritos no Quadro 3. As culturas monospóricas originais dos três patótipos utilizados foram cedidas pela EMBRAPA Arroz e Feijão. O preparo do inóculo e a inoculação seguiram a metodologia adaptada de PIO-RIBEIRO e CHAVES (1975). O inóculo de cada patótipo foi reproduzido em tubos de ensaio contendo vagens esterilizadas e parcialmente imersas em meio ágar-água. Os tubos com o inóculo foram incubados por 10 dias em temperatura de 23°C, para produção dos conídios a serem utilizados na inoculação. A inoculação foi feita 10 dias após o plantio, utilizando-se uma suspensão contendo  $1,2 \times 10^6$  conídios/mL, a qual foi aplicada em ambas as superfícies das folhas primárias, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº 15 acionado por um compressor elétrico. Após a inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram incubadas por cinco dias na câmara de nevoeiro ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $>95\%$  de umidade relativa), sob fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, foram novamente transferidas para a casa de vegetação ( $20 \pm 5^\circ\text{C}$ ), onde permaneceram até serem avaliadas. A avaliação dos sintomas da antracnose foi realizada 10 dias após a inoculação, com base na escala de 1 a 9 descrita por PASTOR-CORRALES (1992). As plantas que apresentaram graus de reação 1 a 3 foram consideradas resistentes e aquelas com grau 4 ou maior, suscetíveis.

Quadro 3 - Patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* e suas origens

Patótipo (Nomenclatura Binária)	Grupo/Patótipo (Nomenclatura Clássica)	Origem (Estado)
7	DELTA/Delta	PE
23	DELTA/Delta	GO
55	DELTA/Lambda	PR
64	MEXICANO I /Mexicano I	ES
65	ALFA/Epsilon	BA
67	MEXICANO II/Mexicano II	ES
73	ALFA/Alfa BR	ES
79	DELTA /Capa	ES
81	ALFA /Eta	PE
83	MEXICANO II /Mexicano II	GO
87	DELTA/Mu	ES
89	ALFA/Alfa BR	MG
95	DELTA/Capa	RS
102	GAMA/Gama	RS
117	BRASILEIRO I /Brasileiro I	GO
119	DELTA/Lambda	GO

343  
453  
Fonte: RAVA et al. (1994).

DELTA/Mu  
BRASILEIRO I /Zeta

MS  
RS

## 2.4. Reação de resistência a *Phaeoisariopsis griseola*

A caracterização da resistência à mancha -angular foi realizada utilizando os genitores e as isolinhas dos retrocruzamento entre Rudá x Ouro Negro e Rudá x AND 277. Para cada patótipo de *P. griseola* testado foram cultivadas 10 sementes de cada genótipo, em vasos plásticos de 2,5 L, com três a quatro plantas por vaso. O preparo do solo, a adubação e a condução das plantas até o momento da inoculação foram semelhantes aos do ensaio com ferrugem.

Para avaliação da resistência à mancha -angular, foram utilizados os patótipos 31-15, 63-19 (2 isolados), 63-23 (2 isolados) e 63-31, classificados por NIETSCHE (1997 e 2000). O inóculo de cada patótipo foi reproduzido em placas de Petri contendo meio V8. A inoculação foi realizada após o aparecimento da primeira folha trifoliolada em ambas as superfícies da folha com uma suspensão do patógeno, previamente preparada e ajustada para concentração de  $2 \times 10^4$  conídios/mL. Os procedimentos de inoculação e transferência para a câmara de nevoeiro e para a casa de vegetação foram idênticos aos realizados no ensaio de ferrugem. A severidade da doença foi avaliada visualmente aos 18 e 25 dias após a inoculação, utilizando-se uma escala com nove graus de severidade proposta por PASTOR-CORRALES e JARA (1995): 1- plantas sem sintomas da doença; 2- presença de até 3% de lesões; 3- presença de até 5% de lesões foliares, sem esporulação do patógeno; 4- presença de lesões esporuladas cobrindo 10% da área foliar; 5- presença de várias lesões esporuladas entre 2 e 3 mm, cobrindo 10-15% da área foliar; 6- presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, cobrindo entre 15-20% da área foliar; 7- presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, cobrindo entre 20- 25% da área foliar; 8- presença de numerosas lesões esporuladas maiores que 3 mm, que cobrem entre 25-30% da área foliar, associadas a tecidos; e 9- sintomas severos da doença, resultando em queda prematura de folhas e morte da planta. Neste trabalho, as plantas que apresentaram graus 1 a 4 foram consideradas resistentes e as com grau 5 ou maior, suscetíveis.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Análise da reação de resistência à ferrugem

No Quadro 4 estão apresentados os resultados da reação de resistência a *U. appendiculatus*. Considerando os cultivares Ouro Negro (resistente) e Rudá (suscetível), verificou-se que duas isolinhas (ON-25-99 e ON-48-99) comportaram-se como homozigotas resistentes a todos os patótipos, apresentando reação de resistência semelhante à do genitor resistente. A isolinha ON-06-99 exibiu resistência a 10 patótipos, porém não apresentou resistência ao patótipo 32, mostrando plantas resistentes e suscetíveis. No entanto, as isolinhas ON-43-99 e ON-45-99 apresentaram tanto plantas resistentes quanto suscetíveis em todos os patótipos de *U. appendiculatus* utilizados neste trabalho, exceto na isolinha ON-45-99 do patótipo 50, em que todas as plantas foram resistentes.

Estes resultados indicam o grande potencial de utilização das isolinhas ON-25-99 e ON-48-99 como material comercial, pois apresentam resistência a todos os patótipos de *U. appendiculatus* testados. Para que essas isolinhas sejam lançadas como Rudá RF (resistente à ferrugem), é necessário que sejam conduzidos ensaios de competição de linha gens. Essas isolinhas podem também ser utilizadas como genitores em programas de melhoramento visando à resistência à ferrugem.

As isolinhas dos retrocruzamentos não envolvendo o cultivar Ouro Negro e seus genitores foram suscetíveis em todos os patótipos de ferrugem testados, permitindo, assim, a conclusão de que os retrocruzamentos foram eficientes no processo de transferência de genes de resistência no cultivar Rudá e que genes de resistência relacionados a outros patógenos não conferem nenhuma resistência à ferrugem.

Quadro 4 - Genótipos dos genitores e das isolinhas para resistência à ferrugem do feijoeiro

Genótipo	*Patótipos de <i>Uromyces appendiculatus</i>									
	54	49	58	52	59	45	46	50	47	32
Rudá	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr	rr
Ouro Negro	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR

TO	rr									
AB 136	rr									
AND 277	rr									
ON-06-99	RR	R/rr								
ON-25-99	RR									
ON-43-99	R/rr									
ON-45-99	R/rr	RR	R/rr	R/rr						
ON-48-99	RR									
TO-41-5-1-1	rr									
TO-41-5-2-5	rr									
TO-41-5-6-4	rr									
TO-41-5-6-24	rr									
AB-74-1-3	rr									
AB-74-1-9	rr									
AB-74-1-10	rr									
AB-74-1-13	rr									
AB-74-1-16	rr									
AB-74-1-18	rr									
AN-7-2-9-4-6	rr									
AN-7-2-9-4-10	rr									
AN-7-2-9-7-10	rr									

\* Designação dos patótipos atribuída por FALEIRO et al. (1997).

### 3.2. Análise da reação de resistência à antracnose

No Quadro 5, apresentam-se os resultados da reação de resistência de *C. lindemuthianum*. O cultivar Rudá comportou-se como resistente a três dos 18 patótipos testados, sendo este cultivar suscetível a 14 patótipos, o qual apresentou plantas resistentes e suscetíveis a um patótipo, indicando que esse cultivar não é material genético puro no loco gênico que confere resistência a esse patótipo. O cultivar Ouro Negro apresentou-se homocigoto resistente a 10 patótipos, homocigoto suscetível a apenas um patótipo e com plantas resistentes e suscetíveis a sete patótipos dos 18 testados, permitindo concluir que é um cultivar segregante em locos de resistência à antracnose. O cultivar TO teve muito bom desempenho, comportou-se como homocigoto resistente a 17 patótipos e suscetível a apenas ao patótipo 343-506 de *C. lindemuthianum*. Já o cultivar AB 136 teve o melhor desempenho de todos os genitores, comportando-se como resistente a todos os patótipos de *C. lindemuthianum*. A isolinha ON-25-99, classificada como resistente a todos os patótipos de ferrugem, apresentou-se homocigota resistente a 15 patótipos de *C. lindemuthianum*, suscetível aos patótipos 64-458 e 65-400 e isolinha não-pura ao patótipo 87-531. Enquanto a isolinha ON-48-99 mostrou-se homocigota resistente a 13 patótipos, suscetível aos patótipos 64-458 e 65-400 e multilinha ou impura aos patótipos 83-501, 87-531 e 343-506 de *C. lindemuthianum*, a isolinha TO-41-5-6-24 do retrocruzamento entre Rudá x TO apresentou o melhor comportamento dentro deste cruzamento, sendo homocigota resistente a 17 patótipos e isolinha não-pura para o patótipo 343-506. A isolinha AB-74-1-18 do cruzamento entre Rudá x AB 136 exibiu o melhor comportamento dentro deste retrocruzamento, sendo homocigota resistente a 15 patótipos e isolinha não-pura aos patótipos 64-458, 119-481 e 343-506 de *C. lindemuthianum*.

Esses resultados evidenciam o grande potencial de utilização da isolinha ON-25-99 como material comercial, pois esta apresentou resistência a todos os patótipos de *U. appendiculatus* testados e, se se aplicasse seleção das plantas resistentes ao patótipo

87-531, apresentaria também resistência a 16 dos 18 patótipos de *C. lindemuthianum* testados; esse processo de lançamento de cultivar necessita apenas de condução de alguns ensaios de competição regionais e nacionais de linhagens para ser lançada como Rudá RFA (resistentes à ferrugem e à antracnose). Esta conclusão se estende às isolinhas TO-41-5-6-24 e AB-74-1-18, que necessitam apenas de seleção dentro da isolinha para serem lançadas como Rudá RA (resistentes à antracnose).

Ao que se concluiu com o estudo de caracterização com ferrugem também se faz com ralação à avaliação com antracnose, ou seja, essas isolinhas têm grande possibilidade de serem utilizadas como genitor em programa de melhoramento, principalmente os que visam aumentar a média geral e a resistência a doenças.

Quadro 5 - Genótipos dos genitores e das isolinhas para resistência à antracnose do feijoeiro

Genótipo	Patótipos de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>																	
	7-304	23-79	55-264	64-458	65-400	67-490	73-520	79-472	81-401	83-501	87-531	89-2A2	95-390	102-389	117-484	119-481	343-506	453-457
Rudá	r	RR	r	RR	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	RR	R/r	r
Ouro Negro	R/r	RR	RR	R/r	r	RR	RR	RR	RR	R/r	RR	RR	R/r	RR	R/r	RR	R/r	R/r
TO	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR
AB 136	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR
ON-06-99	RR	RR	RR	R/r	r	RR	RR	RR	RR	R/r	R/r	RR	R/r	RR	RR	RR	RR	RR
ON-25-99	RR	RR	RR	r	r	RR	RR	RR	RR	RR	R/r	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR
ON-43-99	R/r	RR	R/r	R/r	r	R/r	R/r	R/r	R/r	R/r								
ON-45-99	R/r	R/r	R/r	R/r	r	R/r	R/r	R/r	R/r	R/r								
ON-48-99	RR	RR	RR	r	r	RR	RR	RR	RR	R/r	R/r	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR
TO-41-5-1-1	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR
TO-41-5-2-5	RR	RR	RR	RR	RR	R/r	RR	RR	RR	R/r	RR							
TO-41-5-6-4	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	R/r	RR	RR	RR	R/r	RR
TO-41-5-6-24	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	RR	R/r	RR
AB-74-1-3	R/r	R/r	R/r	RR	R/r	RR	RR	RR	R/r	R/r	R/r	RR	RR	RR	R/r	RR	R/r	R/r
AB-74-1-9	RR	RR	RR	R/r	RR	RR	R/r	RR	RR	R/r	R/r	RR	R/r	R/r	RR	RR	R/r	RR
AB-74-1-10	R/r	R/r	R/r	R/r	R/r	R/r	R/r	R/r	R/r	R/r	R/r	RR	R/r	R/r	R/r	RR	R/r	R/r
AB-74-1-13	RR	RR	RR	R/r	RR	RR	RR	R/r	RR									
AB-74-1-16	R/r	R/r	R/r	R/r	R/r	R/r	R/r	R/r	RR	R/r	R/r	R/r	R/r	R/r	R/r	R/r	R/r	R/r
AB-74-1-18	RR	RR	RR	R/r	RR	RR	RR	R/r	RR									
AN-7-2-9-4-6	-	-	-	-	r	r	-	r	r	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AN-7-2-9-4-10	-	-	-	-	r	r	-	r	r	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AN-7-2-9-7-10	-	-	-	-	r	r	-	r	r	-	-	-	-	-	-	-	-	-

### 3.3. Análise da reação de resistência à mancha-angular

No Quadro 6 estão apresentados os resultados da reação de resistência a *P. griseola*. O cultivar Rudá comportou-se como suscetível a todos os patótipos testados, ao passo que o cultivar Ouro Negro apresentou-se como suscetível a três isolados testados, bem como plantas resistentes e suscetíveis a três desses isolados, confirmando, portanto, que se trata de um cultivar segregante. O genitor AND 277 mostrou-se resistente a todos os patótipos utilizados. Todas as isolinhas provenientes do cruzamento entre Rudá x Ouro Negro apresentaram-se suscetíveis, no entanto as isolinhas do

cruzamento entre Rudá x AND 277 tiveram bom comportamento perante os patótipos testados, sendo a isolinha AN-7-2-9-4-6 a melhor de todas, comportando-se como resistente homocigota a todos os patótipos testados. Esta isolinha apresentou o melhor potencial para ser utilizada no processo de intercruzamento para piramidização de genes de resistência no cultivar Rudá.

Quadro 6 - Genótipos dos genitores e das isolinhas para resistência à mancha angular

Genótipo	Patótipos de <i>Phaeoisariopsis griseola</i>					
	63-19		31-15	63-31	63-23	
	48-1*	144-3*	97-2*	113-2*	57-4*	158-1*
Rudá	rr	rr	rr	rr	rr	rr
Ouro Negro	rr	R_/rr	rr	R_/rr	rr	R_/rr
AND 277	RR	RR	RR	RR	RR	RR
ON-06-99	rr	rr	rr	rr	rr	rr
ON-25-99	rr	rr	rr	rr	rr	rr
ON-43-99	rr	rr	rr	rr	rr	rr
ON-45-99	rr	rr	rr	rr	rr	rr
ON-48-99	rr	rr	rr	rr	rr	rr
AN-7-2-9-4-6	RR	RR	RR	RR	RR	RR
AN-7-2-9-4-10	RR	RR	R_/rr	RR	R_/rr	RR
AN-7-2-9-7-10	R_/rr	R_/rr	R_/rr	R_/rr	R_/rr	R_/rr

\* Isolados classificados por NIETSCHÉ (1997 e 2000).

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho, objetivou-se avaliar a reação de isolinhas de feijão quanto à resistência a diferentes patótipos de *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* e *P. griseola*. Essas isolinhas foram desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, com o intuito de obter um cultivar de feijão “tipo carioca” resistente à ferrugem, à antracnose e à mancha-angular. Para essa avaliação, conduziram-se inoculações artificiais de 10 patótipos de *U. appendiculatus*, 18 patótipos de *C. lindemuthianum* e seis isolados de *P. griseola*, pertencentes a quatro patótipos.

Das isolinhas avaliadas quanto à resistência à ferrugem, duas apresentaram-se homozigotas resistentes a todos os 10 patótipos inoculados, constituindo-se, assim, em excelentes materiais genéticos para continuidade do programa de melhoramento visando à piramidização dos genes de resistência à ferrugem. As demais isolinhas são boas, necessitando apenas de autofecundação e seleção para RR.

A isolinha ON-25-99, derivada do cruzamento entre Rudá x Ouro Negro e classificada como resistente à ferrugem, apresentou-se homozigota resistente a 15 patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum*, heterozigota para o patótipo 87-531 e suscetível aos patótipos 64-458 e 65-400. Enquanto, a isolinha ON-48-99, também resistente à ferrugem, mostrou-se homozigota resistente a 13 patótipos, heterozigota para os patótipos 83-501, 87-531 e 343-506 e suscetível aos patótipos 64-458 e 65-400, à isolinha TO-41-5-6-24, do cruzamento entre Rudá x TO, apresentou o melhor comportamento dentro deste retrocruzamento, sendo homozigota resistente a 17 patótipos e heterozigota para o patótipo 343-506 de *Colletotrichum lindemuthianum*. A isolinha AB-74-1-18 do retrocruzamento entre Rudá x AB 136 apresentou o melhor comportamento dentro deste retrocruzamento, sendo homozigota resistente a 15 patótipos e heterozigota para os patótipos 64-458, 119-481 e 343-506.

Das isolinhas avaliadas quanto à resistência à mancha-angular, uma apresentou-se homozigota resistente a todos os seis isolados inoculados, constituindo-se, assim, em excelente material genético para dar continuidade ao programa de melhoramento visando à piramidização de genes de resistência à mancha-angular.

As melhores isolinhas de cada subprograma poderão ser intercruzadas para piramidização de genes de resistência à ferrugem, à antracnose e à mancha-angular no *background* “carioca” Rudá, ou ser enviadas a ensaios preliminares de linhagens para serem avaliadas e posteriormente recomendadas como cultivar Rudá resistente a essas doenças. Outra grande possibilidade de uso dessas isolinhas está na sua utilização como

genitores em programa de melhoramento, principalmente os que visam à melhoria em resistência e produção.

## CAPÍTULO 4

### CARACTERIZAÇÃO DE ISOLINHAS DE FEIJOEIRO COM MARCADORES MOLECULARES LIGADOS À RESISTÊNCIA A DIFERENTES PATÓTIPOS DE FERRUGEM, AN TRACNOSE E MANCHA-ANGULAR

#### 1. INTRODUÇÃO

Cultivares comerciais de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) apresentam, em geral, características agronômicas, culinárias, nutricionais e comerciais com boa aceitação pelos produtores e consumidores. No entanto, algumas doenças causam severas perdas à cultura do feijoeiro. Várias estratégias de melhoramento estão sendo utilizadas para incorporar resistência a uma série de patógenos que atacam esta cultura, bem como tornar a resistência mais duradoura.

A piramidização, que consiste na combinação ou introdução de diferentes genes de resistência em um único cultivar, é uma estratégia de melhoramento genético que tem sido sugerida para aumentar a durabilidade e o espectro de resistência a doenças. Uma das etapas importantes no processo de piramidização de genes de resistência tem sido a caracterização do material genético que está sendo melhorado no final de cada etapa do processo de melhoramento.

Uma estratégia que tem sido adotada é o uso de marcadores moleculares como ferramenta para monitorar a transferência dos genes de resistência e auxiliar no entendimento das relações alélicas entre as fontes de resistência envolvidas no programa. No projeto de melhoramento do feijoeiro que visa ao desenvolvimento de cultivares resistentes à ferrugem (causada por *Uromyces appendiculatus*), à antracnose (causada por *Colletotrichum lindemuthianum*) e à mancha-angular (causada por *Phaeoisariopsis griseola*) em desenvolvimento no BIOAGRO/UFV, foram identificados marcadores moleculares ligados aos genes de resistência a essas doenças em cada cruzamento.

O programa foi conduzido em quatro subprogramas paralelos de retrocruzamento (um para ferrugem, um para mancha -angular e dois para antracnose), de forma a se obterem isolinhas resistentes e contrastantes para a resistência em cada cruzamento (Capítulo 1). Além disso, é importante a caracterização molecular (obter informação da presença ou ausência dos marcadores) das várias isolinhas para outros genes de resistência de interesse deste programa. Esse programa de melhoramento tem possibilitado, ainda, a obtenção de isolinhas contrastantes para resistência a essas doenças, as quais constituem excelente material genético para trabalhos de biologia molecular visando à clonagem de genes associados ao processo de resistência a essas doenças, bem como ao entendimento da interação molecular planta-patógeno.

Este trabalho teve como objetivo verificar se os marcadores moleculares previamente identificados para resistência à ferrugem, à antracnose e à mancha -angular permaneceram ligados aos locos de resistência nas isolinhas selecionadas em cada subprograma, como também caracterizar molecularmente essas isolinhas quanto a outros locos de resistência, por meio de análise com marcadores moleculares fortemente ligados a esses locos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material genético

A caracterização molecular foi realizada utilizando isolinhas mais próximas ao genitor recorrente, selecionadas com base em marcadores RAPD e obtidas em todos os retrocruzamentos. Como controle foram incluídas as isolinhas suscetíveis a cada uma das três doenças estudadas (Quadro 1).

Quadro 1 - Isolinhas homozigotas para a resistência à ferrugem, à antracnose e à mancha-angular selecionadas com base em marcadores RAPD

Retrocruzamentos			
1 - Ouro Negro x Rudá	2 - TO x Rudá	3 - AB 136 x Rudá	4 - AND 277 x Rudá
Isolinhas	Isolinhas	Isolinhas	Isolinhas
06-99	41-5-1-1	74-1-3	7-2-9-4-6
25-99	41-5-2-5	74-1-9	7-2-9-4-10
43-99	41-5-6-4	74-1-10	7-2-9-7-10
45-99	41-5-6-24	74-1-13	7-2-9-4-11*
48-99	41-5-6-13*	74-1-16	7-2-9-7-3*
01-99*	368-1-3-2*	74-1-18	7-2-9-4-14*
10-99*	41-5-2-7*	76-1-1*	
16-99*		76-1-3*	
		74-1-2*	

\* Isolinhas suscetíveis-controle.

## **2.2. Caracterização molecular**

### **2.2.1. Extração do DNA**

Coletaram-se folhas de cada isolinha e dos genitores, as quais foram armazenadas em “freezer” a  $-80^{\circ}\text{C}$  até serem utilizadas para extração do DNA. Essa extração foi feita de acordo com o protocolo de DOYLE e DOYLE (1990), com algumas modificações propostas por ABDELNOOR et al. (1995).

### **2.2.2. Amplificação pela técnica de RAPD**

Amostras de DNA e genitores e isolinhas foram amplificadas pela técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), de acordo com WILLIAMS et al. (1990). Os *primers* foram adquiridos na “Operon Technologies” (Alameda, CA, EUA).

As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 25  $\mu\text{l}$ , contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, 100  $\mu\text{M}$  de cada um dos desoxinucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4  $\mu\text{M}$  de um *primer*, uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 25 ng de DNA. Os *primers* utilizados são os descritos no Quadro 2. As amplificações foram efetuadas em termociclador Perkin-Elmer Cetus, modelo 9600, programado para 40 ciclos, cada um constituído da seguinte seqüência: 15 segundos a  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 segundos a  $35^{\circ}\text{C}$  e um minuto a  $72^{\circ}\text{C}$ . Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de sete minutos a  $72^{\circ}\text{C}$  e, finalmente, a temperatura foi reduzida a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Após a amplificação foram adicionados, a cada amostra, 3  $\mu\text{l}$  do corante tipo IV (0,25% de azul-de-bromofenol e 60% de glicerol). Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), contendo brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) e submerso em tampão TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi de quatro horas aproximadamente, a 100 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, no sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

### **2.2.3. Amplificação pela técnica de SCAR**

Amostras de DNA do material genético descrito no Quadro 1 foram amplificadas pela técnica de SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*)

em mistura de reação de 25 µL contendo as mesmas concentrações de reagentes utilizadas nos ensaios RAPD, exceto no *primer*, que foi substituído por cinco picomoles de cada *primer* específico. O termociclador foi programado para um passo inicial de 94°C por três minutos; 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 72°C por um minuto e 30 segundos; e um passo final de 72°C por sete minutos.

#### **2.2.4. Amplificação utilizando SSR**

Amostras de DNA do material genético descrito no Quadro 1 foram amplificadas pela técnica de SSR (*Simple Sequence Repeats*), empregando-se *primers* de microssatélites desenhados para soja (“Research Genetics, MapPairs Soybean”, Ca. No. 29515, EUA). As reações foram realizadas de acordo com ROUTMAN e CHEVERUD (1994), com modificações: 1) a mistura de reação foi semelhante à dos marcadores SCAR, exceto a concentração de nucleotídeos, que foi de 625 µM; 2) a eletroforese foi em gel de agarose comum 3%; e 3) as reações foram colocadas em termociclador programado para 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 50°C por um minuto e 72°C por dois minutos e um passo final a 72°C por sete minutos.

## 2.2.5. Marcadores moleculares utilizados

Para confirmar presença ou ausência das bandas de resistência nas isolinhas resistentes e contrastantes para resistência, foram analisados marcadores moleculares estreitamente ligados a genes de resistência do feijoeiro-comum a ferrugem, antracnose e mancha-angular (Quadro 2).

Quadro 2 - Marcadores RAPD ligados a genes de resistência do feijoeiro-comum a ferrugem, antracnose e mancha-angular

Marcador RAPD	Distância (cM) e Fase	Gene de Resistência	Doença	Fonte de Resistência	Referência
OPY20 <sub>830a</sub>	0,0 – acoplamento	<i>Co-4</i>	Antracnose	TO	ALZATE-MARIN et al. (1999a)
OPC8 <sub>900a</sub>	9,7 – acoplamento	<i>Co-4</i>	Antracnose	TO	ALZATE-MARIN et al. (1999a)
OPB3 <sub>1800r</sub>	3,7 – repulsão	<i>Co-4</i>	Antracnose	TO	ALZATE-MARIN et al. (1999a)
OPAZ20 <sub>940a</sub>	7,1 – acoplamento	<i>Co-6</i>	Antracnose	AB 136	ALZATE-MARIN et al. (1999a)
OPAZ4 <sub>560a</sub>	8,5 – acoplamento	<i>Co-6</i>	Antracnose	AB 136	ALZATE-MARIN et al. (1999c)
OPAZ9 <sub>950r</sub>	20,4 – repulsão	<i>Co-6</i>	Antracnose	AB 136	ALZATE-MARIN et al. (1999c)
SCAR <sup>F</sup> 10 <sub>1050a</sub>	6,9 – acoplamento	Não identificado	Ferrugem	Ouro Negro	CORRÊA et al. (1998)
SCAR <sup>BA</sup> 8 <sub>560a</sub>	6,0 – acoplamento	Não identificado	Ferrugem	Ouro Negro	CORRÊA (1999)
OAPJ18 <sub>560a</sub>	11,1 – acoplamento	Não identificado	Ferrugem	Ouro Negro	CORRÊA (1999)
OPX11 <sub>550a</sub>	5,8 – acoplamento	Não identificado	Ferrugem	Ouro Negro	FALEIRO et al. (2000a)
Satt174	4,1 – acoplamento	Não identificado	Ferrugem	Ouro Negro	COSTA et al. (1999)
OPH13 <sub>490a</sub>	5,5 – acoplamento	<i>Phg-1</i>	Mancha-angular	AND277	CARVALHO et al. (1998)
OPAA19 <sub>400a</sub>	10,0 – acoplamento	Resistência ao patótipo 63-39	Mancha-angular	Ouro Negro	CORRÊA (1999)

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 3 estão apresentados os resultados das análises da presença ou ausência dos marcadores moleculares estreitamente ligados aos locos de resistência, em isolinhas desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV.

No cruzamento 1, os marcadores ScarOBA08<sub>560a</sub>, OPX11<sub>550a</sub>, ScarF10<sub>1050a</sub> e Satt174 permaneceram marcando o gene originalmente, presente no genitor Ouro Negro transferido para o cultivar Rudá (Quadro 3). De certa forma, a ausência de banda do marcador OPAA19<sub>400a</sub> nas isolinhas provenientes do retrocruzamento envolvendo o genitor Ouro Negro já era esperada, uma vez que este foi identificado para resistência à mancha-angular.

No cruzamento 2, os marcadores OPY20<sub>830a</sub> e OPB03<sub>1800r</sub> marcaram o gene *Co-4* transferido para o cultivar Rudá. Entretanto, o marcador OPC08<sub>900a</sub> não estava mais presente nas isolinhas resistentes. Tal constatação evidencia a eficiência do uso de marcadores moleculares para seleção de isolinhas mais próximas ao genitor recorrente; um *crossing-over* entre o marcador e o gene de resistência é a causa mais provável da ausência desse marcador. No cruzamento 3 foram testados três marcadores estreitamente ligados ao gene *Co-6*, entretanto apenas o marcador OPAZ20<sub>940r</sub> continuou apresentando a banda de resistência, enquanto os marcadores OPAZ04<sub>560a</sub> e OPAZ09<sub>950a</sub> não estavam mais marcando o gene de resistência. Tal resultado tem conclusão semelhante ao que foi apresentado no retrocruzamento 2, ou seja, esses marcadores não foram usados para monitorar os diversos ciclos de retrocruzamento, e perdeu-se essa marca durante o processo de recuperação do genótipo recorrente.

Quadro 3 - Análise da presença/ausência dos marcadores moleculares ligados a genes de resistência à ferrugem, à antracnose e à mancha-angular

Marcadores	Genitores					Rudá x Ouro Negro					Rudá x TO					Rudá x AB 136					Rudá x AND 277																
	Rudá	Ouro Negro	TO	AB 136	AND 277	06-99	25-99	43-99	45-99	48-99	01-99*	10-99*	16-99*	41-5-1-1	41-5-2-5	41-5-6-4	41-5-6-24	41-5-6-13*	368-1-3-2*	41-5-2-7*	74-1-3	74-1-9	74-1-10	74-1-13	74-1-16	74-1-18	76-1-1*	76-1-3*	74-1-2*	7-2-9-4-6	7-2-9-4-10	7-2-9-7-10	7-2-9-4-11*	7-2-9-7-3*	7-2-9-4-14*		
OPAA19	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

<b>OPAZ20</b>	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 1 1 0 0 0	0 0 0 0 0 0
OPAJ18	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
OPAZ04	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
OPAZ09	1 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
<b>OPB03</b>	1 1 0 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1	0 0 0 0 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1
OPC08	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 0	0 0 0 0 0 0
<b>OPH13</b>	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 1 1 0 0 0
<b>ScarBA08</b>	0 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 0 0 0 0 0
<b>ScarF10</b>	0 1 0 1 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 0 0 0 0 0
<b>OPX11</b>	0 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 0 0 0 0 0
<b>OPY20</b>	0 0 1 0 0	0 0 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
<b>Satt174</b>	0 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 0 0 0 0 0

\* - Isolinhas suscetíveis-controle.

1 - Presença do marcador.

0 - Ausência do marcador.

No cruzamento 4 foi testado apenas o marcador OPH13<sub>490a</sub> quanto ao gene de resistência à mancha-angular, presente no cultivar AND 277. Esse marcador mostrou-se presente nas isolinhas resistentes e ausente nas suscetíveis, constituindo-se em excelente ferramenta para seleção indireta para resistência à mancha-angular. A perda de marcadores mais distantes indica que o genoma recorrente foi bem recuperado.

A amplificação com marcadores ligados a genes de resistência em isolinhas contrastantes para resistência confirma o grande potencial de utilização desses marcadores no processo de piramidização de genes de resistência no *background* genético Rudá, permitindo a seleção indireta de genes de resistência. Observou-se que marcadores mais próximos dos genes de resistência estavam presentes, enquanto aqueles mais distantes sofreram recombinação (Quadro 4). Marcadores ligados aos genes de resistência apresentaram grande facilidade e precisão na seleção de indivíduos resistentes, como pode ser verificado na Figura 1. FALEIRO et al. (2000b), usando os marcadores OPX11 e OPF10 simultaneamente na seleção de indivíduos resistentes à ferrugem, encontraram eficiência de seleção de 100%. O uso de marcadores na fase de intercruzamento, em programa de melhoramento, visando à piramidização de genes de resistência é de vital importância, uma vez que, adotando-se estratégias convencionais de melhoramento, este processo torna-se extremamente difícil, necessitando de inoculações múltiplas e podendo levar a erros na avaliação dos sintomas das doenças (VINHADELLI et al., 1997).

A amplificação com marcadores ligados a genes de resistência confirmou que as isolinhas contrastantes obtidas constituem excelente material genético para trabalhos de biologia molecular visando à clonagem de genes associados ao processo de resistência a essa doença, bem como ao entendimento da interação molecular planta-patógeno.

Quadro 4 - Análise da presença/ausência dos marcadores moleculares ligados a genes de resistência à ferrugem, à antracnose e à mancha-angular e seu potencial de uso na piramidização de genes de resistência

Locus	Genitor		Isolinhas		Distância cM	Uso
	Doador	Recorrente	Resistentes	Suscetíveis		
OPY20 <sub>830</sub>	1	0	1	0	0,0	Sim
OPB03 <sub>1800</sub>	0	1	0	1	3,7	Sim

Satt174	1	0	1	0	4,1	Sim
OPH13 <sub>490</sub>	1	0	1	0	5,5	Sim
OPX11 <sub>550</sub>	1	0	1	0	5,8	Sim
SCARBA08 <sub>560</sub>	1	0	1	0	6,0	Sim
SCARF10 <sub>1050</sub>	1	0	1	0	6,9	Sim
OPAZ20 <sub>940</sub>	1	0	1	0	7,1	Sim
OPAZ04 <sub>560</sub>	1	0	0	0	8,5	Não
OPC08 <sub>900</sub>	1	0	0	0	9,7	Não
OPAA19 <sub>400</sub>	1	0	0	0	10,0	Não
OPAJ18 <sub>560</sub>	1	0	0	0	11,1	Não
OPAZ09 <sub>950</sub>	0	1	1	1	20,4	Não

1 - Presença do marcador e 0 - Ausência do marcador.

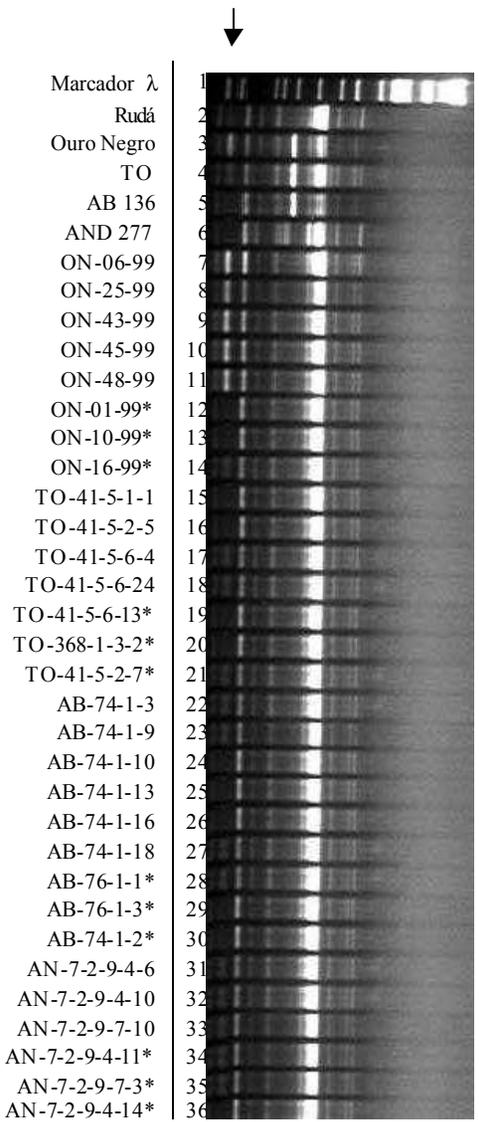


Figura 1 - Produto da amplificação com o *primer* OPX-11. A primeira coluna contém DNA de fago lambda digerido com *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII* (marcadores de peso molecular). Os genitores estão representados nas colunas 2 a 5, seguidos das isolinhas de cada retrocruzamento. Colunas assinaladas com asterisco indicam isolinhas suscetíveis e colunas sem asterisco, isolinhas resistentes. A seta indica o marcador OX-11<sub>630a</sub>.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Objetivando a caracterização molecular das isolinhas de feijoeiro obtidas no Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, que visa à transferência de genes de resistência à ferrugem, à antracnose e à mancha-angular no cultivar de feijoeiro Rudá, marcadores moleculares foram empregados na verificação da presença ou ausência de marcadores. O DNA das folhas de todas as isolinhas selecionadas e dos cinco genitores envolvidos foi extraído, quantificado e amplificado com marcadores previamente identificados e primeiramente ligados a esses genes. Dos 13 marcadores identificados, apenas oito apresentaram utilidade para dar continuidade ao processo de piramidização dos genes de resistência à ferrugem, à antracnose e à mancha-angular no cultivar Rudá. Os cinco restantes não apresentaram mais utilidade para o processo de piramidização, uma vez que perderam a sua associação com os genes de resistência. Essa ausência da marca deve-se à ocorrência de *crossing-over* entre o gene de resistência e o marcador molecular. Tal recombinação ocorreu durante o processo de recuperação do genótipo do genitor recorrente na realização dos vários ciclos de retrocruzamentos.

Os marcadores moleculares identificados e presentes nas isolinhas selecionadas irão possibilitar o uso de seleção assistida por marcadores no processo de piramidização de genes de resistência no programa de melhoramento do feijoeiro visando à resistência a doenças. Com o auxílio de marcadores, os genes de resistência poderão ser facilmente monitorados no desenvolvimento de um cultivar com resistência a uma gama ampla de patógenos.

Os resultados obtidos confirmam o grande potencial de uso dos marcadores moleculares na seleção de indivíduos mais próximos ao genitor recorrente em programas de retrocruzamento, bem como constitui-se em excelente ferramenta para auxiliar na piramidização de vários genes de resistência em um único genótipo sem a necessidade de múltiplas inoculações e, ou, inoculações sequenciais. Possibilita, ainda, a seleção de isolinhas contrastantes para a resistência a determinada doença, visando entender o relacionamento entre patógeno e hospedeiro.

## CAPÍTULO 5

### ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS GENÉTICOS, CORRELAÇÕES GENOTÍPICAS, FENOTÍPICAS E AMBIENTAIS, COMPARAÇÃO ENTRE MÉDIAS E ANÁLISE DE TRILHA EM NIL'S DE FEIJOEIROS RESISTENTES A FERRUGEM, ANTRACNOSE E MANCHA-ANGULAR

#### 1. INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) destaca-se, no país, por sua importância econômica e, sobretudo, social, sendo o Brasil o maior produtor e consumidor mundial de feijão. Seu alto valor alimentar e amplo consumo por parte da população brasileira justificam a pesquisa visando obter melhores níveis de produtividade. O trabalho de melhoramento exige do melhorista contínua avaliação fenotípica do material genético que está sendo gerado pelo programa.

A manifestação fenotípica é o resultado da ação do genótipo sob influência do meio. Por isso, na execução de um programa de melhoramento, no contexto da genética quantitativa é de fundamental importância o conhecimento de uma série de informações do material genético que está sendo gerado. A estimação de parâmetros genéticos, a quantificação da variabilidade genética e o estudo de correlações entre diferentes características de interesse são fundamentais e assumem grande importância, principalmente quando o melhorista exerce seleção na população e esta promove modificações em outras características correlacionadas (RAMALHO et al., 1979).

O conhecimento dos coeficientes de correlação é requisito básico quando se objetiva quantificar a magnitude e direção das influências de determinada característica sobre outra ou quando se pretende melhorar várias características simultaneamente (CRUZ e REGAZZI, 1997). Apesar da grande importância das correlações, a quantificação e a interpretação dos coeficientes podem, contudo, resultar em equívocos

na estratégia de seleção, pois alta correlação entre dois caracteres pode ser resultado do efeito indireto de um terceiro ou de um grupo de caracteres (CARVALHO et al., 1999).

Nesse sentido, é importante que os coeficientes de correlação sejam desmembrados em componentes de efeitos diretos e indiretos, o que é feito pela análise de trilha, desenvolvida por WRIGHT (1921) e pormenorizada por LI (1975) e CRUZ e REGAZZI (1997). A análise de trilha (ou "path analysis") consiste no estudo dos efeitos diretos e indiretos de caracteres sobre uma variável principal, normalmente a produção, cujas estimativas são obtidas por meio de equações de regressão, em que as variáveis são previamente padronizadas (CRUZ e REGAZZI, 1997).

O presente trabalho teve como objetivo obter informações sobre um conjunto de 18 isolinhas ou linhas quase isogênicas (NIL's) e sete linhagens e cultivares comerciais de feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), por meio da estimação de diferentes parâmetros genéticos e correlações fenotípicas, genotípicas e ambientais quanto a diferentes características agrônômicas. Procurou-se, também, verificar os efeitos diretos e indiretos, bem como as associações entre componentes primários de produção e a produção de grãos, mediante o uso da análise de trilha.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material genético**

Foram instalados, no ano 2000, dois ensaios de competição entre 18 NIL's desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV. Como testemunhas foram utilizados os cultivares Pérola e Aporé e os genitores envolvidos nesse programa (Ouro Negro, TO, AB 136 e AND 277), totalizando 25 genótipos.

### **2.2. Ensaio de campo**

O primeiro ensaio foi conduzido nos meses de março a julho, enquanto o segundo foi realizado nos meses de julho a novembro. Nos dois ensaios, foram utilizados como adubação de plantio 600 kg/ha do formulado 4-14-8 (N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O). Além disso, 200 kg/ha de sulfato de amônio foram aplicados em cobertura, cerca de 25 dias após a emergência. Foi aplicado também pulverização foliar com molibdato de sódio (40 g/ha).

O controle de insetos, a irrigação e outros tratamentos culturais foram realizados, observando-se sempre a necessidade da cultura e as épocas apropriadas.

### **2.2.1. Delineamento experimental**

Nos ensaios, foi utilizado o delineamento em blocos completos casualizados com testemunhas adicionais, com quatro repetições. Em cada bloco foram avaliadas 18 isolinhas e as testemunhas adicionais (cultivares Rudá, Pérola, Aporé, Ouro Negro, TO, AB 136 e AND 277).

No primeiro ensaio, cada parcela foi constituída de uma fileira com 6 m de comprimento, espaçadas 50 cm, com cerca de 17 sementes por metro de fileira. No segundo ensaio, cada parcela foi constituída de duas fileiras com 2 m de comprimento, com igual espaçamento entre parcelas e igual número de plantas por metro em relação ao primeiro ensaio. Em ambos os ensaios, utilizou-se um cultivar comercial como bordadura externa.

### **2.2.2. Caracteres avaliados**

Foram avaliados os seguintes caracteres:

Dias para Floração (FLOR) - Número total de dias decorridos do plantio até a floração.

Dias para Maturação (MAT) - Número total de dias decorridos do plantio até a maturação.

Altura de Plantas (ALT) - Altura média, em cm, das plantas na parcela no estádio R8.

Produção por Parcela (PRPA) - Peso total das sementes de cada parcela.

Peso de 100 Sementes (P100) - Peso médio em gramas.

Número de Sementes/Vagens (SEVAG) - Número médio de sementes por vagens.

Número de Vagens/Planta (VGPLA) - Número médio de vagens por planta.

### 2.3. Análises de variância individual

A análise de variância foi feita de todas as características, em cada ensaio individualmente, a fim de avaliar a existência de variabilidade genética significativa entre os tratamentos. O modelo estatístico adotado foi o seguinte:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + \varepsilon_{ij}$$

em que

$Y_{ij}$  = produção média por planta do  $i$ -ésimo tratamento no  $j$ -ésimo bloco;

$\mu$  = média geral;

$T_i$  = efeito do  $i$ -ésimo tratamento ( $i = 1, 2, \dots, g+t$ ), sendo  $g$  o número de isolinhas (18) e  $t$  o número de testemunhas (7);

$B_j$  = efeito do  $j$ -ésimo bloco ( $j = 1, 2, \dots, r$ ); e

$\varepsilon_{ij}$  = erro aleatório,  $\varepsilon_{ij} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$ .

O esquema da análise de variância e as esperanças dos quadrados médios são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 - Esquema da análise de variância e esperanças de quadrados médios do modelo em blocos completos casualizados com testemunhas adicionais

FV	GL	QM	E(Q.M.)	F
Blocos	$r-1$			
Tratamentos (Tr)	$(g+t)-1$	QMtr	$\sigma^2 + r\phi_{tr}$	QMtr/QMe
Linhagens (G)	$g-1$	QMg	$\sigma^2 + r\phi_g$	QMg/QMe
Testemunhas (Te)	$t-1$	QMte	$\sigma^2 + r\phi_{te}$	QMte/QMe
G vs Te	1	QMgt		QMgt/QMe
Erro	$(r-1)(g+t-1)$	QMe	$\sigma^2$	

$\phi_{tr}, \phi_g, \phi_{te}$  = componentes quadráticos associados aos efeitos de tratamento, linhagens e testemunhas, respectivamente, sendo

$$\phi_{tr} = \frac{\sum_{i=1}^{g+t} T_i^2}{g+t-1}, \phi_g = \frac{\sum_{i=1}^g G_i^2}{g-1}, \phi_{te} = \frac{\sum_{i=g+1}^{g+t} Te_i^2}{t-1}$$

A soma de quadrados de tratamentos foi decomposta em soma de quadrados de isolinhas (ou linhagens), soma de quadrados de testemunhas e soma de quadrados de grupos (isolinhas vs testemunhas). Como o interesse deste trabalho é a comparação das médias entre os tratamentos, os efeitos de tratamentos foram assumidos como fixos.

### 2.4. Análises de variância conjunta

A análise de variância conjunta, usando-se os dois ensaios simultaneamente, foi feita de todas as características, a fim de avaliar a existência de variabilidade

genética significativa entre as isolinhas e a interação destas com o ambiente. O modelo estatístico adotado foi o seguinte:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + B/A_{jk} + A_j + TA_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

em que

$Y_{ijk}$  = produção média por parcela do  $i$ -ésimo tratamento, no  $j$ -ésimo ambiente, no  $k$ -ésimo bloco;

$\mu$  = média geral;

$G_i$  = efeito do  $i$ -ésimo tratamento ( $i = 1, 2, \dots, g+t$ ), sendo  $g$  o número de isolinhas (18) e  $t$  o número de testemunhas (7);

$A_j$  = efeito do  $j$ -ésimo ambiente ( $j = 1, 2$ );

$TA_{ij}$  = efeito da interação do  $i$ -ésimo tratamento com o  $j$ -ésimo ambiente;

$B/A_{jk}$  = efeito do  $k$ -ésimo bloco dentro do  $j$ -ésimo ambiente ( $k = 1, 2, \dots, r$ ); e

$\varepsilon_{ij}$  = erro aleatório,  $\varepsilon_{ij} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$ .

Como o interesse deste trabalho foi a comparação da produção entre as médias dos tratamentos nos diferentes ambientes, os efeitos de tratamentos, ambientes e tratamento x ambiente foram assumidos como fixos. Os efeitos de blocos foram considerados aleatórios. O esquema da análise de variância e as esperanças dos quadrados médios são apresentados no Quadro 2.

Quadro 2 - Esquema da análise de variância e esperanças de quadrados médios do modelo em blocos completos casualizados em dois ambientes de avaliação com testemunhas adicionais

FV	GL	QM	E(QM)	F
Blocos/Ambiente	a(r-1)	QMb		QMb/QMe
Tratamentos (Tr)	(g+t)-1	QMtr	$\sigma^2 + ar\phi_{tr}$	QMtr/QMe
Isolinhas (G)	g-1	QMg	$\sigma^2 + r\phi_g$	QMg/QMe
Testemunhas (Te)	t-1	QMte	$\sigma^2 + r\phi_{te}$	QMte/QMe
Grupo (Gr)	1	QMgr	-	QMgr/QMe
Ambiente (A)	a-1	QMa	$\sigma^2 + g\sigma_b^2 + gr\phi_a$	QMa/QMb
Tr x A	(g+t-1)(a-1)	QMtra	$\sigma^2 + r\phi_{tra}$	QMtra/QMe
G x A	(g-1)(a-1)	QMga	$\sigma^2 + r\phi_{ga}$	QMga/QMe
Te x A	(t-1)(a-1)	QMtea	$\sigma^2 + r\phi_{tea}$	QMtea/QMe
(G vs Te) x A	1	QMgra	-	QMgra/QMe
Erro	a(r-1)(g+t-1)	QMe	$\sigma^2$	

$\phi_{tr}, \phi_g, \phi_{te}, \phi_a, \phi_{tra}, \phi_{ga}, \phi_{tea}$  = componentes quadráticos associados aos efeitos de tratamento, isolinha, testemunha, ambiente, tratamento x ambiente, isolinha x ambiente e testemunha x ambiente, respectivamente, sendo

$$\phi_{tr} = \frac{\sum_{i=1}^{g+t} T_i^2}{g+t-1}, \phi_g = \frac{\sum_{i=1}^g G_i^2}{g-1}, \phi_{te} = \frac{\sum_{i=g+1}^{g+t} Te_i^2}{t-1}, \phi_a = \frac{\sum_{j=1}^a A_j^2}{a-1}, \phi_{tra} = \frac{\sum_{i=1}^{g+t} \sum_{j=1}^a TA_{ij}^2}{(g+t-1)(a-1)},$$

$$\phi_{ga} = \frac{\sum_{i=1}^g \sum_{j=1}^a GA_{ij}^2}{(g-1)(a-1)} \text{ e } \phi_{tea} = \frac{\sum_{i=g+1}^{g+t} \sum_{j=1}^a TeA_{ij}^2}{(t-1)(a-1)}$$

## 2.5. Parâmetros genéticos e seus estimadores

A partir das análises de variância de cada característica, individual e conjunta, foram obtidas as estimativas dos componentes quadráticos que expressam a variabilidade genotípica entre isolinhas ( $\hat{\phi}_g$ ), da variância fenotípica em nível de média ( $\hat{\sigma}_f^2$ ) e da variância ambiental média ( $\hat{\sigma}_e^2$ ). Os demais parâmetros genéticos estimados foram:

Coeficiente de determinação genotípico ( $h^2$ )

$$h^2 (\%) = \frac{\hat{\phi}_g}{QMG} 100$$

Coeficiente de variação experimental (CVe)

$$CVe (\%) = \frac{\sqrt{QMe}}{\bar{y}} 100$$

em que

$\bar{y}$  = média do caráter considerado.

Coeficiente de variação genético (CVg)

$$CVg (\%) = \frac{\sqrt{\hat{\phi}_g}}{\bar{y}} 100$$

Relação CVg/CVe

$$\frac{CVg}{CVe} = \sqrt{\frac{\hat{\phi}_g}{\hat{\sigma}_e^2}}$$

## 2.6. Comparação entre médias

### 2.6.1. Teste de Tukey

O teste de Tukey foi utilizado para avaliar as diferenças significativas entre as médias da PRPA dos tratamentos. Foram testados todos e quaisquer contrastes entre médias pela seguinte fórmula:

$$\Delta = f(\alpha, n_1, n_2) \sqrt{\frac{QMR}{2} \left( \frac{1}{r} + \frac{1}{r} \right)}$$

em que

$f$  = valor tabelado obtido em função de  $(\alpha, n_1, n_2)$ ;

$\alpha$  = nível de significância;

$n_1$  = número de tratamentos;

$n_2$  = número de grau de liberdade para resíduo; e

$r$  = número de repetições;

Seja  $\hat{C} = \hat{m}_i - \hat{m}_u$

Tomada de decisão:

Todo  $|\hat{C}| \geq \Delta$  : contraste significativo (estatisticamente  $\neq 0$ ).

Todo  $|\hat{C}| < \Delta$  : contraste não-significativo (estatisticamente nulo).

### 2.6.2. Teste de Dunnett

Esse teste foi realizado visando comparar determinado tratamento–padrão (testemunhas) e cada um dos demais tratamentos (isolinhas), não havendo interesse na comparação dos demais tratamentos entre si. Foram testados os contrastes (testemunhas e isolinhas) entre duas médias pela fórmula

$$d' = f(\alpha, n_1, n_2) \sqrt{QMR \left( \frac{1}{r_i} + \frac{1}{r_p} \right)}$$

em que

$f$  = valor tabelado obtido em função de  $(\alpha, n_1, n_2)$ ;

$\alpha$  = nível de significância;

$n_1$  = número de grau de liberdade para tratamento;

$n_2$  = número de grau de liberdade para resíduo;

$r_i$  = número de repetições da isolinha; e

$r_p$  = número de repetições da testemunha.

Seja  $\hat{C} = \hat{m}_i - \hat{m}_p$

Todo  $|\hat{C}| \geq d'$  significativo, indicando que a média da testemunha (ou padrão) difere significativamente da média do tratamento (isolinha) com ela comparado.

Todo  $|\hat{C}| < d'$  não-significativo, indicando que as médias desse contraste não diferem entre si.

### 2.7. Coeficientes de correlações genóticas, fenotípicas e ambientais

Primeiramente, foram obtidos os produtos médios entre os vários caracteres analisados, utilizando o método relatado por KEMPTHORNE (1966). A partir dessas análises, foram obtidas as estimativas das covariâncias genotípica, fenotípica e ambiental entre os caracteres dois a dois e, finalmente, os coeficientes de correlação, como segue:

Coeficiente de correlação genotípica ( $r_g$ )

$$r_g = \frac{C\hat{v}_g(X, Y)}{\sqrt{\hat{\phi}_{g(X)} \cdot \hat{\phi}_{g(Y)}}}$$

Coeficiente de correlação fenotípica ( $r_f$ )

$$r_f = \frac{C\hat{ov}_f(X, Y)}{\sqrt{\hat{\sigma}_{f(X)}^2 \cdot \hat{\sigma}_{f(Y)}^2}}$$

Coefficiente de correlação ambiental ( $r_a$ )

$$r_a = \frac{C\hat{ov}_a(X, Y)}{\sqrt{\hat{\sigma}_{(X)}^2 \cdot \hat{\sigma}_{(Y)}^2}}$$

em que

$C\hat{ov}_g(X, Y)$ ,  $C\hat{ov}_f(X, Y)$  e  $C\hat{ov}_a(X, Y)$  = estimadores das covariâncias genotípica, fenotípica e ambiental, respectivamente, entre dois caracteres X e Y;

$\hat{\phi}_{g(X)}$ ,  $\hat{\sigma}_{f(X)}^2$  e  $\hat{\sigma}_{(X)}^2$  = estimadores do componente quadrático, que expressa a variabilidade genotípica, e das variâncias fenotípica e ambiental, respectivamente, do carácter X; e

$\hat{\sigma}_{g(Y)}^2$ ,  $\hat{\sigma}_{f(Y)}^2$  e  $\hat{\sigma}_{(Y)}^2$  = estimadores do componente quadrático, que expressa a variabilidade genotípica, e das variâncias fenotípica e ambiental, respectivamente, do carácter Y.

## 2.8. Análise de trilha

Na análise de trilha foram avaliados a produção por parcela (Y); seus componentes primários - peso de 100 sementes ( $P_1$ ), número médio de sementes por vagem ( $P_2$ ) e número médio de vagens por planta ( $P_3$ ) - e alguns componentes secundários, como número de dias até o florescimento ( $S_4$ ), número de dias até a maturação ( $S_5$ ) e altura de plantas ( $S_6$ ).

### 2.8.1. Diagrama causal único

Realizou-se, preliminarmente, estudo dos efeitos diretos e indiretos dos componentes primários sobre a produção por parcela, em diagrama de trilha, de cada ambiente. Com base na metodologia da análise dos coeficientes de trilha, desenvolvida por WRIGHT (1921) e pormenorizada por LI (1975) e CRUZ e REGAZZI (1997), os coeficientes de correlação genotípica foram desdobrados em efeitos diretos e indiretos sobre a produção por parcela.

Para obtenção dos coeficientes de trilha, foram considerados os seguintes princípios estatísticos: sendo Y o carácter complexo, resultante da ação conjunta de outros caracteres estudados ( $X_1, X_2, \dots, X_n$ ), então é possível estabelecer o modelo

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n + \varepsilon$$

Para análise de trilha, os dados de cada carácter em estudo são padronizados, através da divisão de seu desvio, em relação à média, pelo respectivo desvio-padrão, fazendo-se com que a variância dos caracteres padronizados seja igual à unidade e a média seja zero. Desse modo, tem-se

$$y = \frac{Y - \bar{Y}}{\hat{\sigma}_y}, x_i = \frac{X_i - \bar{X}_i}{\hat{\sigma}_{x_i}}, u = \frac{\varepsilon}{\hat{\sigma}_y}, p_\varepsilon = \frac{\hat{\sigma}_\varepsilon}{\hat{\sigma}_y} \text{ e } p_i = \frac{\beta_i \hat{\sigma}_{x_i}}{\hat{\sigma}_y}$$

então

$$y = p_1x_1 + p_2x_2 + \dots + p_nx_n + p_\epsilon u$$

Por esse modelo, estimaram-se os efeitos diretos e indiretos dos caracteres explicativos sobre o caráter principal, considerando a produção por parcela. Os coeficientes de trilha foram estimados a partir do sistema de equações  $X'X\hat{\beta} = X'Y$ , sendo

$$X'Y = \begin{bmatrix} r_{01} \\ r_{02} \\ \dots \\ r_{0n} \end{bmatrix}; \quad X'X = \begin{bmatrix} 1 & r_{12} & \dots & r_{1n} \\ r_{12} & 1 & \dots & r_{2n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ r_{1n} & r_{2n} & \dots & 1 \end{bmatrix} \quad \text{e} \quad \hat{\beta} = \begin{bmatrix} p_1 \\ p_2 \\ \dots \\ p_n \end{bmatrix}$$

Assim, tem-se

$$r_{0i} = p_i + \sum_{j \neq i}^n p_j r_{ij}$$

em que

$r_{0i}$  = correlação genotípica entre o caráter principal e o  $i$ -ésimo caráter explicativo;

$p_i$  = efeito direto do caráter explicativo  $i$  sobre o principal; e

$p_j r_{ij}$  = efeito indireto do caráter explicativo  $i$ , via caráter explicativo  $j$ , sobre o principal.

Neste trabalho, os coeficiente de trilha foram calculados com base na matriz de correlações genotípicas. Foram também calculados o coeficiente de determinação do diagrama de trilha ( $R^2$ ) e o efeito residual ( $\hat{p}_\epsilon$ ), com base nos seguintes estimadores:

$$R^2 = p_1 r_{1y} + p_2 r_{2y} + \dots + p_n r_{ny}$$

$$\hat{p}_\epsilon = \sqrt{1 - R^2}$$

A análise de trilha e do desdobramento das correlações genotípicas em efeitos diretos e indiretos dos caracteres explicativos sobre a produção por planta foi feita com base no diagrama causal apresentado na Figura 1.

Para evitar problemas de multicolinearidade nas matrizes de correlações utilizadas na análise de trilha, foi realizado o diagnóstico de multicolinearidade. Para quantificar o grau de multicolinearidade da matriz  $X'X$  utilizada na análise de trilha, foram empregados os critérios indicados por MONTGOMERY e PECK (1981), que se baseiam nos valores do determinante e do número de condição (NC = razão entre o maior e o menor autovalor) dessas matrizes. Para detectar e eliminar os caracteres que contribuíram para o aparecimento da multicolinearidade e tinham pouca importância na explicação do modelo foi feita a análise dos elementos dos autovetores associados aos autovalores das matrizes de correlações, conforme descrito por BELSLEY et al. (1980).

O diagnóstico de multicolinearidade, a análise de variância, a estimação dos parâmetros genéticos, as correlações e a análise de trilha foram feitos com o auxílio do Programa GENES (CRUZ, 1997).

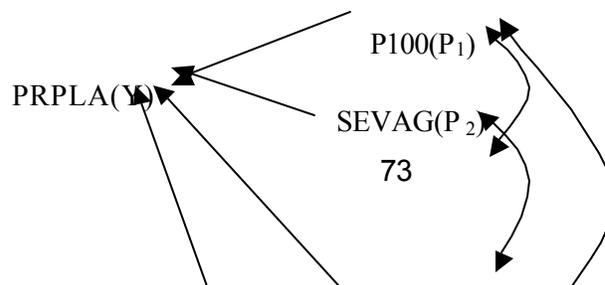


Figura 1 - Diagrama causal indicando o inter-relacionamento dos caracteres explicativos (P100, SEVAG e VGPLA) e residual (u) sobre o caráter principal (produção por parcela). As setas unidirecionais indicam efeito direto de cada caracter explicativo ( $p_{0i}$ ), enquanto as setas bidirecionais representam a interdependência de duas variáveis explicativas, cuja magnitude é quantificada pela correlação genotípica ( $r_{ij}$ ).

## 2.8.2. Diagrama em cadeia

Outro estudo de grande interesse no melhoramento é a avaliação da influência dos caracteres secundários sobre a variável principal. O estudo das influências dos componentes primários sobre a variável principal, como apresentado anteriormente, apesar de prover informações relevantes no que se refere à identificação de caracteres que maximizam as respostas correlacionadas, não tem grandes implicações práticas, pois estes caracteres comumente são igualmente complexos, de baixa herdabilidade e, portanto, difíceis de serem selecionados.

Diante do exposto, a Figura 2 ilustra o estudo das influências de alguns componentes secundários sobre os componentes primários e sobre a variável principal.

Os efeitos diretos e indiretos dos caracteres secundários ( $S_4$ ,  $S_5$  e  $S_6$ ) sobre cada caráter primário ( $P_1$ ,  $P_2$  e  $P_3$ ) foram avaliados da mesma maneira descrita anteriormente. Assim, deve-se considerar:

Modelo explicativo de  $P_1$

$$P_1 = p_{14}S_4 + p_{15}S_5 + p_{16}S_6 + p_{1\epsilon}\epsilon_1$$

Por este modelo, estimaram-se os efeitos diretos e indiretos dos caracteres secundários sobre os explicativos. As estimativas dos efeitos foram obtidas a partir do sistema de equações  $X'X\hat{\beta} = X'Y$ , sendo

$$X'Y = \begin{bmatrix} r_{14} \\ r_{15} \\ r_{16} \end{bmatrix}; \quad X'X = \begin{bmatrix} 1 & r_{45} & r_{46} \\ r_{45} & 1 & r_{56} \\ r_{46} & r_{56} & 1 \end{bmatrix} \quad \text{e} \quad \hat{\beta} = \begin{bmatrix} p_{14} \\ p_{15} \\ p_{16} \end{bmatrix}$$

Nos demais modelos explicativos, os efeitos diretos e indiretos foram estimados de maneira análoga, estando seus estimadores apresentados no Quadro 3.

Os cálculos dos coeficientes de determinação do diagrama de trilha ( $R^2$ ), dos efeitos residuais ( $\hat{p}_\epsilon$ ) e do diagnóstico de multicolinearidade foram realizados como descrito anteriormente.

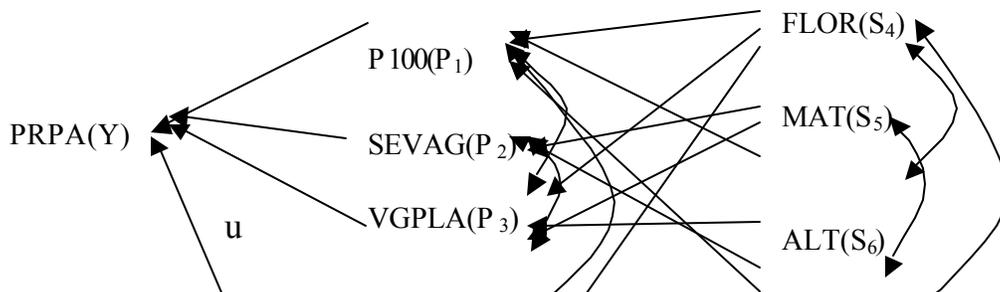


Figura 2 - Diagrama em cadeia ilustrativo dos efeitos diretos e indiretos de alguns componentes secundários (S<sub>4</sub>, S<sub>5</sub> e S<sub>6</sub>) sobre os componentes primários (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> e P<sub>3</sub>) e a produção por parcela (Y).

Quadro 3 - Estimadores dos efeitos diretos e indiretos de três componentes secundários sobre uma variável principal

Descrição dos Efeitos	Componentes Primários		
	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>
Efeito direto secundário de S <sub>4</sub>	$\hat{p}_{01}\hat{p}_{14}$	$\hat{p}_{02}\hat{p}_{24}$	$\hat{p}_{03}\hat{p}_{34}$
Efeito indireto de S <sub>4</sub> via S <sub>5</sub>	$r_{45}\hat{p}_{01}\hat{p}_{15}$	$r_{45}\hat{p}_{02}\hat{p}_{25}$	$r_{45}\hat{p}_{03}\hat{p}_{35}$
Efeito indireto de S <sub>4</sub> via S <sub>6</sub>	$r_{46}\hat{p}_{01}\hat{p}_{16}$	$r_{46}\hat{p}_{02}\hat{p}_{26}$	$r_{46}\hat{p}_{03}\hat{p}_{36}$
Efeito direto secundário de S <sub>5</sub>	$\hat{p}_{01}\hat{p}_{15}$	$\hat{p}_{02}\hat{p}_{25}$	$\hat{p}_{03}\hat{p}_{35}$
Efeito indireto de S <sub>5</sub> via S <sub>4</sub>	$r_{45}\hat{p}_{01}\hat{p}_{14}$	$r_{45}\hat{p}_{02}\hat{p}_{24}$	$r_{45}\hat{p}_{03}\hat{p}_{34}$
Efeito indireto de S <sub>5</sub> via S <sub>6</sub>	$r_{56}\hat{p}_{01}\hat{p}_{16}$	$r_{56}\hat{p}_{02}\hat{p}_{26}$	$r_{56}\hat{p}_{03}\hat{p}_{36}$
Efeito direto secundário de S <sub>6</sub>	$\hat{p}_{01}\hat{p}_{16}$	$\hat{p}_{02}\hat{p}_{26}$	$\hat{p}_{03}\hat{p}_{36}$
Efeito indireto de S <sub>6</sub> via S <sub>4</sub>	$r_{46}\hat{p}_{01}\hat{p}_{14}$	$r_{46}\hat{p}_{02}\hat{p}_{24}$	$r_{46}\hat{p}_{03}\hat{p}_{34}$
Efeito indireto de S <sub>6</sub> via S <sub>5</sub>	$r_{56}\hat{p}_{01}\hat{p}_{15}$	$r_{56}\hat{p}_{02}\hat{p}_{25}$	$r_{56}\hat{p}_{03}\hat{p}_{35}$

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Análise de variância individual

Os resultados das análises de variância individual de cada caráter, quanto aos quadrados médios, bem como as estimativas de diferentes parâmetros genéticos, dos ambientes 1 e 2, são apresentados no Quadro 4.

Verificou-se que houve diferenças significativas pelo teste F a 1% de probabilidade para QMtr, QMg e QMte nos dois ambientes, indicando a existência de considerável variabilidade genética entre as isolinhas e as testemunhas. Os quadrados médios de grupos (QMgt) foram significativos para os caracteres FLOR, MAT e P100. As estimativas dos componentes quadráticos que expressam a variabilidade genotípica diante das estimativas das variâncias fenotípica e ambiental confirmaram a existência de variabilidade genética entre as NIL's. Considerando que não houve problemas fitossanitários na condução dos ensaios, não se esperava encontrar variabilidade genética entre NIL's, uma vez que as diferenças genéticas entre elas eram devidas apenas a locos gênicos que conferem resistência a doenças.

Essas linhagens foram obtidas por retrocruzamentos, em que se esperavam, no mínimo, 93,75% de recuperação do genoma do genitor recorrente das isolinhas  $RC_3F_n$  e 96,87% das isolinhas  $RC_4F_n$ . Por meio dessa análise, pode-se concluir que a maioria dos locos estava em homozigose, ou seja, 3,13% de distância genética relativa foram suficientes para detectar considerável variabilidade genética em condições de campo, por meio de

Quadro 4 - Quadrados médios de tratamentos (QMtr), genótipos (QMg), testemunha (QMte), genótipos vs. testemunha (QMgt) e do erro (QMe); e estimativas dos componentes quadráticos que expressam a variabilidade genotípica ( $\hat{\phi}_g$ ), das variâncias fenotípica em nível de média ( $\hat{\sigma}_f^2$ ) e ambiental ( $\hat{\sigma}_e^2$ ), do coeficiente de determinação genotípica em nível de média ( $h^2$ ), dos coeficientes de variações experimental (CVe) e genética (CVg), da relação CVg/CVe e da média ( $\bar{x}$ ) de cada caráter avaliado em 18 NIL's de feijoeiro-comum

Ambiente	Estimativas	Caracteres						
		FLOR	MAT	ALT	PRPA	P100	SEVAG	VGPLA
1	QMtr	25,02**	33,21**	564,78**	184.562,11**	203,78**	2,28**	14,26**
	QMg	19,13**	25,05**	201,60**	198.151,36**	21,08**	0,40**	17,38**
	QMte	28,11**	59,83**	1.568,95**	170.476,66**	454,79**	7,99**	6,87**
	QMgt	106,60**	12,19**	713,81**	38.057,75 <sup>ns</sup>	1.803,78**	0,14 <sup>ns</sup>	5,62**
	QMe	1,41	1,47	19,32	13.882,31	1,04	0,07	2,08
	$\hat{\phi}_g$	4,41	5,89	45,57	46.067,26	5,01	0,08	3,83
	$\hat{\sigma}_f^2$	4,78	6,26	50,40	49.537,84	5,27	0,09	4,34
	$\hat{\sigma}_e^2$	0,35	0,36	4,83	3.470,57	0,26	0,01	0,52
	H <sup>2</sup> (%)	92,65	94,09	90,41	92,99	95,07	82,79	64,81
	CVe(%)	2,61	1,25	8,89	17,14	5,32	5,57	9,31
	CVg(%)	4,57	2,49	14,13	30,68	13,57	6,14	12,75
	CVg/CVe	1,77	1,99	1,53	1,82	2,19	1,09	1,35
	$\bar{x}$	45,37	97,06	49,43	687,23	19,14	4,71	15,48
	2	QMtr	81,16**	39,64**	565,86**	117.055,24**	158,74**	0,96**
QMg		19,13**	17,35**	192,33**	47.568,42**	4,74**	0,45**	8,60**
QMte		137,12**	62,74**	1.716,20**	133.989,53**	409,59**	1,54**	56,30**
QMgt		800,05**	279,91**	13,74 <sup>ns</sup>	185.895,34**	1.271,56**	0,01 <sup>ns</sup>	4,56 <sup>ns</sup>
QMe		1,40	1,45	36,71	5.225,74	1,87	0,02	1,70
$\hat{\phi}_g$		4,43	3,97	38,90	10.585,67	0,72	0,10	1,72
$\hat{\sigma}_f^2$		4,78	4,34	48,08	11.892,11	1,18	0,11	2,14
$\hat{\sigma}_e^2$		0,35	0,36	9,18	1.306,43	0,47	0,01	0,42
H <sup>2</sup> (%)		92,65	91,62	80,91	89,01	60,45	95,24	80,24
CVe(%)		2,07	1,26	10,47	14,61	5,79	2,96	8,33
CVg(%)		3,56	2,07	10,82	21,56	3,95	6,61	8,32
CVg/CVe		1,77	1,65	1,03	1,42	0,62	2,23	1,01
$\bar{x}$		57,25	95,04	57,87	494,94	23,63	4,92	15,63

FLOR (número de dias até o florescimento), MAT (número de dias até a maturação), ALT (altura de plantas), PRPA (produção média por parcela), P100 (peso de 100 sementes), SEVAG (número médio de sementes por vagem) e VGPLA (número médio de vagens por planta).

análises quantitativas. As estimativas das médias do coeficiente de determinação genotípica ( $h^2$ ) no sentido amplo foram superiores a 80% em seis dos sete caracteres avaliados. A menor estimativa de ( $h^2$ ) foi obtida com o caráter peso de 100 sementes, sendo de 60,45%. Essa estimativa, apesar de ser bem inferior às demais, pode ser considerada satisfatória para o sucesso na seleção desse caráter, uma vez que se trata de um caráter considerado determinante primário para produção. É importante salientar que o material genético utilizado apresentou nível de homozigose elevado, em virtude dos vários ciclos de retrocruzamentos, que tornaram as isolinhas muito próximas do genitor recorrente Rudá, o que possibilita dizer que praticamente toda a herdabilidade é devida à presença de genes de natureza aditiva. Com relação aos coeficientes de variação ambiental (C<sub>Ve</sub>), que permitem avaliar a precisão do experimento, as estimativas variaram de 2,07 a 17,14%, ambos no ambiente 1 (outono/inverno). O caráter que apresentou maior coeficiente de variação foi PRPA, sendo considerado alto, de acordo com o critério de classificação de GOMES (1985), os demais C<sub>Ve</sub> foram considerados baixos, segundo esses mesmos critérios. Entretanto, a magnitude do maior C<sub>Ve</sub> foi semelhante àquela encontrada por outros autores (RAMALHO et al., 1979; CASTOLDI, 1991), estando dentro dos limites aceitáveis na experimentação agrícola.

A utilização do coeficiente de variação genética (C<sub>Vg</sub>) permite a comparação da variabilidade genética dos diferentes caracteres analisados. Observa-se, no Quadro 4, que os valores obtidos variaram de 2,02 a 30,68%, sendo altos C<sub>Vg</sub> obtidos com caracteres primários da produção, produção por parcela e maturação. Contudo, para se ter uma idéia real da situação de cada caráter visando ao melhoramento, é importante analisar o C<sub>Vg</sub> juntamente com o C<sub>Ve</sub>, por meio da relação C<sub>Vg</sub>/C<sub>Ve</sub>. Os caracteres com situações mais favoráveis ao melhoramento apresentam C<sub>Vg</sub> superior ao C<sub>Ve</sub>. De acordo com esse critério, o caráter MAT apresenta as melhores estimativas para desses parâmetros, o que poderia trazer facilidades no processo de melhoramento.

Segundo os dados da literatura, as estimativas de parâmetros genéticos dos caracteres do feijoeiro-comum podem apresentar grandes variações. No entanto, deve-se considerar que tais variações podem ser uma consequência dos diferentes métodos utilizados na estimação dos distintos materiais genéticos analisados, das diferentes condições ambientais, da época de plantio e do modo que o experimento foi conduzido, dentre outros fatores (FALCONER, 1987; VENCOSKY e BARRIGA, 1992).

### **3.2. Análise de variância conjunta**

Os resultados da análise de variância conjunta de todos os caracteres, quanto a quadrados médios, médias e coeficientes de variação, estão apresentados no Quadro 5. Verifica-se, nesse quadro, que há diferenças significativas pelo teste F a 1% de probabilidade entre as NIL's em todos os caracteres, em todas as fontes de variação simples (tratamentos, isolinhas, testemunhas e ambientes), exceto no ambiente envolvendo o caráter VGPLA. Esse resultado indica a existência de considerável variabilidade genética entre os tratamentos, entre as testemunhas e entre as isolinhas.

Pode-se afirmar, ainda, que os ambientes avaliados não constituem um grupo homogêneo. Quanto às interações, verificou-se que houve diferenças significativas pelo teste F a 1% de probabilidade, em todos os caracteres, em três das cinco interações (tratamento x ambiente, testemunha x ambiente e grupo x ambiente). O grupo formado pela interação isolinha vs. testemunha foi não-significativo para as características PRPA, SEVAG e VGPLA. No entanto, a interação isolinha x ambiente foi não-significativa apenas com relação a FLOR e MAT.

As estimativas dos componentes quadráticos que expressam a variabilidade genotípica ( $\hat{\Phi}_g$ ) perante as estimativas das variâncias fenotípicas e ambientais confirmam a existência de variabilidade genética entre as NIL's. Não era esperado variabilidade genética entre NIL's em nenhuma característica avaliada, uma vez que as diferenças genéticas entre elas eram devidas a locos gênicos responsáveis pela resistência a doenças, considerando-se que não houve problemas fitossanitários na condução dos ensaios.

Quadro 5 - Resultados da análise de variância conjunta, quanto a quadrados médios de tratamento, genótipo, testemunha de sete caracteres e estimativas dos coeficientes de variação experimental (CVe) e da média ( $\bar{x}$ ), avaliados em 18 NIL's e sete testemunhas de feijoeiro-comum

FV	GL	Caracteres						
		FLOR	MAT	ALT	PRPA	P100	SEVAG	VGPLA
Tratamentos (Tr)	24	81,4**	46,3**	821,0**	182.896,9**	266,2**	2,1**	26,3**
Isolinhas (G)	17	38,3**	41,8**	259,5**	198.197,7**	16,7**	0,7**	21,8**
Testemunhas (Te)	6	93,0**	32,7**	2.471,7**	173.316,4**	509,0**	6,7**	43,5**
Grupo (Gr)	1	745,4**	204,5**	462,8**	4.264,5 <sup>ns</sup>	3.052,1**	0,0 <sup>ns</sup>	0,0 <sup>ns</sup>
Ambiente (A)	1	7.056,7**	204,0**	3.561,7**	1.848.704,9**	1.006,3**	2,3**	1,2 <sup>ns</sup>
Tr x A	24	24,8**	26,6**	309,6**	52.689,8**	96,3**	0,9**	8,3**
G x A	17	0,0 <sup>ns</sup>	0,7 <sup>ns</sup>	134,4**	47.522,1**	9,1**	0,2**	4,1**
Te x A	6	72,3**	89,8**	813,5**	56.711,2**	355,4**	2,9**	19,7**
(G vs Te) x A	1	161,3**	87,6**	264,8**	116.413,1**	23,2**	0,2**	11,8**
Erro	144	1,4	1,5	28,0*	9.554,0	1,5	0,0	1,9
Média		51,3	96,1	53,7	591,1	21,4	4,2	15,6
CVe(%)		2,3	1,3	9,9	16,5	5,6	4,4	8,8

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

<sup>ns</sup> Não-significativo.

### 3.3. Comparação entre médias

A comparação das médias, utilizando o teste de Tukey, apresentada no Quadro 6, evidencia a semelhança de comportamento entre as isolinhas e o cultivar recorrente Rudá. Tal semelhança é reflexo dos vários retrocruzamentos utilizando a testemunha Rudá como genótipo escolhido para ser retrocruzado. No entanto, algumas isolinhas mostraram-se diferentes em relação aos genitores Rudá, TO-41-5-1-1, AND-7-2-9-4-10 e AND-7-2-9-4-6 no ambiente 1 e AND-7-2-9-4-10 e AND-7-2-9-4-6 no ambiente 2. Estas duas isolinhas apresentaram problemas de desenvolvimento vegetativo, com encarquilhamento foliar e porte reduzido no ambiente 1 e tamanho reduzido de sementes nos dois ambientes. O efeito do ambiente pode ter causado tal agrupamento, contudo uma possível explicação genética para tal fato é a presença de genes andinos nessas isolinhas, provenientes do genitor doador AND 277. Assim, a reunião dos genes favoráveis do genitor Rudá e de genes de resistência do genitor AND 277 em uma mesma NIL pode ter provocado o seu desempenho inferior.

Fraqueza do híbrido ou nanismo, como vem sendo chamada a anomalia resultante do cruzamento entre materiais de centros de origem diferentes (andino vs. mesoamericano), tem sido observada por diversos autores. As anomalias resultantes desses cruzamentos causam diversas anormalidades nas plantas e são um indicativo de que houve longo isolamento geográfico entre os germoplasmas das duas regiões (SINGH e GUTIÉRREZ, 1984; GEPTS, 1988).

Quadro 6 - Médias da produção por parcela (PRPA), em gramas, avaliada em 18 isolinhas e sete testemunhas de feijoeiro-comum em duas épocas de cultivo. Coimbra, MG\*

Ambiente 1			Ambiente 2		
Tratamento	Média		Tratamento	Média	
AB-74-1-18	953,48	a	<b>Ouro Negro</b>	<b>740,32</b>	<b>a</b>
ON-25-99	925,38	ab	AB-74-1-9	652,02	ab
<b>Rudá</b>	<b>920,75</b>	<b>ab</b>	AB-74-1-18	622,24	abc
ON-48-99	912,00	ab	AB-74-1-16	592,25	abc
<b>Ouro Negro</b>	<b>897,98</b>	<b>ab</b>	AB-74-1-13	582,38	abc
ON-45-99	844,18	abc	<b>Pérola</b>	<b>577,05</b>	<b>abc</b>
AB-74-1-16	830,00	abc	<b>AB 136</b>	<b>568,35</b>	<b>abcd</b>
AB-74-1-9	827,95	abc	AB-74-1-10	561,85	abcd
ON-06-99	806,45	abc	AB-74-1-3	542,61	bcde
AB-74-1-13	771,08	abcd	<b>Rudá</b>	<b>528,70</b>	<b>bcde</b>
TO-41-5-2-5	759,73	abcde	<b>TO</b>	<b>528,62</b>	<b>bcde</b>
<b>Aporé</b>	<b>755,93</b>	<b>abcdef</b>	ON-25-99	522,39	bcde
TO-41-5-6-24	733,98	abcdef	<b>Aporé</b>	<b>519,52</b>	<b>bcde</b>
ON-43-99	711,75	abcdef	ON-06-99	490,72	bcdef
AB-74-1-3	696,55	abcdef	TO-41-5-2-5	472,53	bcdef
AB-74-1-10	657,70	abcdef	ON-45-99	472,09	bcdef
TO-41-5-6-4	644,23	abcdef	TO-41-5-6-4	457,76	bcdef
AND-7-2-9-7-10	633,15	abcdef	TO-41-5-6-24	446,12	cdef
<b>Pérola</b>	<b>630,50</b>	<b>bcdef</b>	ON-48-99	445,96	cdef
TO-41-5-1-1	554,23	cdef	AND-7-2-9-7-10	440,22	cdef
<b>AB 136</b>	<b>480,70</b>	<b>defg</b>	ON-43-99	374,40	defg
<b>AND 277</b>	<b>439,88</b>	<b>efgh</b>	TO-41-5-1-1	365,57	efg
<b>TO</b>	<b>434,73</b>	<b>fgh</b>	<b>AND 277</b>	<b>324,70</b>	<b>fg</b>
AND-7-2-9-4-10	185,95	gh	AND-7-2-9-4-10	305,32	fg
AND-7-2-9-4-6	141,45	h	AND-7-2-9-4-6	239,93	g

\* As médias seguidas de pelo menos uma letra não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Obs.: as testemunhas estão em negrito.

A comparação das médias, utilizando o teste de Dunnett, apresentadas no Quadro 7 indicam que, no ambiente seco e com baixas temperaturas (ambiente 1), existem seis isolinhas em que as médias não diferem estatisticamente da média da melhor testemunha (Rudá). No ambiente úmido e quente (ambiente 2), não foi verificado nenhuma isolinha superior à melhor testemunha (Ouro Negro); entretanto, três isolinhas apresentaram médias superiores às do Rudá, superando o genitor recorrente, e outras sete com comportamento médio semelhante, estatisticamente, ao do genitor recorrente.

Quadro 7 - Teste de Dunnett das médias do caráter produção por parcela (PRPA), em gramas, avaliado em 18 isolinhas e sete testemunhas de feijoeiro-comum em duas épocas de cultivo. Coimbra, MG\*

Ambiente 1			Ambiente 2		
Tratamento	Média		Tratamento	Média	
AB-74-1-18	953,47	ab	AB-74-1-9	652,02	
ON-25-99	925,37	ab	AB-74-1-18	622,24	d f
ON-48-99	912,00	ab	AB-74-1-16	592,25	d f
ON-45-99	844,17	ab g	AB-74-1-13	582,38	a cd f
AB-74-1-16	830,00	ab g	AB-74-1-10	561,85	a cd fg
AB-74-1-9	827,95	ab g	AB-74-1-3	542,61	a cd fg
ON-06-99	806,45	b g	ON-25-99	522,39	a cd fg
AB-74-1-13	771,07	g	ON-06-99	490,72	a c g

TO-41-5-2-5	759,72	g	TO-41-5-2-5	472,53	a c g
TO-41-5-6-24	733,97	g	ON-45-99	472,09	a c g
ON-43-99	711,75	fg	TO-41-5-6-4	457,76	
AB-74-1-3	696,55	fg	TO-41-5-6-24	446,12	
AB-74-1-10	657,70	f	ON-48-99	445,96	
TO-41-5-6-4	644,22	f	AND-7-2-9-7-10	440,22	
AND-7-2-9-7-10	633,15	f	ON-43-99	374,40	e
TO-41-5-1-1	554,22	d f	TO-41-5-1-1	365,57	e
AND-7-2-9-4-10	185,94		AND-7-2-9-4-10	305,32	e
AND-7-2-9-4-6	141,45		AND-7-2-9-4-6	239,93	
<b>Rudá</b>	920,75	a	<b>Rudá</b>	528,70	a
<b>Ouro Negro</b>	897,97	b	<b>Ouro Negro</b>	740,32	b
<b>TO</b>	434,72	c	<b>TO</b>	528,62	c
<b>AB 136</b>	511,90	d	<b>AB 136</b>	568,35	d
<b>AND 277</b>	439,87	e	<b>AND 277</b>	324,70	e
<b>Pérola</b>	630,50	f	<b>Pérola</b>	577,05	f
<b>Aporé</b>	755,92	g	<b>Aporé</b>	519,52	g

\* As médias seguidas de pelo menos uma letra que identifica uma testemunha não diferem estatisticamente desta, a 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Obs.: as testemunhas estão em negrito.

As isolinhas avaliadas trazem grande vantagens, como a introdução de importantes genes de resistência em um *background* do tipo “carioca”. As melhores isolinhas serão enviadas para a EMBRAPA Arroz e Feijão, onde serão complementados os ensaios de produtividade e resistência a doenças no Ensaio Preliminar de Linhagens (EPL). Também, serão utilizadas no Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV, para intercruzamento das melhores isolinhas na piramidização de genes de resistência em um único cultivar.

### 3.4. Coeficientes de correlação

As estimativas dos coeficientes de correlações genotípica, fenotípica e ambiental, em cada ambiente, são apresentadas no Quadro 8. Esses resultados indicam que houve concordância de sinais nas correlações fenotípicas e genotípicas. Com relação às magnitudes, as correlações genotípicas foram sempre superiores às fenotípicas. No entanto, as correlações ambientais foram algumas vezes superiores em magnitude e diferentes em sinal, em comparação com as correlações genotípicas e fenotípicas. Essa observação é importante, pois indica que a seleção indireta, baseada nos índices de correlação genotípica, seria prejudicada pela ação diferencial do ambiente sobre as variáveis envolvidas.

Os caracteres relacionados ao ciclo da cultura (FLOR e MAT) apresentaram correlações fenotípicas e genotípicas altas e positivas entre si, ou seja, as plantas que floriram mais tarde atingiram a maturação também mais tarde. As correlações entre esses dois caracteres com PRPA e SEVAG foram negativas, indicando que, em geral, as isolinhas mais precoces são mais produtivas e apresentam maior número de sementes por vagens.

Os caracteres P100, SEVAG e VGPLA, considerados componentes primários da produção, apresentaram elevadas correlações genotípicas com a produção por

parcela, indicando que as isolinhas mais produtivas são aquelas que apresentam valores elevados desses caracteres. Tais resultados indicaram que esses caracteres serviriam como bons critérios de seleção quando usados individualmente, visando ao aumento da produção por parcela na população analisada neste trabalho.

Quadro 8 - Estimativas dos coeficientes de correlações genotípica, fenotípica e ambiental entre sete caracteres estudados em 18 NIL's de feijoeiro-comum em dois ambientes

Ambientes	Caracteres	Correlações	Caracteres					
			MAT	ALT	PRPA	P100	SEVAG	VGPLA
1	FLOR	$r_g$	0,953	-0,298	-0,632	-0,471	-0,719	-0,775
		$r_f$	0,904	-0,287	-0,586	-0,452	-0,631	-0,712
		$r_a$	0,214	-0,171	0,014	-0,160	-0,016	-0,124
	MAT	$r_g$		-0,321	-0,754	-0,559	-0,785	-0,795
		$r_f$		-0,288	-0,710	-0,526	-0,705	-0,739
		$r_a$		0,105	-0,070	0,048	-0,115	-0,176
	ALT	$r_g$			0,815	0,885	0,668	0,831
		$r_f$			0,735	0,824	0,567	0,762
		$r_a$			-0,145	0,041	-0,082	0,195
	PRPA	$r_g$				0,928	0,933	0,853
		$r_f$				0,872	0,830	0,786
		$r_a$				-0,013	0,105	0,160
	P100	$r_g$					0,843	0,812
		$r_f$					0,762	0,753
		$r_a$					0,149	0,128
	SEVAG	$r_g$						0,845
		$r_f$						0,744
		$r_a$						0,154
2	FLOR	$r_g$	0,952	0,736	-0,398	0,061	-0,333	-0,819
		$r_f$	0,897	0,623	-0,373	0,015	-0,330	-0,714
		$r_a$	0,259	-0,119	-0,118	-0,182	-0,300	-0,107
	MAT	$r_g$		0,819	-0,254	0,084	-0,329	-0,693
		$r_f$		0,696	-0,240	0,082	-0,312	-0,593
		$r_a$		-0,068	-0,106	0,108	-0,058	-0,024
	ALT	$r_g$			0,296	0,205	0,162	-0,466
		$r_f$			0,304	0,168	0,121	-0,348
		$r_a$			0,364	0,090	-0,242	0,120
	PRPA	$r_g$				0,509	0,857	0,506
		$r_f$				0,393	0,793	0,438
		$r_a$				0,095	0,037	0,091
	P100	$r_g$					0,653	0,197
		$r_f$					0,490	0,154
		$r_a$					-0,054	0,062
	SEVAG	$r_g$						0,398
		$r_f$						0,335
		$r_a$						-0,116



### 3.5. Análise de trilha

Com base no diagnóstico de multicolinearidade, verificou-se que as matrizes de correlações genotípicas dos caracteres avaliados não apresentam problemas severos de multicolinearidade. Graus elevados de multicolinearidade presentes nas matrizes de correlações poderiam tornar o processo de estimação dos coeficientes não-confiáveis e também afetar o coeficiente de determinação total ( $R^2$ ) da análise. Problemas de multicolinearidade podem tornar a matriz  $XX$ , utilizada na análise de trilha, não-singular, fazendo, conseqüentemente, com que as estimativas de mínimos quadrados não sejam confiáveis (CRUZ, 1997).

A análise de trilha e o desdobramento das correlações genotípicas em efeitos diretos e indiretos dos caracteres explicativos sobre a produção por parcela, com base no diagrama causal, estão apresentados no Quadro 9. Para a interpretação de uma análise de causa e efeito, devem ser levados em consideração alguns pontos essenciais, conforme discutidos abaixo.

Se um coeficiente de correlação genotípico entre um fator causal final (Y) for igual ou semelhante ao seu efeito direto, em magnitude e sinal, essa correlação explica a verdadeira associação existente. Nesse caso, uma seleção direta sobre o referido fator causal pode ser eficiente para melhorar o caráter principal 'Y' (VENCOVSKY e BARRIGA, 1992; CRUZ e REGAZZI, 1997; MIRANDA et al., 1988; SANTOS et al., 1986; SANTOS et al., 1994). A situação que mais se aproxima da exposta neste trabalho é a que envolve o número de sementes por vagens (SEVAG), pois sua correlação com produção de grão e o efeito direto foram elevados e de mesmo sinal nos dois ambientes. Esse fato é de grande importância para fins de melhoramento, pois torna eficiente a resposta correlacionada por meio da seleção indireta da produção por planta via SEVAG. Outro resultado que indica a importância do caráter SEVAG é que a característica P100 apresenta alto efeito indireto sobre a produção por parcela via SEVAG.

Quadro 9 - Análise de trilha e desdobramento das correlações genotípicas em efeitos diretos e indiretos dos caracteres explicativos P100 e SEVAG sobre o caráter principal, produção por parcela (PRPA)

Caracteres	Efeitos	Estimador	Estimativas	
			Ambiente 1	Ambiente 2
P100	Direto sobre PRPA	$\hat{p}_{01}$	0,4688	-0,1663
	Indireto via SEVAG	$\hat{p}_{02}r_{12}$	0,4089	0,6114
	Indireto via VGPLA	$\hat{p}_{03}r_{13}$	0,0507	0,0640
	Total	$r_{01}$	0,9285	0,5092
SEVAG	Direto sobre PRPA	$\hat{p}_{02}$	0,4849	0,8560
	Indireto via P100	$\hat{p}_{01}r_{12}$	0,3952	-0,1188
	Indireto via VGPLA	$\hat{p}_{03}r_{23}$	0,0528	0,0465
	Total	$r_{02}$	0,9331	0,7838
VGPLA	Direto sobre PRPA	$\hat{p}_{03}$	0,0625	0,4084
	Indireto via P100	$\hat{p}_{01}r_{13}$	0,3807	-0,0261
	Indireto via SEVAG	$\hat{p}_{02}r_{23}$	0,4099	0,0975
	Total	$r_{03}$	0,8532	0,4800
Coeficiente de determinação ( $R^2$ )		$R^2 = \sum_{i=1}^4 p_{0i}r_{0i}$	0,9412	0,7823
Efeito da variável residual ( $\hat{p}_{0e}$ )		$\hat{p}_e = \sqrt{1-R^2}$	0,2425	0,4665

PRPLA (produção média por planta), P100 (peso de 100 sementes), VGPLA (número médio de vagens por planta) e SEVAG (número médio de sementes por vagem).

O mesmo raciocínio se aplica a número de vagens por planta (VGPLA), mas em menor grau, já que o efeito indireto, nesse caso, foi de pequena magnitude (0,062) no ambiente 1. Pode-se observar que a alta correlação de VGPLA com produção por parcela é devida ao efeito indireto elevado via P100 e SEPLA. Se um coeficiente de correlação, com rendimento de grãos, for positivo, mas o efeito direto for negativo ou de magnitude irrelevante, a correlação será causada por efeitos indiretos (VENCOVSKY e BARRIGA, 1992). Em tais situações, os fatores causais indiretos devem ser considerados simultaneamente no processo de seleção (CRUZ e REGAZZI, 1997). Tal fato envolvendo o caráter P100, embora apresente alta correlação com a produção por parcela, tem efeito direto sobre este caráter em sinal contrário no ambiente 2, indicando ausência de causa e efeito, ou seja, o caráter P100 não é o principal determinante das alterações na produção por parcela, existindo outros caracteres que proporcionariam maior impacto, em termos de ganho de seleção, nesse ambiente.

Pelo exposto, pode-se concluir que alguns componentes primários apresentam inter-relacionamento diferenciado com o caráter principal, quando são consideradas mudanças de ambiente. O ambiente 1, caracterizado por temperaturas frias e clima seco, apresentou correlações genotípicas entre componentes primários e o caráter principal superiores, em comparação com o ambiente 2, caracterizado por temperaturas elevadas e clima úmido. Além disso, o ambiente 1 apresentou altos efeitos diretos e indiretos,

mostrando que existe associação de causa e efeito quanto a essas características, associação essa que não se confirmou no ambiente 2.

MIRANDA et al. (1988) comentaram que a presença de efeitos indiretos negativos indica a dificuldade com a qual os melhoristas de feijão se defrontam para seleção com base nos componentes primários da produção. Pode-se observar que todos os efeitos indiretos do caráter peso de 100 sementes evidenciam coeficiente de correlação negativo no ambiente 2. Esse tipo de correlação negativa entre componentes primários da produção, segundo ADAMS (1967), não resultam das relações genéticas, mas sim do fenômeno da compensação produtiva, no qual os componentes, que são geneticamente independentes, competem por nutrientes durante seu desenvolvimento. Essa independência genética permite considerar o caráter P100 na seleção de plantas mais produtivas, o que pode aumentar o ganho de seleção.

Os resultados da análise de trilha com diagrama em cadeia estão apresentados no Quadro 10. Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que, dentre os caracteres secundários, o número de dias para maturação ( $S_5$ ) e a altura de plantas ( $S_6$ ) apresentaram maiores correlações com a produção por parcela, com a ressalva de que a altura de planta apresenta efeito direto positivo e o número de dias para maturação, efeito direto negativo.

Quando um coeficiente de correlação for de pequena magnitude, mas o efeito direto for positivo e elevado, os efeitos indiretos serão responsáveis pela falta de correlação, fato observado em altura de plantas para o ambiente 2, onde a correlação fenotípica total (0,03) evidenciou magnitude irrelevante, porém de efeito direto elevado e de sinal positivo (1,11), indicando, assim, que os efeitos indiretos são os responsáveis por essa falta de correlação. Em tais casos, os fatores indiretos deverão merecer atenção na seleção.

Segundo VENCOVSKY e BARRIGA (1992), pode ocorrer que a correlação entre um fator causal e Y seja de sinal contrário, com efeito direto positivo e alto. Nesse caso, deve se aplicar um esquema seletivo restrito, a fim de eliminar os efeitos indiretos indesejáveis para aproveitar o efeito direto existente. Pode-se detectar esse fato em relação aos caracteres número de dias para floração e produção de grãos.

Pelas correlações com Y e pelos efeitos diretos secundários, houve evidências de que  $S_6$  e  $S_5$ , nesta ordem, são caracteres que devem ser levados em conta na seleção para Y.

De maneira semelhante ao discutido no diagrama causal único, mudanças de ambiente promovem alterações nos efeitos diretos e indiretos dos componentes secundários da produção sobre a produção de grãos.

Os resultados obtidos e discutidos evidenciam que apenas o estudo de correlações simples é pouco informativo para o estudo dos graus de associação e inter-relação do rendimento com os seus componentes primários e secundários. A análise de trilha permite interpretação bem mais consistente (VENCOVSKY e BARRIGA, 1992).

Quadro 10 - Efeitos diretos e indiretos de três componentes secundários sobre a produção por parcela na cultura do feijoeiro

Descrição dos efeitos	Ambiente 1				Ambiente 2			
	Comp. Primários			Total	Comp. Primários			Total
	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>		P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	
Efeito direto secundário de S <sub>4</sub>	0,291	0,141	-0,015	0,417	0,001	0,338	-0,316	0,022
Efeito indireto de S <sub>4</sub> via S <sub>5</sub>	-0,402	-0,423	-0,021	-0,848	0,015	-1,438	0,147	-1,275
Efeito indireto de S <sub>4</sub> via S <sub>6</sub>	-0,109	-0,066	-0,012	-0,187	-0,020	0,825	0,012	0,818
Total	-0,221	-0,348	-0,048	-0,618	-0,004	-0,274	-0,156	-0,435
Efeito direto secundário de S <sub>5</sub>	-0,422	-0,444	-0,022	-0,889	0,016	-1,512	0,155	-1,340
Efeito indireto de S <sub>5</sub> via S <sub>4</sub>	0,277	0,135	-0,014	0,398	0,001	0,321	-0,301	0,021
Efeito indireto de S <sub>5</sub> via S <sub>6</sub>	-0,117	-0,071	-0,012	-0,202	-0,022	0,918	0,014	0,909
Total	-0,262	-0,380	-0,049	-0,693	-0,005	-0,271	-0,132	-0,409
Efeito direto secundário de S <sub>6</sub>	0,366	0,223	0,040	0,630	-0,027	1,122	0,017	1,111
Efeito indireto de S <sub>6</sub> via S <sub>4</sub>	-0,086	-0,042	0,004	-0,124	0,0001	0,249	-0,233	0,016
Efeito indireto de S <sub>6</sub> via S <sub>5</sub>	0,135	0,142	0,007	0,285	0,013	-1,237	0,127	-1,097
Total	0,415	0,324	0,052	0,791	-0,013	0,133	-0,088	0,031

P<sub>1</sub>: peso médio de 100 sementes, P<sub>2</sub>: número médio de sementes por vagem, P<sub>3</sub>: número médio de vagens por planta, S<sub>4</sub>: número de dias para floração, S<sub>5</sub>: número de dias para maturação e S<sub>6</sub>: altura de plantas.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Seis caracteres de importância agrônômica associados à produtividade de grãos por unidade de área foram avaliados em 18 isolinhas (NIL's) de feijão, em Coimbra, MG. As isolinhas foram desenvolvidas visando obter, posteriormente, um cultivar de feijão de tipo de grão “carioca” resistente a ferrugem, antracnose e mancha-angular, utilizando-se o método dos retrocruzamentos assistidos por marcadores RAPD a partir dos cruzamentos iniciais entre os cultivares Rudá x Ouro Negro, Rudá x TO, Rudá x AB 136 e Rudá x AND 277.

Esses cultivares foram utilizados, no presente trabalho, como testemunhas, juntamente com os cultivares comerciais Pérola e Aporé, sendo empregado o delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições. Foram avaliadas sete características quantitativas, a saber: número de dias até o florescimento, número de dias até a maturação, altura de plantas, produção média por parcela, peso de 100 sementes, número médio de sementes por vagem e número médio de vagens por planta.

Os objetivos deste trabalho foram: estudar o comportamento das isolinhas, por meio da análise de variância e de estimativas de parâmetros genéticos, e os efeitos diretos e indiretos entre os componentes primários de produção e a produção de grãos; e determinar a intensidade da associação entre os componentes primários de produção e a produção de grãos. Além da análise de variância, foram estimados os componentes quadráticos que expressam a variabilidade genotípica ( $\hat{\phi}_g$ ); os coeficientes de variância fenotípica em nível de média ( $\hat{\sigma}_f^2$ ) e ambiental ( $\hat{\sigma}^2$ ); os coeficientes de determinação genotípica em nível de média ( $h^2$ ); os coeficientes de variação experimental (CVe) e genético (CVg); a relação CVg/CVe; e a média ( $\bar{x}$ ) de cada caráter avaliado em 18 NIL's de feijoeiro-comum.

Verificou-se considerável variabilidade genética entre as isolinhas de todas as fontes de variação e em todos os caracteres avaliados, tanto na análise individual como na análise conjunta. Os caracteres VAPLA, SEVAG e P100, considerados determinantes primários para a produção, tiveram altas estimativas de herdabilidade, sendo os dois primeiros os que apresentaram maiores correlações genotípicas e fenotípicas com a produção por planta. Em razão da variabilidade genética detectada, torna-se importante o emprego de seleção das isolinhas que apresentaram melhor comportamento para dar continuidade ao programa de melhoramento. As médias da característica produção por parcela, em cada ambiente, foram comparadas pelos testes

de Tukey e Dunnett, para discriminação das isolinhas mais produtivas em cada ambiente. Pelo teste de Dunnett, observou-se que as isolinhas AB-74-1-9, AB-74-1-16, AB-74-1-18, ON-25-99 e ON-45-99 se igualaram ou até mesmo superaram o cultivar Rudá nos dois ambientes.

Procurou-se também verificar os efeitos diretos e indiretos de cada característica sobre a produção, mediante o uso da análise de trilha. O caráter SEVAG apresentou o maior efeito direto sobre a produção por planta, sendo, portanto, de grande importância para fins de melhoramento visando ao aumento da produção, pois torna eficiente a resposta correlacionada por meio da seleção indireta.

## CONCLUSÕES GERAIS

O presente trabalho, inserido no Programa de Melhoramento do Feijoeiro do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da UFV (BIOAGRO/UFV), teve como primeiro objetivo a realização dos testes de progênie em cada um dos cruzamentos, visando à seleção de isolinhas homozigotas para resistência à ferrugem, à antracnose e à mancha-angular.

Foram feitas inoculações com diferentes patótipos de cada patógeno e posterior avaliação e seleção das plantas resistentes. O teste de progênie em cada população foi feito com base na informação de 12 ou 15 plantas  $RC_4F_3$ . Como resultado foram selecionadas 13 isolinhas homozigotas para resistência a uma mistura de patótipos de *U. appendiculatus* e ao patótipo 89 de *C. lindemuthianum*, a partir do cruzamento entre Rudá x Ouro Negro; 10 isolinhas homozigotas resistentes ao patótipo 65 de *C. lindemuthianum*, a partir do cruzamento entre Rudá x TO; seis isolinhas homozigotas para resistência ao patótipo 89 de *C. lindemuthianum*, a partir do cruzamento entre Rudá x AB 136; e cinco isolinhas homozigotas para resistência à mancha-angular, a partir do cruzamento entre Rudá AND x 277. Com base no teste de  $\chi^2$ , verificou-se segregação de 1:2 (RR:Rr) em todos os cruzamentos, indicando que a resistência aos patógenos é determinada por um único gene dominante ou por um bloco gênico que se comporta como característica monogênica dominante.

Marcadores moleculares do tipo RAPD foram empregados na seleção de isolinhas resistentes mais próximas do genitor recorrente Rudá e isolinhas contrastantes com essas doenças. Com base na informação dos marcadores moleculares, foram calculadas distâncias genéticas entre as isolinhas e os seus genitores e feitas análises de agrupamento, as quais definiram dois grupos, um contendo o genitor doador e o outro contendo todas as isolinhas e o genitor recorrente. As distâncias genéticas entre as isolinhas e o genitor recorrente variaram entre 0 e 1,99%. Além das isolinhas resistentes, foram obtidas isolinhas suscetíveis e contrastantes em relação às resistentes.

Avaliou-se a reação de isolinhas de feijão quanto à resistência a diferentes patótipos de *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* e *P. griseola*. Da avaliação quanto à resistência à ferrugem, duas isolinhas apresentaram-se homozigotas resistentes a todos os 10 patótipos inoculados, e uma isolinha (ON-25-99) derivada do cruzamento entre Rudá x Ouro Negro apresentou-se homozigota resistente a 15 patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum*, heterozigota para o patótipo 87-531 e suscetível aos patótipos 64-458 e 65-400. A isolinha ON-48-99, também resistente à ferrugem,

mostrou-se homozigota resistente a 13 patótipos, heterozigota para os patótipos 83-501, 87-531 e 343-506 e suscetível aos patótipos 64-458 e 65-400. A isolinha TO-41-5-6-24, do cruzamento entre Rudá x TO, exibiu o melhor comportamento dentro desse retrocruzamento, sendo homozigota resistente a 17 patótipos e heterozigota ao patótipo 343-506, de *Colletotrichum lindemuthianum*. A isolinha AB-74-1-18, do retrocruzamento entre Rudá x AB 136, apresentou o melhor comportamento dentro desse retrocruzamento, sendo homozigota resistente a 15 patótipos e heterozigota para os patótipos 64-458, 119-481 e 343-506. Das isolinhas avaliadas quanto à resistência à mancha-angular, apenas uma apresentou-se homozigota resistente a todos os seis isolados inoculados.

Marcadores moleculares foram empregados na verificação da presença ou ausência de bandas que flanqueiam os genes de resistência. Dos 13 marcadores identificados, apenas oito mostraram utilidade para dar continuidade ao processo de piramidização dos genes de resistência à ferrugem, à antracnose e à mancha-angular no cultivar Rudá. Os cinco marcadores restantes não apresentaram, atualmente, mais utilidade para o processo de piramidização, uma vez que perderam sua associação com os genes de resistência.

As isolinhas foram ainda testadas quanto a características quantitativas, quando foram estimados diferentes parâmetros genéticos, correlações fenotípicas, genotípicas e ambientais e efeitos diretos e indiretos de cada característica sobre a produção, mediante o uso da análise de trilha conduzida em dois ambientes diferentes. Os caracteres “número de vagens por planta” e “número de sementes por vagem” apresentaram maiores correlações genotípicas com a produção por planta. A média das características e a precisão experimental foram semelhantes nos dois ensaios.

Os resultados encontrados neste trabalho são importantes para dar continuidade ao processo de piramidização de genes visando à resistência a ferrugem, antracnose e mancha-angular no cultivar Rudá, processo esse atualmente sendo conduzido pelo BIOAGRO/UFV.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNOOR, R.V., BARROS, E.G. de, MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, v. 18, p. 265-273, 1995.
- ADAMS, M.W. Basis of yield component compensation in crop plants with special reference to the field bean, *Phaseolus vulgaris*. **Crop Science**, v.7, p. 505-510, 1967.
- ADAM-BLONDON, A.F., SÉVIGNAE, M., BANNEROT, H., DRON, M. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to a dominant gene (Are) conferring resistance to anthracnose in common bean. **Theor. Appl. Genet.**, v. 88, p. 865-870, 1994.
- ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 1971. 381 p.
- ALZATE-MARIN, A.L. **Resistência à antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.): diversidade genética de raças de *Colletotrichum lindemuthiana*, herança de resistência e identificação de marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 1996. 65p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- ALZATE-MARIN, A.L., ARRUDA, M.C.C., MENARIM, H., CHAGAS, J.M., BARROS, E.G. de, MOREIRA, M.A. Identification of RAPD markers linked to resistance genes to anthracnose in common bean cultivars AB136, TO and G2333. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 42, p.13-14, 1999a.

- ALZATE-MARIN, A.L., MENARIM, H., CARVALHO, G.A., PAULA JÚNIOR, T.J., BARROS, E.G. de, MOREIRA, M.A. Improved selection with newly identified RAPD markers linked to resistance gene to four pathotypes of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Phytopathology**, v. 89, p. 281-285, 1999b.
- ALZATE-MARIN, A.L., MENARIM, H., ARRUDA, M.C.C., CHAGAS, J.M., BARROS, E.G. de, MOREIRA, M.A. Backcross assisted by RAPD markers for the introgression of *Co-4* and *Co-6* anthracnose resistant genes in common bean cultivars. **Annual Report of the Bean improvement Cooperative**, v. 42, p. 15-16, 1999c.
- ALZATE-MARIN, A.L., BARROS, E.G. de, MOREIRA, M.A. Co-evolution of *Colletotrichum lindemuthianum* (Melanconiaceae, Melanconiales) races that occur in some Brazilian regions. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, p. 115-118, 1999d.
- ARAÚJO, R.S., RAVA, C.A., STONE, L.F., ZIMMERMANN, M.J.O. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, 1996. 786p.
- ARAÚJO, G.A.A., VIEIRA, C., SOUZA FILHO, B.F. '**Ouro Negro**' Nova Variedade de Feijão-Preto para os Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. Viçosa, MG: EPAMIG, 1991. (Boletim Técnico No. 1).
- ARRUDA, M.C.C. **Resistência do feijoeiro-comum à antracnose: herança, identificação de marcadores moleculares e introgressão do gene *Co-4* no cultivar Rudá**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 101p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- AUGUSTIN, E., COYNE, D.P., SCHUSTER, M.L. Inheritance of resistance in *Phaseolus vulgaris* to *Uromyces phaseoli* typical Brazilian rust race B11 and of plant habit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 97, p. 526-529, 1972.
- BALARDIN, R.S., KELLY, J.D. Effect of common bean gene pools on *Colletotrichum lindemuthianum* variability. **Phytopathology**, v. 87, S 6, 1997.
- BARROS, O., CARDEÑOSA, R., SKILES, R. L. The severity and control of angular leaf spot of beans in Colômbia. **Phytopathology**, v. 47, p. 3, 1957.
- BELSLEY, D.A., KUH, E., WELCH, R.E. **Regression diagnostics: identifying data and sources of collinearity**. New York: John Wiley and Sons, 1980. 292 p.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV. 1997. 453 p.
- CARDONA-ALVAREZ, C., WALKER, J.C. Angular leaf spot of bean. **Phytopathology**, v. 46, p. 610-615, 1956.

- CARDONA-ALVAREZ, C. Herancia de la resistencia a la mancha angular em frijol. **Agron. Trop.**, v. 18, p. 330-331, 1958.
- CARRIJO, I.V. **Análise da resistência de vinte e cinco cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. a *Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth.** Viçosa, MG: UFV, 1975. 77 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1975.
- CARVALHO, G.A., NIETSCHKE, S., ALZATE-MARIN, A.L., FERREIRA, C.F., PAULA JUNIOR., T.J., FALEIRO, F.G., BARROS, E.G. de, MOREIRA, M.A. Identificação de marcadores RAPD ligados a genes de resistência à mancha-angular do feijão. **Fitopatologia brasileira**, v. 22, p. 255-257, 1997.
- CARVALHO, G.A., PAULA JÚNIOR, T.J., ALZATE-MARIN, A.L., NIETSCHKE, S., BARROS, E.G. de, MOREIRA, M.A. Herança da resistência da linhagem AND 277 de feijoeiro-comum à raça 63.23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. **Fitopatologia brasileira**, v. 23, p. 482-485, 1998.
- CARVALHO, G.A. **Relatório final de atividades BIOAGRO/EPAMIG: melhoramento genético do feijoeiro visando resistência a doenças.** Viçosa, MG: Bioagro, 1998. 182 p.
- CARVALHO, L.P., VIEIRA, C., CHAVES, G.M. Hereditariedade da resistência a cinco raças de *Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth. em *Phaseolus vulgaris* L. **Fitopatologia brasileira**, v. 3, p. 181-185, 1978.
- CARVALHO, C.G.P.de, OLIVEIRA, V.R., CRUZ, C.D., CASALI, V.W.D. Análise de trilha sob multicolinearidade em pimentão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 603-613, 1999.
- CASTAÑO, J. **Manual standas para cuantificación de daños causados por hongos, bacterias y nematodos en frijol.** Cali, Colômbia: CIAT, 1985. 22 p. (Mimeo.).
- CASTOLDI, F.L. **Análises das interrelações entre rendimento e diversas características agronômicas do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).** Viçosa, MG: UFV, 1991. 73 p. Dissertação – (Mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal de Viçosa, 1991.
- CIAT - CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Informe Annual 1986: programa de frijol.** Cali: CIAT, 1986. 339 p.
- CORRÊA, R.X. **Genes de resistência a doenças do feijoeiro: identificação de marcadores, organização e identificação de análogos.** Viçosa, MG: UFV, 1999. 116p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.

- CORRÊA, R.X., GOOD-GOD, P.I., RAGAGNIN, V.A., COSTA, M.R., FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. de. Marcador SCAR ligado a gene de resistência do feijoeiro à ferrugem. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, p. 237, 1998. (Resumo).
- COSTA, M. R., CORRÊA R. X., MORREIRA, M. A., BARROS, E. G. Identificação de um marcador molecular para resistência à ferrugem do feijoeiro a partir de *primers* que flanqueiam um microssatélite em soja. **VI Renafe**, v. 1, p. 57-59, 1999. (Resumo).
- CRUZ, C.D. **Programa genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 442 p.
- CRUZ, C.D., REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2.ed. Viçosa, MG: UFV, 1997. 390 p.
- DAVISON, A.D., VAUGHAN, E.K. Effect of uredospore concentration on determination of races of *Uromyces phaseoli* var. *phaseoli*. **Phytopathology**, v. 54, p. 336-338, 1964.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.
- FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa, MG: UFV Imprensa Universitária, 1987. 279 p.
- FALEIRO, F.G. **Identificação de raças, diversidade genética de *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* e herança da resistência no feijoeiro**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 65 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- FALEIRO, F.G., PAULA JÚNIOR, T.J., BARROS, E.G. de, FREITAS, M.A.S., MOREIRA, M.A. Resistência de cultivares de feijoeiro comum a *Uromyces appendiculatus* da Zona da Mata de Minas Gerais. **Fitopatologia brasileira**, v. 21, p. 123-125, 1996.
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., LOOS, R.A., CORRÊA, A.G.G., PAULA JÚNIOR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. de. Uso de marcadores RAPD na obtenção de linhas isogênicas de feijoeiro contrastantes para resistência à ferrugem. **Brasilian Journal of Genetics**, v. 20, p. 258, 1997. (Suplement).
- FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., ZAMBOLIM, L., PAULA JÚNIOR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. de. Identificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus* no estado de Minas Gerais, Brasil. **Fitopatologia brasileira**, v. 24, p. 166-169, 1999a.

- FALEIRO, F.G., ZAMBOLIM, L., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., PAULA JÚNIOR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. de. Sistema simplificado para nomenclatura e classificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus*. **Fitopatologia brasileira**, v. 24, p. 540-545, 1999b.
- FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., CORRÊA, R.X., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. de. RAPD markers linked to a block of genes conferring rust resistance to the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 399-402. 2000b.
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., CORRÊA, R.X., VINHADELLI, W.S., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. de. Ligação gênica da resistência à ferrugem e à antracnose na variedade de feijão Ouro Negro. **Revista Ceres**, v. 47, p. 375-382, 2000a.
- FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220 p.
- FERREIRA, C.F., BORÉM, A., CARVALHO, G.A., NIETSCHE, S., PAULA JÚNIOR, T.J., BARROS, E.G. de, MOREIRA, M.A. Identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência à raça 63.39 da mancha-angular do feijoeiro. **Bragantia**, v. 58, p. 247-252, 1999.
- FLOR, H.H. Host-parasite interactions in flax rust-its genetics and other implications. **Phytopathology**, v. 45, p. 680-685, 1955.
- FOUILLOUX, G. Bean anthracnose: new genes of resistance. **Bean Improvement Cooperative Annual Report**, v. 19, p. 36-37, 1976.
- FU, Y.K., DEYNZE, V.A., PAULS, R.P. **Methods in plant molecular biology and biotechnology**, [S.l.] CRC. 1993. p. 450.
- GEPTS, P. Phaseolin as an evolutionary marker. In: GEPTS, P. (Ed.). **Genetic resources of Phaseolus beans**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 215-241.
- GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 11ed. Piracicaba: Livraria Nobel S.A., 1985. 466 p.
- GRAFTON, K.F., WEISER, G.C., LITTLEFIELD, L.J. et al. Inheritance of resistance to two races of leaf rust in dry edible bean. **Crop Science**, v. 25, p. 537-539, 1985.
- GUZMAN, P., GILBERTSON, R.L., NODARI, R., JOHNSON, W.C., TEMPLE, R.S., MANDALA, D., MKANDAWIRE, A.B.C., GEPTS, P. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Phytopathology**, v. 85, p. 60-607, 1995.

- HALEY, S.D., AFANDOR, L., KELLY, J.D. Selection for monogenic pest resistance traits with coupling-and repulsion-phase RAPD markers. **Crop Science**, v. 34, p. 1061-1066, 1994.
- HALEY, S.D., MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., BYRUM, J., KELLY, J.D. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 86, p. 505-512, 1993.
- HULBERT, S.H. Structure and evolution of the *rp1* complex conferring rust resistance in maize. **Annual Review Phytopathology**, v. 35, p. 293-310, 1997.
- IBGE. **Pesquisa de orçamentos familiares**. Rio de Janeiro: IBGE, 1994. 336 p.
- JOHNSON, W.C., GUZMAN, P., MANDALA, D., MKANDAWIRE, A.B.C., TEMPLE, R.S., GILBERTSON, R.L., GEPTS, P. Molecular tagging of the *bc-3* gene for introgression into Andean common bean. **Crop Science**, v. 37, p. 248-254, 1997.
- JUNG, G., COYNE, D.P., SKROCH, P.W., NIENHUIS, J., ARNAUD-SANTANA, E., BOKOSI, J., ARIYARATHNE, H., STEADMAN, J.R., BEAVER, J., KAEPLER, S. Molecular markers associated with plant architecture and resistance to common blight, web blight, and rust in common bean. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 106, p. 601-604, 1996.
- KELLY, J.D., HALEY, S.D., AFANADOR, L., MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R. Application of RAPD markers for disease resistance breeding in beans. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, v. 37, p. 15-16, 1994.
- KELLY, J.D., MIKLAS, P.N. Proposed symbols for rust resistance genes. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, v. 4, n. 1, p. 1-4, 1998a.
- KELLY, J.D., MIKLAS, P.N. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. **Molecular Breeding**, v. 4, p. 1-11, 1998b.
- KEMPTHORNE, O. **An introduction to the genetic statistics**. New York: John Wiley, 1966. 545p.
- LANZA, M.A., PAULA JÚNIOR, T.J., VINHADELLI, W.S., MORANDI, M.A.B., BARROS, E.G. de, MOREIRA, M.A. Resistência à antracnose em cultivares de feijoeiro-comum recomendadas para Minas Gerais. **Fitopatologia brasileira**, v. 22, p. 560-562, 1997.
- LEE, M. **DNA markers and plants breeding programs**. [S.l.]: Academic Press, Inc. Advances in Agronomy, p.344, 1995. v. 55.

- LI, C.C. **Path analysis - a primer**. Boxwood: Pacific Grove, 1975. 346 p.
- MACLEAN, D.J., BRAITHWAITE, K.S., IRVINE, J.A.G., MANNERS, J.M., GROTH, J.V. MEINERS, J.P. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) reveals relationships among diverse genotypes in Australian and American collections of *Uromyces appendiculatus*. **Phytopathology**, v.85, p. 757-765, 1995.
- MASTENBROECK, C. A breeding program for resistance in dry shell haricot beans based on a new gene. **Euphytica**, v. 9, p. 177-185, 1960.
- MEINERS, J.P. Genetics of disease resistance in edible legumes. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 19, p. 189-209, 1981.
- MENARIM, H., ALZATE-MARIN, A.L., BARROS, E.G. de, MOREIRA, M.A. Identificação de marcador molecular RAPD ligado ao gene *Co-6* de resistência para antracnose do feijoeiro. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n. 3, p.184, 1998. (Suplement).
- MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., KELLY, J.D. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. **Theor. Appl. Genet.**, v. 85, p. 745-749, 1993.
- MIRANDA, J.E.C., CRUZ, C.D., PEREIRA, A.S. Análise de trilha e divergência genética de cultivares e clones de batata-doce. **Revista Brasileira de Genética**, v.11, p.881-904, 1988.
- MONTGOMERY, D.C., PECK, E.A. **Introduction to linear regression analysis**. New York: John Wiley and Sons, 1981. 504 p.
- MORA-NUÑES, O.A., VIEIRA, C., ZAMBOLIM, L. Variedades diferenciadoras de feijão para identificação de raças fisiológicas de *Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth. **Revista Ceres**, v. 39, p. 391-404, 1992.
- NIETSCHKE, S. **Identificação de raças de *Phaeoisariopsis griseola* e determinação de fontes de resistência em *Phaseolus vulgaris***. Viçosa, MG: UFV, 1997. 47p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- NIETSCHKE, S., CARVALHO, G.A., BORÉM, A., PAULA JÚNIOR, T.J., FERREIRA, C.F.; BARROS, E.G. de, MOREIRA, M.A. Avaliação de fontes de resistência de feijão à mancha-angular (*Phaeoisariopsis griseola*). **Fitopatologia brasileira**, v. 22, p. 290, 1997. (Resumo).

- NIETSCHE, S. **Mancha-angular do feijoeiro-comum: Variabilidade genética do patógeno e identificação de marcadores moleculares ligados à resistência.** Viçosa, MG: UFV, 2000. 65p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- OPENSHAW, S.J., JARBOE, S.G., BEAVIS, W.D. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: LAWER, R. (Ed.). **Joint plant breeding symposium on analysis data.** Corvallis: Oregon State University, 1994. p.41-43.
- PASTOR-CORRALES, M.A. Enfermedades del frijol causadas por hongos. In: LÓPEZ, M., FERNANDEZ, F., SCHOONHOVEN, A. (Eds.). **Frijol: investigación y producción.** Cali: PUND-CIAT, 1985. p.172-180.
- PASTOR-CORRALES, M.A., ERAZO, O. Inheritance of anthracnose resistance in common bean accession G2333. **Plant Disease**, v. 78, p. 959-962, 1994.
- PASTOR-CORRALES, M.A., JARA, C.E. La evolucion de *Phaeoisariopsis griseola* con el frijol comum en América Latina. **Fitopatologia Colombiana**, v.19, n.1, p.15-22, 1995.
- PASTOR-CORRALES, M.A. Recomendaciones y acuerdos del *primer* taller de antracnosis en América Latina. In: PASTOR-CORRALES, M.A. (Ed.). **La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina.** Cali, Colômbia: CIAT. 1992. p. 240-250. (Doc. de trabajo nº 113).
- PASTOR-CORRALES, M.A., TU, J.C. Antracnose. In: **SCHWARTZ AND CORRALES. Bean production problems in the tropics.** Cali: CIAT, 1989. p.77-93.
- PAULA JÚNIOR, T.J., ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J., BORÉM, A. (Eds.) **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas.** Viçosa, MG: Editora UFV, 1998. p. 375-433.
- PELOSO, M.J. Del. Antracnose do feijoeiro no Estado de Minas Gerais -Brasil. In: PASTOR-CORRALES, M. (Ed). **La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina.** Cali: CIAT, 1992. p. 86-108. (Doc de trabajo, 113).
- PEREIRA, A.A. **Reação de variedades diferenciadoras e um sistema de nomenclatura para caracterizar a variabilidade de *Uromyces phaseoli typica* Arth.** Viçosa, MG: UFV, 1976. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa,
- PIO-RIBEIRO, G., CHAVES, G.M. Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib. que ocorrem em alguns municípios de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro. **Experientiae**, v. 19, p. 95-118, 1975.

- RAGAGNIN, V.A., VINHADELLI, W.S., FALEIRO, F.G., CORRÊA, R.X., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. de. Identificação de marcadores RAPD ligados a genes de resistência do feijoeiro à ferrugem. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n. 3, p.389, 1998. (Suplement).
- RAMALHO, M.A.P., ANDRADE, L.A.B., TEIXEIRA, N.C.S. Correlações genéticas e fenotípicas entre caracteres do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Prática**, v.3, p.63-70, 1979.
- RAMALHO, M.A., SANTOS, J.B. dos. Melhoramento do feijão. **Informe Agropecuário**, v. 8, p. 16-19, 1982.
- RAMALHO, M.A., SANTOS, J.B., PEREIRA FILHO, I.A. Choise of parents for dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) breeding. **Revista Brasileira de Genética**, v. 11, p. 391-400, 1988.
- RAVA, C., MOLINA, J., KAUFFMANN, M. et al. Determinación de razas fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* en Nicaragua. **Fitopatologia brasileira**, v. 18, p. 388-391, 1993.
- RAVA, C., PURCHIO, A., SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, p. 167-172, 1994.
- ROUTMAN, E., CHEVERUD, J. A rapid method of scoring simple sequence repeat polymorphisms with agarose gel electrophoresis. **Mammalian Genome**, v. 5, n. 3, p. 187-188, 1994.
- SANTOS, C.A.F., MENEZES, E.A., PAINI, J.N., CRUZ, C.D. Coeficiente de trilha no estudo dos componentes primários e secundários na produção de grãos de Guandu (*Cajanus cajan* (L.) Mill sp.). **Revista Ceres**, v.41, p.299-305, 1994.
- SANTOS, P.C, CARDOSO, A.A., VIEIRA, C., SILVA, J.C. Herdabilidade e correlações do rendimento com seus componentes, em dois cruzamentos de feijão. **Revista Ceres**, v.33, p.404-412, 1986.
- SARTORATO, A., NIETSCHKE, S., BARROS, E.G. de, MOREIRA, M.A. Inheritance of angular leaf spot resistance and RAPD markers linked to disease resistance gene in common beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 42, p. 21-22, 1999.
- SHAVER, D.L. Conversions for earliness in maize inbreds. **Maize Genet. Coop. Nwsltr.**, v. 50, p. 20-23, 1976.

- SHEN, K.A., MEYERS, B.C., ISLAM-FARIDI, M.N., CHIN, D.B., STELLY, D.M., MICHELMORE, R.W. Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide *primers* map clusters of resistance genes in lettuce. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, p. 815-23, 1998.
- SINGH, S. Bean genetics. In: VAN SCHOONHEVEN, A., VOYSEST, O. (Eds). **Common beans: research for crop improvement**. Wallingford: CAB International, 1991. p.199 - 286.
- SINGH, S.P., GUTIÉRREZ, J.A. Geographical distribution of the DL<sub>1</sub> and DL<sub>2</sub> genes causing hybrid dwarfism in *Phaseolus vulgaris* L., their association with seed size, and their significance to breeding. **Euphytica**, v. 33, p. 337-345, 1984.
- SNEATH, P.H., SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W. H. Freeman, 1973. 573 p.
- STAVELY, J.R., FREYTAG, G.F., STEADMAN, J.R., SCHWARTZ, H.F. The 1983 Bean Rust Workshop. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 26, p. 4-6, 1983.
- STAVELY, J.R. Genetic relationships of resistance in two broadly rust resistant beans. **Phytopathology**, v. 74, p. 834, 1984a. (Resumo).
- STAVELY, J.R. Genetics of resistance to *Uromyces phaseoli* in a *Phaseolus vulgaris* line resistant to most races of the pathogen. **Phytopathology**, v. 74, p. 339-344, 1984b.
- STAVELY, J.R., GRAFTON, K.F. Genetics of resistance to eight races of *Uromyces appendiculatus* in *Phaseolus vulgaris* cultivar Mexico 235. **Phytopathology**, v. 75, p. 1310, 1985. (Resumo).
- STAVELY, J.R. Pathogenic specialization in *Uromyces phaseoli* in the United States and rust resistance in beans. **Plant Dis.**, v. 68, p. 95-99, 1984c.
- STAVELY, J.R., PASTOR-CORRALES, M.A. Rust. In: SCHWARTZ, H.F., PASTOR-CORRALES, M.A. (Eds.). **Bean production problems in the tropics**. 2. ed. Cali: CIAT, 1989. p.159-194.
- STAVELY, J.R., KELLY, J.D., GRAFTON, K.F., STEINKE, J., STEADMAN, J.R., COYNE, D.P., LINDGREN, D.T., SILBERNAGEL, M.J. Recent rust resistant bean germplasm releases. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 37, p.247-248, 1994.
- VENCOVSKY, R., BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 496p.

- VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 1983. 231 p.
- VIEIRA, C. **O feijoeiro comum: cultura, doenças e melhoramento**, Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 1967. 220 p.
- VIEIRA, C., PAULA JÚNIOR, T.J., BORÉM, A. **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. Viçosa: MG: UFV, 1998. 596p.
- VIEIRA, C., BORÉM, A., RAMALHO, M.A.P. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 817 p.
- VINHADELLI, W.S., FALEIRO, F.G., MESQUITA, A.G.G., PAULA JÚNIOR, T.J., CARVALHO, G.A., BARROS, E.G. de, MOREIRA, M.A. Inoculação simultânea dos fungos causadores da ferrugem e da antracnose do feijoeiro. **Fitopatologia brasileira**, v. 22, p. 319-320, 1997. (Suplement).
- YOUNG, R., TANKSLEY, S.D. Restriction fragment length polymorphism maps and the concept of graphical genotypes. **Theor. Appl. Genet.**, v. 77, p. 95-101, 1989.
- YOUNG, R., KELLY, J.D. Characterization of the genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean differential cultivars. **Plant Disease**, v. 80, p. 650-654, 1996.
- YOUNG, R.A., KELLY, J.D. RAPD markers linked to three major anthracnose resistance genes in common bean. **Crop Science**, v. 37, p. 940-946, 1997.
- WEBSTER, D.M., AINSWORTH, P.M. Inheritance and stability of a small pustule reaction of snap bean to *Uromyces appendiculatus*. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.**, v. 113, p. 938-940, 1988.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, A., TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- WRIGHT, S. Correlation and causation. **Journal of Agricultural Research**, v.20, p.557-585, 1921.
- ZAITER, H.Z., COYNE, D.P., STEADMAN, J.R. Inheritance of resistance to a rust isolate in beans. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, v. 32, p. 126-127, 1989.
- ZAUMEYER, W.J., HARTER, L.L. Inheritance of resistance to six physiologic races of bean rust. **Journal of Agricultural Research**, v. 63, p. 599-621, 1941.

