

**FÁBIO GELAPE FALEIRO**

**MELHORAMENTO E MAPEAMENTO GENÉTICO DO FEIJOEIRO-COMUM:  
ANÁLISE DE CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS, MORFOLÓGICAS,  
MOLECULARES E DE RESISTÊNCIA A DOENÇAS**

**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 *Doctor Scientiae*.**

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2000**

***Aos meus pais Víctor e Adélia.***

***Aos meus irmãos Clarice, Cláudia, Fernando, Cleunice e Francisco.***

***À minha sogra Maria Helena.***

***Ao meu cunhado Anderson.***

***À minha esposa, Alessandra.***

***Aos meus amigos.***

## **AGRADECIMENTO**

A Deus, pela vida.

Aos meus queridos pais, Víctor e Adélia, exemplo de amor e dedicação aos filhos.

Aos meus estimados irmãos, Clarice, Cláudia, Fernando, Cleunice e Francisco.

À minha querida e amada esposa, Alessandra, pela alegria que trouxe à minha vida.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro, indispensável durante o curso.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e ao Agricultural Research Service do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, pelo fornecimento de sementes utilizadas neste trabalho.

Ao Prof. Everaldo Gonçalves de Barros, pela competente orientação, amizade e incentivo durante todo o curso e também pelo exemplo de dedicação às atividades de ensino e pesquisa na UFV.

Ao Professor Conselheiro, Maurílio Alves Moreira, pelo exemplo de trabalho e busca incansável por recursos tecnológicos e financeiros que tem possibilitado a formação de inúmeros profissionais na UFV.

Ao Professor Conselheiro, Sérgio Hermínio Brommonschenkel, pelos valiosos ensinamentos na área de resistência de plantas a doenças e pelas valiosas sugestões.

Aos professores Clibas Vieira, Cosme Damião Cruz e Aluízio Borém pelos importantes ensinamentos na área de genética quantitativa e de melhoramento de plantas fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Professor Marcelo Coutinho Picanço, a quem sempre serei grato pela amizade e pelos primeiros e fundamentais ensinamentos na atividade científica.

Ao amigo Prof. Ronan Xavier Corrêa, pelos conselhos, amizade sincera e pelos primeiros ensinamentos de técnicas de Biologia Molecular e a sua esposa Solange, pelo apoio constante.

Ao amigo Ivan, pela grande ajuda e ensinamentos na área de mapeamento genético.

Aos colegas de trabalho: Ana Lília, Trazilbo, Sílvia, Eveline, Valéria, Ronan, Vilmar, Cynthia, Márcia, Pedro, Maria Luiza, Marta, Marco Antônio, Cláudia, Wagner, Rita, Abelmon e Jay pela ajuda e agradável convivência.

Ao amigo Vilmar A. Ragagnin e aos estagiários Thiago Lívio e Charles pela valiosa ajuda nos experimentos de campo, casa-de-vegetação e laboratório.

Ao responsável técnico Carlos e funcionários da Estação Experimental de Coimbra, pelo apoio constante nos experimentos de campo.

Ao Sr. José Pinto Rosa, pela execução dos cruzamentos artificiais entre as variedades de feijão e pelo apoio constante nas atividades na casa de vegetação.

Às secretárias do curso de pós-graduação em Genética e Melhoramento, Maria da Conceição L. Vieira e Rita de Cássia R. Cruz que sempre me deram o apoio necessário.

A todos os funcionários da UFV, principalmente do BIOAGRO.

A todos os meus mestres da E.E. Serafim Ribeiro de Rezende, da Central de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal e da Universidade Federal de Viçosa, que muito contribuíram para o meu crescimento profissional, científico e humano.

A todos amigos e colegas de curso que, certamente, contribuíram para a conclusão de mais este importante objetivo.

Ao povo brasileiro que, por meio dos impostos, custearam minha formação escolar e profissional, minha sincera gratidão, hoje e sempre.

## **BIOGRAFIA**

FÁBIO GELAPE FALEIRO, filho de Vítor Gelape Faleiro e Adélia Azevedo Gelape, nasceu em Carmópolis de Minas, MG, em 21 de abril de 1973.

Cursou o primário na Escola Estadual Serafim Ribeiro de Rezende 1.4.0.B., em Florestal, MG.

Em dezembro de 1990, concluiu o curso de Técnico em Agropecuária na Central de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal (CEDAF), em Florestal, MG.

Em 1991, iniciou o curso superior na Universidade Federal de Viçosa, colando grau em dezembro de 1995 como Engenheiro-Agrônomo. Na UFV desenvolveu atividades de monitoria na disciplina Citologia (1992/1994) e de Iniciação Científica na área de Genética Molecular Aplicada ao Melhoramento Vegetal (1994/1995).

Em março de 1996, iniciou o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento, na área de Genética Molecular, na UFV, defendendo tese em 15 de julho de 1997. Em agosto do mesmo ano, iniciou o Curso de Doutorado em Genética e Melhoramento, nas áreas de Genética Molecular e Quantitativa, defendendo tese em 28 de setembro de 2000. Atualmente está coordenando atividades de pesquisa no Laboratório de Biotecnologia – Biologia Molecular do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC/CEPLAC).

## CONTEÚDO

<b>RESUMO.....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xiii</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>04</b>
1. Mapeamento genético do feijoeiro-comum.....	04
2. Escolha de genitores para obtenção de populações segregantes .....	06
3. Populações segregantes utilizadas no mapeamento genético.....	07
4. Marcadores genéticos utilizados no mapeamento.....	10
5. Organização genômica de genes de resistência raça-específica e suas implicações na evolução de novas especificidades de reconhecimento e no melhoramento visando resistência a doenças.....	12
6. Aplicações do mapeamento genético no melhoramento de plantas.....	18
7. Características importantes no melhoramento do feijoeiro-comum.....	20
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>22</b>
<b>RESISTÊNCIA DE LINHAGENS DE FEIJOEIRO A QUATRO RAÇAS DE <i>Uromyces appendiculatus</i> COLETADAS NO ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL.....</b>	<b>22</b>

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	30
 <b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>31</b>
<b>OBTENÇÃO DE MARCADORES RAPD LIGADOS A UM BLOCO GÊNICO RELACIONADO À RESISTÊNCIA DO FEIJOEIRO-COMUM A <i>Uromyces appendiculatus</i>.....</b>	<b>31</b>
1. INTRODUÇÃO.....	31
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	39
 <b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>40</b>
<b>LIGAÇÃO GÊNICA DA RESISTÊNCIA À FERRUGEM E À ANTRACNOSE NA VARIEDADE DE FEIJOEIRO-COMUM OURO NEGRO.....</b>	<b>40</b>
1. INTRODUÇÃO.....	40
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	47
 <b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>48</b>
<b>MAPEAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA DO FEIJOEIRO-COMUM À FERRUGEM, ANTRACNOSE E MANCHA-ANGULAR COM O AUXÍLIO DE MARCADORES RAPD.....</b>	<b>48</b>
1. INTRODUÇÃO.....	48
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
2.1. Material genético.....	51
2.2. Avaliação da resistência a doenças.....	52
2.2.1. Resistência à ferrugem.....	52
2.2.2. Resistência à antracnose.....	53

2.2.3. Resistência à mancha-angular.....	53
2.3. Análise dos marcadores moleculares.....	54
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
3.1. Segregação e ligação genética entre os genes de resistência.....	57
3.2. Validação do uso de diferentes marcadores moleculares.....	59
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	63
<b>CAPÍTULO 5.....</b>	<b>64</b>
<b>ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS GENÉTICOS, CORRELAÇÕES FENOTÍPICAS, GENOTÍPICAS E AMBIENTAIS E ANÁLISE DE TRILHA EM RIL's DE FEIJOEIRO-COMUM (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....</b>	<b>64</b>
1. INTRODUÇÃO.....	64
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	66
2.1. Material genético.....	66
2.2. Delineamento experimental.....	67
2.3. Caracteres avaliados.....	67
2.4. Análises de variância.....	68
2.5. Parâmetros genéticos e seus estimadores.....	68
2.6. Coeficientes de correlações genotípicas, fenotípicas e ambientais.....	69
2.7. Análise de trilha.....	70
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
3.1. Análise de variância e estimativas de parâmetros genéticos.....	72
3.2. Coeficientes de correlação.....	74
3.3. Análise de trilha.....	76
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	80
<b>CAPÍTULO 6.....</b>	<b>81</b>
<b>COMPARAÇÃO DOS DELINEAMENTOS EM BLOCOS CASUALIZADOS E COM TESTEMUNHAS INTERCALARES NA ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS GENÉTICOS EM RIL's DE FEIJOEIRO-COMUM (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....</b>	<b>81</b>
1. INTRODUÇÃO.....	81
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	83
2.1. Material genético.....	83

2.2. Delineamentos experimentais.....	84
2.3. Caracteres avaliados.....	84
2.4. Análises de variância.....	85
2.5. Parâmetros genéticos analisados e seus estimadores.....	86
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	93
<b>CAPÍTULO 7.....</b>	<b>94</b>
<b>SELEÇÃO DE LINHAGENS DE FEIJOEIRO-COMUM (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) COM BASE NA PRODUÇÃO, TIPO DE GRÃO, HÁBITO DE CRESCIMENTO E RESISTÊNCIA A DOENÇAS.....</b>	<b>94</b>
1. INTRODUÇÃO.....	94
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	96
2.1. Material genético.....	96
2.2. Ensaio de campo.....	97
2.2.1. <i>Delineamento experimental</i> .....	97
2.2.2. <i>Caracteres avaliados</i> .....	97
2.2.3. <i>Análises de variância</i> .....	97
2.2.4. <i>Parâmetros genéticos e comparação entre as médias</i> .....	98
2.3. Avaliação da resistência a doenças.....	99
2.3.1. <i>Resistência à ferrugem</i> .....	99
2.3.2. <i>Resistência à antracnose</i> .....	100
2.3.3. <i>Resistência à mancha-angular</i> .....	100
2.3.4. <i>Seleção das linhagens mais resistentes</i> .....	101
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	103
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	110
<b>CAPÍTULO 8.....</b>	<b>111</b>
<b>CARACTERIZAÇÃO DE 154 RIL's E MAPEAMENTO DE LOCOS DE CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS ASSOCIADAS AO CICLO E AO RENDIMENTO DO FEIJOEIRO-COMUM (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....</b>	<b>111</b>
1. INTRODUÇÃO.....	111
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	113
2.1. Material genético.....	113
2.2. Avaliação da resistência a doenças.....	114
2.2.1. <i>Resistência à ferrugem</i> .....	114

2.2.2. Resistência à antracnose.....	115
2.2.3. Resistência à mancha-angular.....	115
2.3. Análise das características morfológicas.....	116
2.4. Análise dos marcadores moleculares.....	116
2.5. Análise das características quantitativas.....	117
2.6. Construção do mapa genético de ligação.....	119
2.7. Identificação e mapeamento de QTL's.....	119
2.8. Divergência genética.....	120
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>122</b>
3.1. Análise das diferentes características nas 154 RIL's e nos progenitores Ouro Negro e Rudá.....	122
3.1.1. Análise de segregação das características de resistência, morfo- lógicas e moleculares.....	123
3.1.2. Análise de variância, correlações e herdabilidade das caracterís- ticas quantitativas.....	125
3.2. Mapa genético de ligação.....	128
3.3. Identificação e mapeamento de QTL's.....	128
3.4. Divergência genética.....	134
<b>4. RESUMO E CONCLUSÕES.....</b>	<b>137</b>
 <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	 <b>138</b>
 <b>APÊNDICE.....</b>	 <b>159</b>

## RESUMO

FALEIRO, Fábio Gelape, D.S., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2000.  
**Melhoramento e mapeamento genético do feijoeiro-comum: análise de características quantitativas, morfológicas, moleculares e de resistência a doenças.** Professor Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Professores Conselheiros: Maurílio Alves Moreira e Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Para caracterizar novas fontes de resistência à ferrugem, oito linhagens desenvolvidas pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos foram inoculadas com quatro raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus* coletadas no Brasil. Os cultivares Ouro Negro e US Pinto 111 foram utilizados como padrões de resistência e suscetibilidade, respectivamente. As linhagens BelMiDak-RMR-12 e BelMiDak-RR-3 destacaram-se como as mais resistentes e o cultivar Ouro Negro apresentou um nível de resistência igual às melhores linhagens norte-americanas. Objetivando mapear genes relacionados à resistência do feijoeiro-comum à ferrugem, antracnose e mancha-angular, foram desenvolvidas diferentes populações segregantes ( $F_2$  e linhas recombinantes endogâmicas - RIL's). As análises de segregação revelaram diferentes modos de herança da resistência a cada uma das raças fisiológicas utilizadas. Análises de ligação genética revelaram que diferentes genes de resistência à ferrugem e à antracnose estavam ligados entre si. Os genes de resistência à mancha-angular também foram mapeados juntos, porém em outro grupo de ligação. Foram identificados dois marcadores moleculares RAPD (OX11<sub>630</sub> e OF10<sub>1050</sub>), flanqueando o bloco gênico que confere resistência à ferrugem e três (OBA16<sub>669</sub>, OBA16<sub>583</sub> e OAD9<sub>3210</sub>) ligados ao bloco gênico que confere resistência à mancha-angular. Com relação a características

quantitativas, 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. Os caracteres “número médio de vagens por planta” e “número médio de sementes por vagem” apresentaram maiores correlações genotípicas com a produção por planta. O carácter “número médio de sementes por planta” apresentou o maior efeito direto sobre a produção por planta. Outro objetivo do trabalho foi o de comparar dois delineamentos experimentais para estimar diferentes parâmetros genéticos obtidos a partir da avaliação de 154 RIL's de feijoeiro-comum: um delineamento em blocos casualizados (DBC) e o outro usando um ensaio comparativo, no qual as linhagens foram representadas por parcelas únicas avaliadas juntamente com testemunhas intercalares (DTI). A média das características e a precisão experimental foi semelhante nos dois delineamentos. O DBC teve maior capacidade de detecção de variabilidade genética e maior acurácia que o DTI. Com base em diferentes características de produção, resistência a doenças, tipo de grão e hábito de crescimento, dez RIL's foram selecionadas e enviadas ao Ensaio Preliminar de Linhagens (EPL). As RIL's selecionadas trazem vantagens como a introdução de importantes genes de resistência em feijão com grão tipo carioca e bege e também o desenvolvimento de linhagens de feijão com grão preto produtivas, resistentes a doenças e com hábito de crescimento não prostrado (IIb). Com base em 14 características de resistência a doenças, sete características morfológicas, 49 marcadores moleculares e oito características quantitativas, foi construído um mapa de ligação gênica e mapeado os locos de características quantitativas relacionadas ao ciclo e ao rendimento do feijoeiro-comum. Adotando um valor de LOD de 4,0 e uma frequência máxima de recombinação de 0,40, 43 marcadores, que segregaram na proporção esperada (1:1) a  $P < 0,05$  foram mapeados em nove grupos de ligação, cobrindo uma distância de recombinação total de 247,8 cM. O grupo 1 apresentou maior número de marcadores, sendo o grupo onde estão concentrados todos os genes de resistência à ferrugem e à antracnose. Os resultados encontrados neste trabalho lançaram bases para o desenvolvimento de mapas específicos saturados e de utilidade em programas de melhoramento que visem à resistência a doenças e o aumento do rendimento do feijoeiro-comum.

## ABSTRACT

FALEIRO, Fábio Gelape, D.S., Universidade Federal de Viçosa, September, 2000. **Breeding and genetic mapping of the common bean: quantitative, morphological, molecular and disease resistance evaluation.** Advisor: Everaldo Gonçalves de Barros. Advisory Committee Members: Maurílio Alves Moreira and Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Quantitative, morphological, molecular, and disease resistance were evaluated in common bean for breeding and genetic mapping purposes. To characterize new resistance sources to rust, eight lines developed at the United States Department of Agriculture were inoculated with four races of *Uromyces appendiculatus* collected in Brazil. Cultivars Ouro Negro and US Pinto 111 were used as resistance and susceptibility standards, respectively. Lines BelMiDak-RMR-12 and BelMiDak-RR-3 were the most resistant ones. Cultivar Ouro Negro presented a resistance level comparable to the most resistant american lines. To map genes related to the common bean resistance to rust, anthracnose and angular leaf spot, different segregating populations ( $F_2$  and recombinant inbred lines - RILs) were developed. Segregation analyses revealed different modes for resistance inheritance to the three pathogens used. Genetic linkage analyses revealed that genes for rust and anthracnose, but not for angular leaf spot resistance, were linked in the same linkage group. Two random amplified polymorphic DNA markers (OX11<sub>630</sub> and OF10<sub>1050</sub>) were identified flanking the gene block conferring resistance to rust. Three markers (OBA16<sub>669</sub>, OBA16<sub>583</sub> and OAD9<sub>3210</sub>) were linked to the gene block conferring resistance to angular leaf spot. Different genetic parameters, phenotypic, genotypic and environmental

correlations, were estimated as well as the direct and indirect effect of each characteristic on yield using the path analysis. Mean number of pods and mean number of seeds per pod presented the highest genotypic correlation with yield per plant. The character mean number of seeds per plant present the highest direct effect on yield per plant. Another objective of the present work was to compare two experimental designs to estimated different genetic parameters obtained from the evaluation of 154 common bean RILs: a random block design (RBD) and a comparative design in which the lines were represented by unique parcels evaluated together with intercalar witnesses (IWD)). The averages of the characteristics and the experimental precision were similar in both types of design. RBD was better to detect genetic variability and was more accurate than IWD. Based on different yield related characters, disease resistance, grain type, and growth habit, ten RILs were selected to be evaluated in the Preliminary Line Assay. These RILs may lead to varieties with carioca or bege type seeds resistant to several diseases and to varieties with black seeds, resistant to diseases, productive and with non-prostrate growth habit (type IIb). Based on 14 disease resistance loci, seven morphological traits, and 49 molecular markers a genetic linkage map was built and eight quantitative trait loci related with cycle and yield were mapped. Using a LOD score of 4.0 and a recombination frequency of 0.40, 43 marcadores segregating 1:1 with a  $P < 0.05$  were mapped into nine linkage groups, covering a total recombination distance of 247.8 cM. Linkage group number 1 grouped the highest number of markers. The resistance genes for rust and anthracnose mapped to this group. The results obtained in this work are the basis for the development of specific saturated maps to be used in common bean breeding programs aiming at the disease resistance and yield.

## INTRODUÇÃO

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é cultivado em mais de 12 milhões de hectares (SINGH, 1989) e constitui uma importante fonte de proteína na dieta de mais de 500 milhões de pessoas na África e América Latina (PACHICO, 1989). O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão-comum, apresentando uma área de plantio superior a 5 milhões de hectares e um consumo anual “per capita” de mais de 10 Kg (IBGE, 1994). O hábito de consumo de feijão pela família brasileira, associado à sua ampla adaptação climática, faz com que esta cultura esteja distribuída por todo território nacional e tenha destacada importância nutricional, econômica e social.

Apesar da grande importância desta cultura e de sua utilização para identificar ou confirmar importantes conceitos genéticos como a lei da segregação (MENDEL, 1865), a diferença fundamental entre fenótipo e genótipo e a base científica da seleção (JOHANNSEN, 1903, 1926), poucos trabalhos sobre caracterização genética têm sido conduzidos. Até 1991, apenas alguns marcadores morfológicos como cor de flor e semente tinham sido usados para o desenvolvimento de mapas de ligação rudimentares (BASSETT, 1991). Mais recentemente, têm sido usados para o mapeamento genético do feijoeiro, marcadores isoenzimáticos e outros marcadores protéicos (VALLEJOS e CHASE, 1991a, 1991b; VALLEJOS et al., 1992), marcadores citogenéticos (ASHRAF e BASSETT, 1987; ZHENG et al., 1991) e marcadores moleculares do DNA como o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (VALLEJOS et al., 1992; NODARI et al., 1993; JUNG et al., 1994; McCLEAN et al., 1994; MIKLAS et al., 1998).

A utilização dos marcadores moleculares do DNA tem permitido a construção de mapas genéticos para várias espécies vegetais devido à disponibilidade de um grande número de marcas genéticas neutras, altamente polimórficas, cuja herança pode ser acompanhada facilmente sem a influência do ambiente (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

No contexto do melhoramento de plantas, os mapas genéticos são de grande importância pois possibilitam a cobertura e análise completa de genomas, a decomposição de características genéticas complexas nos seus componentes mendelianos, a localização das regiões genômicas que controlam caracteres de importância, a quantificação do efeito destas regiões na característica estudada e a canalização de toda esta informação para auxiliar em programas de melhoramento (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995). Para a construção de um mapa genético é necessário a integração de técnicas que incluem o desenvolvimento de linhagens progenitoras e populações segregantes adequadas, a identificação dos genótipos nos locos marcadores através de técnicas de biologia molecular, a associação desses locos a características de interesse e a utilização de diversas técnicas de análise estatística e computacional para a obtenção de estimativa de ligação e distância entre marcadores.

Para o desenvolvimento de linhagens e populações adequadas têm sido utilizadas progênies  $F_2$  (CHAPARRO et al., 1994), progênies provenientes de retrocruzamentos (GRATTAPAGLIA e SEREDOFF, 1994; PELTIER et al., 1994), progênies  $F_1$  (AL-JANAB et al., 1993; YU e PAULS, 1993) e linhas endogâmicas recombinantes (RIL's - *Recombinant Inbred Lines*) (HALEY et al., 1993; McCLEAN et al., 1994; JUNG et al., 1994). Dentre estes tipos de materiais genéticos, as RIL's merecem destaque especial para o mapeamento. Neste tipo de população segregante, cada linha endogâmica é multiplicada por várias sementes (que darão origem a plantas com genótipos idênticos), permitindo o estudo da base genética de várias características e com repetições. A utilização de RIL's permite, por exemplo, a execução de vários testes de resistência da população de plantas a patógenos diferentes ou a raças fisiológicas distintas de um mesmo patógeno. O mapeamento desses genes de resistência é de grande importância para um melhor entendimento de sua organização e localização cromossômica, tendo em vista o uso de marcadores para seleção indireta ou a clonagem e seqüenciamento desses genes.

Em razão das considerações anteriores, o presente trabalho foi desenvolvido visando alcançar aos seguintes objetivos: 1) avaliar o comportamento de diferentes linhagens de feijoeiro-comum quanto à resistência à ferrugem visando a identificação de novas fontes de resistência (Capítulos 1); 2) mapear genes relacionados à resistência do feijoeiro-comum à ferrugem, antracnose e mancha-angular com o auxílio de marcadores moleculares RAPD (Capítulos 2, 3 e 4); 3) desenvolver populações segregantes como linhas endogâmicas recombinantes (RIL's) de feijoeiro-comum (*P. vulgaris* L.) com base em um cruzamento intra-específico de variedades contrastantes para diferentes características, principalmente resistência a doenças (Capítulo 4); 4) caracterizar a população de RIL's de feijoeiro-comum com base em características quantitativas, morfológicas, moleculares e de resistência a doenças úteis ao melhoramento e ao mapeamento genético do feijoeiro-comum (Capítulos 5, 7 e 8); 5) estimar parâmetros genéticos, correlações genotípicas, fenotípicas e ambientais e por meio da análise de trilha, quantificar os efeitos diretos e indiretos de características quantitativas em RIL's de feijoeiro-comum sobre a produção por planta (Capítulo 5); 6) comparar a eficiência dos delineamentos experimentais em blocos casualizados e com testemunhas intercalares na avaliação de características quantitativas (Capítulo 6); 7) com base nas características avaliadas, selecionar linhagens promissoras para a avaliação nos Ensaio Preliminares de Linhagens (EPL) realizados pela EMBRAPA - Arroz e Feijão (Capítulo 7); 8) construir um mapa parcial de ligação genética e mapear locos de características quantitativas associadas ao ciclo e ao rendimento do feijoeiro-comum (Capítulo 8); e 9) lançar bases para o desenvolvimento de mapas saturados específicos e de utilidade ao programa de melhoramento do feijoeiro, reunindo informações sobre diferentes características de produção e resistência a doenças (Capítulo 8).

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. Mapeamento genético do feijoeiro-comum

O feijoeiro-comum, *Phaseolus vulgaris* L., é uma leguminosa diplóide ( $2n = 2x = 22$ ) com um genoma relativamente pequeno, contendo 0,66 picogramas de DNA por genoma haplóide, o que equivale a  $6,33 \times 10^8$  pares de nucleotídeos (ARUMUGANATHAN e EARLE, 1991).

Os trabalhos de mapeamento genético do feijoeiro-comum tiveram início na década de 60 quando LAMPRECHT (1961a) construiu um mapa de ligação. A partir desta época, numerosos trabalhos de ligação entre genes marcadores têm surgido (LAMPRECHT, 1961b; PRAKKEN, 1972; NAGATA e BASSETT, 1984; STAVELY, 1984b; WEEDEN e LIANG, 1985; KYLE et al., 1986; PARK e TU, 1986; TEMPLE e MORALES, 1986; AWUMA e BASSETT, 1988; GEPTS, 1988). Entretanto, vários autores (PRAKKEN, 1970, 1972, 1974; BASSETT, 1988; BASSETT e AWUMA, 1988; LEAKEY, 1988) têm lançado dúvidas sobre a interpretação e validade de alguns dados publicados por LAMPRECHT (1961a).

BASSETT (1991) publicou um mapa de ligação revisado do feijoeiro-comum, o qual consistia de 13 grupos de ligação que incluem genes que controlam, em sua maioria, características morfológicas e de pigmentação, tais como cor de flor e semente. Muitas destas características são sujeitas à epistasia e efeitos ambientais, dificultando a associação das mesmas a um cromossomo particular (DURANTE et al., 1977; SHUMANN et al., 1990).

Nesta última década, alguns marcadores isoenzimáticos têm sido usados para o mapeamento (VALLEJOS e CHASE, 1991a, 1991b) e o avanço das

técnicas de biologia molecular e o desenvolvimento de marcadores moleculares do DNA têm permitido a construção de mapas genéticos mais abrangentes para o feijoeiro-comum. VALLEJOS et al. (1992) mapearam 224 marcas de RFLP, nove locos para proteínas de semente, nove para isoenzimas e um para cor de flor e semente. Essas marcas foram agrupadas em 11 grupos de ligação, perfazendo um total de 960 cM. Dados de ligação parcial foram usados para estimar o comprimento total do genoma em 1200 cM. Esta estimativa, juntamente com a do tamanho físico do genoma, levaram à conclusão de que, no feijoeiro, 1 cM corresponde, em média, a 530.000 pares de nucleotídeos (pb). Esse valor é relativamente pequeno quando comparado com o de outras culturas importantes como o milho ( $1,521 \times 10^6$  pb/cM) (COE et al., 1990), a cevada ( $4,843 \times 10^6$  pb/cM) (HEUN et al., 1991), a alface ( $1,876 \times 10^6$  pb/cM) (KESSELI et al., 1990) e a batata ( $2,517 \times 10^6$  pb/cM) (GEBHARDT et al., 1989). O tamanho relativamente pequeno do genoma do feijoeiro-comum facilitaria o isolamento de genes via técnicas de caminhamento cromossômico (VALLEJOS et al., 1992).

Outro mapa bastante abrangente foi construído por NODARI et al. (1993). Esses autores analisaram a segregação de 152 marcadores, incluindo 115 locos RFLP, sete locos isoenzimáticos, oito locos RAPD e 19 locos correspondentes a 15 clones de genes conhecidos, um gene de resistência a vírus, um gene para cor de flor e um gene para cor da semente. Foram estabelecidos 15 grupos de ligação com um intervalo médio entre os marcadores de 6,5 cM, perfazendo um total de 827 cM.

Os marcadores RAPD também têm sido utilizados no mapeamento genético do feijoeiro-comum (JUNG et al., 1994, 1996; McCLEAN et al., 1994; MIKLAS et al., 1998). MIKLAS et al. (1998) mapearam 147 marcadores RAPD, dois SCARs e dois fenotípicos em 10 grupos de ligação para um comprimento total do mapa de 924 cM.

## **2. Escolha de genitores para obtenção de populações segregantes**

O primeiro passo para o desenvolvimento de um mapa genético é a escolha de cruzamentos de forma a maximizar a probabilidade de detectar polimorfismos entre os progenitores. A facilidade com a qual marcadores polimórficos são detectados varia muito de espécie para espécie. De maneira geral, espécies que se reproduzem por autofecundação, essencialmente homozigotas na grande

maioria dos locos, como o feijoeiro-comum, são menos polimórficas do que espécies que se reproduzem por fecundação cruzada, altamente heterozigotas (HELENTJARIS et al., 1986; GALE et al., 1990).

Um outro aspecto a ser considerado é a distância genética que separa as linhagens que darão origem à população segregante: quanto mais próximas, mais difícil a obtenção de polimorfismos. Assim, a escolha de linhagens sem ancestral comum ou mesmo cruzamentos interespecíficos para espécies de autofecundação, têm sido utilizados em maior ou menor escala para permitir ou otimizar o processo de análise de marcadores (BONIERBALE et al., 1988; TANKSLEY et al., 1988). Este último procedimento, no entanto, pode levar a distorções das proporções mendelianas esperadas pela supressão de recombinação entre os genomas sinteticamente hibridados. Essas distorções podem contrariar as premissas assumidas na análise estatística, afetando o cálculo das distâncias e ordem dos marcadores nos grupos de ligação (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995). Outros fatores que podem levar a distorções incluem a ligação de marcadores com genes deletérios e a classificação errônea de genótipos (FERREIRA et al., 1994).

Poucos polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) têm sido detectados dentro de cada *pool* gênico do feijoeiro-comum (CHASE et al., 1991). Este problema tem sido resolvido em outras espécies por meio do desenvolvimento de populações segregantes a partir de cruzamentos interespecíficos. Entretanto, esta não é uma opção viável para o feijoeiro-comum. Embora cruzamentos interespecíficos entre *P. vulgaris* e *P. coccineus* ou *P. acutifolius* possam ser obtidos (HUCL e SCOLES, 1985), as progênies resultantes são muito distantes do normal e possuem um valor limitado para o mapeamento. Uma alternativa para esse problema é a utilização de linhagens melhoradas que carregam introgressões tanto de *P. acutifolius* como de *P. coccineus*.

De modo geral, níveis moderados de polimorfismos podem ser detectados entre *pools* gênicos mesoamericanos e andinos do feijoeiro-comum. (CHASE et al., 1991; VALLEJOS et al., 1992; NODARI et al., 1993). VASCONCELOS et al. (1996) avaliaram a diversidade genética de 28 cultivares de feijoeiro-comum utilizando marcadores moleculares RAPD. Com base nas distâncias genéticas, os 28 cultivares foram separados em dois grandes grupos: o grupo A abrangendo cultivares do Centro de Domesticação Andino, e o grupo B, cultivares do Centro Mesoamericano.

A população segregante utilizada por VALLEJOS et al. (1992) consistia de progênie de retrocruzamento entre uma linhagem mesoamericana (XR-235-1-1) e um cultivar andino (Calima). NODARI et al. (1993) utilizaram uma população  $F_2$  derivada do cruzamento entre BAT 93 (mesoamericano) e Jalo EEP558 (andino). Os genótipos parentais foram escolhidos devido às diferenças em origem evolucionária, aloenzimas, tipo de faseolina e em várias características agrônômicas (KOENIG e GEPTS, 1989; SINGH et al., 1991a, 1991b).

A nova geração de marcadores moleculares, como o AFLP, tem eliminado a necessidade de cruzamentos entre progenitores geneticamente divergentes para maximizar o polimorfismo molecular, de modo que, qualquer cruzamento pode ser informativo para mapeamento genético. Essas novas tecnologias são particularmente importantes em espécies autógamas como o feijoeiro-comum.

### **3. Populações segregantes utilizadas no mapeamento genético**

Uma vez selecionados os progenitores, o desenvolvimento de progênie segregante composta de algumas dezenas de indivíduos é necessária para se obter uma amostra suficientemente grande de eventos meióticos. É esta amostra que será utilizada para estimar a frequência de recombinação genética entre os marcadores. Tradicionalmente, a população segregante utilizada para o mapeamento é derivada do cruzamento entre duas linhagens puras, o qual origina a geração  $F_1$  essencialmente heterozigota em todos os locos. A  $F_1$  é autofecundada ou retrocruzada de forma a produzir uma geração  $F_2$  ou  $RC_1$  segregante tanto para os marcadores moleculares como para as características fenotípicas de interesse (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

Alternativamente, pode-se utilizar uma população de linhas endogâmicas recombinantes (*Recombinant Inbred Lines - RIL's*) derivada de uma  $F_2$  por meio de sucessivas autofecundações (BURR et al., 1988; REITER et al., 1992), ou uma população de linhagens di-haplóides obtidas a partir da cultura de anteras ou de microsporos de planta  $F_1$  (FERREIRA, 1993).

O Quadro 1, adaptado de PATERSON (1996), sumariza as diferenças entre os tipos de populações utilizadas em mapeamento, considerando as características de cada uma. É importante observar que a quantidade de informação disponível em cada população para o discernimento entre dois pontos

ligados proximamente é calculada pelo produto entre o número de gametas informativos por indivíduo e o número de eventos de recombinação por gameta.

A análise do Quadro 1 permite avaliar as vantagens e desvantagens de cada tipo de população. Uma vantagem da população de retrocruzamentos é que a mesma pode ser gerada rapidamente pelo cruzamento do híbrido  $F_1$  com um dos progenitores (progenitor recorrente). Uma desvantagem é que esta população vai segregar apenas alelos derivados do progenitor não-recorrente de modo que ter-se-ão locos em heterozigose e locos idênticos ao progenitor recorrente. Este fato faz com que haja maior número de associações entre alelos marcadores do progenitor recorrente. A quantidade de informação disponível neste tipo de população é igual à disponível em populações de duplo-haplóides e inferior à disponível em populações  $F_2$  e RIL's. Uma outra desvantagem da população oriunda de retrocruzamentos é que a replicação de progênies somente seria possível pela clonagem (propagação vegetativa), o que muitas vezes não é possível.

Quadro 1- Características de diferentes populações de mapeamento genético

Tipo de população	Nº de gametas informativos/ indivíduo	Nº de eventos de recombinação/ gameta	Nº de genótipos possíveis/ loco	Nº de gerações necessárias para obtenção	Replicação
Retrocruz.	1	X	2	2	assexuada
$F_2$	2	X	3	2	assexuada
RIL's	1	2X	2	6-8	assexuada e sexuada
Duplo-haplóides	1	X	2	2	assexuada e sexuada

A população  $F_2$  também tem a vantagem de ser rapidamente gerada pela autofecundação do híbrido  $F_1$ . Outra vantagem é que ambos os gametas de cada indivíduo são informativos, fazendo com que a quantidade de informação disponível neste tipo de população seja o dobro daquela disponível em populações de retrocruzamentos. Por esse motivo e pelo fato de a população  $F_2$  possuir todas as possíveis combinações dos alelos parentais (AA, Aa, aa), este tipo de

população tem sido a mais amplamente usada para mapeamento de ligação em plantas. Uma desvantagem da população  $F_2$  é também o fato da replicação de progênies somente ser possível pela clonagem. A impossibilidade de replicação faz com que exista uma única população para realizar as análises dos marcadores genéticos. Desse modo, não seria possível, por exemplo, o mapeamento de diferentes genes de resistência a doenças, em que fosse necessária a inoculação da população segregante com diferentes raças fisiológicas e diferentes patógenos. Também não seria possível a montagem de experimentos com repetições para a avaliação de características quantitativas complexas (muito influenciadas pelo ambiente) na população segregante (COWEN, 1988).

A população de duplo-haplóides somente podem ser usadas em algumas espécies de plantas, as quais permitem a cultura de anteras. A obtenção da população de duplo-haplóides é feita através da regeneração de plantas a partir de micrósporos (grãos de pólen imaturos) com um número haplóide de cromossomos, sendo posteriormente feita a indução da duplicação cromossômica. Ao final do processo cada indivíduo duplo-haplóide terá dois cromossomos homólogos idênticos. Este fato faz com que a quantidade de informação recombinacional seja equivalente àquela disponível em populações de retrocruzamentos. Entretanto, os indivíduos duplo-haplóides são completamente homocigotos, e assim, podem ser auto-polinizados para produzir grande número de progênies, as quais seriam geneticamente idênticas. Esta replicação de progênies permite a montagem de ensaios com repetições para a avaliação de fenótipos, e também possibilita a distribuição de populações de duplo-haplóides idênticas para muitos pesquisadores, de modo que informações detalhadas sobre genótipos comuns possam ser acumuladas.

A população de RIL's são obtidas a partir de uma população  $F_2$ , por meio de sucessivas autofecundações pelo método do descendente de uma única semente (SSD). As sucessivas autofecundações fazem com que ao longo do processo ocorra a fixação gênica, ou seja, a eliminação de locos em heterocigose. Ao final do processo todos os genes terão uma segregação de 1:1 (AA, aa). Uma desvantagem da utilização de RIL's no mapeamento é o tempo requerido para a obtenção da população segregante (6 a 8 gerações); entretanto, o desenvolvimento de RIL's em plantas autógamas, como o feijoeiro-comum, é extremamente fácil, uma vez que estas plantas reproduzem-se normalmente por autofecundação. A necessidade de muitos ciclos de meiose para atingir a

homozigose resulta em oportunidades adicionais para a recombinação, tal que o número de eventos recombinacionais por gameta nas RIL's seja o dobro daquele obtido nas populações  $F_2$ , de retrocruzamentos e duplo-haplóides. Entretanto, cada RIL tem dois homólogos idênticos, enquanto que indivíduos  $F_2$  tem dois homólogos, os quais contribuem com diferentes informações. Conseqüentemente, população de RIL's oferece aproximadamente a mesma quantidade de informação da população  $F_2$ , para diferenciar ligações próximas. Assim como na população de duplo-haplóides, o fato de os locos estarem todos em homozigose permite a replicação das progênies, o que traz as inúmeras vantagens já comentadas.

Diferentes objetivos podem ser levados em conta na escolha do tipo de população segregante a ser utilizada no mapeamento genético. Por exemplo, a construção de um mapa de ligação preliminar, em um organismo pouco estudado, pode ser feita com base em populações de retrocruzamento ou populações  $F_2$ , em que o elevado desequilíbrio de ligação vai permitir a detecção da ligação entre marcadores não muito próximos. Para análises genéticas de fenótipos complexos, os quais são muito influenciados pelo ambiente, a escolha de RIL's permite a condução de experimentos com repetições de modo a minimizar a influência de fatores não-genéticos nos dados.

#### **4. Marcadores genéticos utilizados no mapeamento**

O marcador genético corresponde a uma característica do organismo que pode ser facilmente detectada a olho nu ou com ajuda de algum aparato tecnológico, e que co-segrega com genes de interesse. Para ser útil como marcador, a característica deve evidenciar diferenças entre indivíduos e ser reproduzida com precisão na progênie. Existem diversos tipos de marcadores usados em estudos genéticos (para uma revisão, vide CORRÊA, 1995).

Até meados da década de 60, estudos de genética e melhoramento utilizavam marcadores morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual, como cor de pétalas, de semente, de hipocótilo, morfologia floral e foliar. Esses marcadores contribuíram significativamente para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e para a construção das primeiras versões de mapas genéticos. Entretanto, devido ao seu número limitado, a probabilidade de se encontrar associações significativas entre estes marcadores e caracteres de importância econômica era reduzida.

A revolução neste quadro iniciou-se com o desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos, os quais dobraram o número de marcadores genéticos disponíveis. Com o advento das técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA. Inicialmente, a utilização de enzimas de restrição permitiu a análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição de DNA (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP) (DANNA e NATHANS, 1971; GRODZICKER et al., 1974).

Mais recentemente, o desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia utilizando DNA polimerase (PCR) (MULLIS e FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1988) levou à descrição de outras classes de marcadores moleculares. Aliadas às técnicas de clonagem e seqüenciamento de DNA, estas metodologias têm possibilitado um rápido acúmulo de informações sobre a estrutura de genomas eucariotos. Hoje, um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares altamente polimórficos pode ser obtido em qualquer organismo vivo, por meio de diversas técnicas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

O mapeamento genético com marcadores moleculares tem possibilitado o surgimento de mapas moderadamente densos ou saturados para diversas espécies, incluindo plantas de interesse agrônômico como o feijão (VALLEJOS et al., 1992; NODARI et al., 1993), a soja (SHOEMAKER, 1994; CORRÊA, 1995), o arroz (JENA et al., 1994), o milho (GRADINER et al., 1993; PEREIRA et al., 1994), o trigo (GALE et al., 1990), entre outras.

Os marcadores moleculares apresentam várias vantagens sobre os marcadores morfológicos, podendo-se citar: o alto nível de polimorfismo de cada loco estudado, permitindo o uso de populações segregantes de cruzamentos específicos, facilitando o desenvolvimento de mapas genéticos; a neutralidade em relação a efeitos fenotípicos, com mínimo ou nulo efeitos epistático ou pleiotrópico; a possibilidade de utilização de amostras de células ou de tecidos para caracterizar o genótipo de um indivíduo. Além disso, em geral, os marcadores moleculares são co-dominantes, contendo maior quantidade de informação genética por loco (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

Uma etapa comum da aplicação dos marcadores moleculares no mapeamento genético de uma espécie tem sido a integração de diversos tipos de marcadores, incluindo os morfológicos e isoenzimáticos, bem como os RAPD, RFLP e AFLP (TANKSLEY et al., 1989; VALLEJOS et al., 1992; KISS et al., 1993; KLEINHOFES et al., 1993; TORRES et al., 1993; NODARI et al., 1993; CHAPARRO

et al., 1994; BECKER et al., 1995; BEEBE et al., 1998). Em todos esses mapas, a maioria dos marcadores é do tipo RFLP e RAPD, evidenciando o alto poder de detecção de polimorfismos com marcadores moleculares do DNA.

Outro tipo de marcador molecular que vem sendo utilizado na construção de mapas genéticos são os marcadores baseados nos microssatélites. Os microssatélites são pequenas seqüências com 1 a 4 nucleotídeos de comprimento, repetidos em tandem, formando locos genéticos muito polimórficos (LITT e LUTY, 1989). Estes locos, amplificados via PCR, foram também denominados de *Sequence Tagged Microsatellite Sites* - STMS (BECKMANN e SOLLER, 1990). A presença de microssatélites foi constatada em 34 espécies vegetais, sendo que o elemento repetido mais comum foi o di-nucleotídeo AT (MORGANTE e OLIVIERI, 1993). Marcadores baseados em microssatélites estão sendo desenvolvidos para aplicações de mapeamento genético de algumas culturas anuais de maior expressão como soja, arroz e trigo (AKKAYA et al., 1992; ZHAO e KOCHERT, 1993; RONGWEN et al., 1995; RODER et al., 1995; CREGAN et al., 1999), bem como arbóreo-florestais e frutíferas (SMITH e DEVEY, 1994; KIJAS et al., 1995).

Mais recentemente, uma nova tecnologia de marcadores moleculares tem sido utilizada de forma crescente na construção de mapas genéticos: a análise de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados). Desde o seu desenvolvimento e divulgação (ZABEAU, 1993; VOS et al., 1995), esta técnica tem se destacado como a tecnologia mais eficiente na amostragem ampla e simultânea de um genoma. O grande número de fragmentos que é gerado faz com que esta técnica tenha uma grande utilidade no mapeamento de alta resolução (BALLVORA et al., 1995; MEKSEM et al., 1995).

## **5. Organização de genes de resistência raça-específica e suas implicações na evolução de novas especificidades de reconhecimento e no melhoramento visando resistência a doenças**

Os genes R, que conferem resistência raça-específica, atuam diferenciadamente de acordo com o genótipo do patógeno (raças fisiológicas) e se enquadram dentro da teoria gene-a-gene. Segundo FLOR (1955), para cada gene que condiciona uma reação de resistência no hospedeiro existe um gene complementar no patógeno que condiciona a avirulência. A evolução das

interações gene-a-gene tem como consequência na população de plantas, uma diversidade de genes R na espécie hospedeira e uma correspondente diversidade de genes de avirulência no patógeno (STASKAWICZ et al., 1995).

O estudo da diversidade de genes R, bem como a organização genômica de tais genes tem despertado o interesse de diferentes pesquisadores pelo fato de tais estudos abrirem novas perspectivas para o entendimento da evolução dos genes R e para o desenvolvimento de estratégias eficientes para o melhoramento visando resistência a doenças. Estes diferentes trabalhos têm mostrado que as plantas possuem muitos genes raça-específicos, os quais não apresentam uma distribuição aleatória no genoma. Os genes podem estar organizados em diferentes grupos de ligação ou podem estar ligados (organizados em seqüência ou não), sendo que em todos os casos podem possuir diferentes formas alélicas. A demonstração do modo de organização de genes R não é muito simples, uma vez que são necessários para tais estudos uma grande amostra de genótipos, muitos cruzamentos e o isolamento e manutenção de isolados do patógeno que permitam o reconhecimento de diferentes genes R (PRYOR e ELLIS, 1993).

O número de genes R bem como a sua localização no genoma foram determinados em diferentes patossistemas. No linho, os 30 genes de resistência à *Melampsora lini* foram mapeados em cinco locos, sendo 13 no loco *L* e sete no loco *M* (ELLIS et al., 1988). No milho, pelo menos 17 genes R à *Puccinia sorghi* estão agrupados no loco complexo *Rp*, localizado na extremidade do braço curto do cromossomo 10 e outros seis genes foram mapeados no loco *Rp3* do cromossomo 3 (HOOKER, 1985; HULBERT, 1997). Na cevada existem 14 genes R ao míldio-pulverulento localizados no loco *Mla* e vários outros genes no loco *Mlk*. Esses locos estão localizados no cromossomo 5 e separados por 10 unidades mapa (GIESE, 1981; GIESE et al., 1981). Na alface, 13 genes dominantes de resistência ao míldio estão agrupados em quatro grupos de ligação (PARAN et al., 1991). Os genes *Cf-2* e *Cf-5*, que conferem resistência do tomateiro ao fungo *Cladosporium fulvum*, também estão agrupados (WORDRAGEN et al., 1994). Vários análogos de genes de resistência (AGR) apresentam distribuição não-aleatória no genoma. Por exemplo, no grupo de ligação J de soja, foram mapeados vários clones correspondentes a oito AGR. Neste grupo de ligação e nos demais onde foram localizados AGR, já foram mapeados vários genes de resistência (KANASIN et al., 1996; YU et al., 1996).

No caso do feijoeiro-comum, com o advento dos marcadores moleculares, os estudos visando o mapeamento de diferentes genes R aumentaram consideravelmente nos últimos anos (KELLY e MIKLAS, 1998). Recentemente, CORRÊA (1999) iniciou o estudo da organização de diferentes genes de resistência da variedade Ouro Negro com o auxílio de marcadores moleculares RAPD. Utilizando a técnica de inoculações múltiplas com diferentes raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Phaeoisariopsis griseola* em populações F<sub>2</sub> derivadas do cruzamento entre Ouro Negro e US Pinto 111 e as respectivas famílias F<sub>2:3</sub>, CORRÊA (1999) demonstrou que a resistência a quatro raças fisiológicas de *U. appendiculatus* e duas de *C. lindemuthianum* presente em Ouro Negro estão agrupados em uma única região cromossômica e que os genes de resistência a duas raças fisiológicas de *P. griseola* são independentes entre si e dos genes de resistência a *U. appendiculatus* e *C. lindemuthianum*.

Como afirmado anteriormente, os genes que estão localizados em uma única região cromossômica podem estar proximamente ligados, formando um bloco gênico, ou podem ser diferentes formas alélicas ocupando o mesmo loco. No caso dos genes que conferem resistência a *Puccinia sorghi* do milho, as evidências favorecem a ligação próxima dos genes localizados na extremidade do cromossomo 10, uma vez que SAXENA e HOOKER (1968) observaram recombinação entre eles. Estes autores caracterizaram a região cromossômica contendo o loco *Rp1* com 14 diferentes formas alélicas e os genes dos locos *Rp5*, *Rp6* e *Rp9*, os quais estão separados do *Rp1* por aproximadamente 1-2 unidades mapa. Estes mesmos autores demonstraram que muitos dos alelos *Rp1* poderiam ser recombinados e, assim, por definição seriam considerados genes proximamente ligados. De fato, esses resultados foram confirmados por outros autores (HULBERT e BENNETZEN, 1991). No caso do linho, também foram observadas recombinações entre genes R do loco *M* (FLOR, 1965; MAYO e SHEPHERD, 1980). Estas observações indicam que existem locos separados no grupo *M*, os quais funcionam independentemente. Por outro lado, SHEPHERD e MAYO (1972) e ISLAM et al. (1989) não verificaram recombinação entre os genes R mapeados no loco *L* do linho, parecendo indicar que, neste caso, os genes são realmente diferentes formas alélicas.

Com base na organização genômica dos genes R, pode-se dizer que o surgimento de novas especificidades de reconhecimentos de tais genes é o

produto de um processo evolucionário que parece ter acontecido em dois grupos principais. Em um grupo, exemplificado pelo loco M de resistência à ferrugem no linho, arranjos em tandem de genes R relacionados com diferentes especificidades são encontrados no genoma da planta. O outro grupo evolucionário é exemplificado pelo loco L de resistência à ferrugem no linho, no qual as especificidades presentes comportam-se geneticamente como alelos de um único loco, e diferentes especificidades existentes em heterozigotos não podem ser recombinadas. A clonagem do alelo  $L^6$  deste loco dá suporte à interpretação genética clássica de um único loco L, mas fornece algumas surpresas (LAWRENCE et al., 1995): os genes do loco M, geneticamente complexo, são relacionados em seqüência a genes L não-ligados, com 70 a 90% de identidade nucleotídica. A contrastante evolução de tais genes fortemente relacionados pode ter sido o resultado de um evento raro de duplicação que ocorreu apenas no loco M, fornecendo a oportunidade de amplificação rápida por meio de *crossing-over* entre seqüências similares situadas em localizações não-homólogas (*crossing-over* desigual). A ocorrência desse pareamento desigual de cromossomos homólogos na meiose seguido de permutação leva ao desenvolvimento de famílias multigênicas por duplicação do segmento contendo o gene ancestral. Similarmente, análises moleculares do loco N de resistência ao TMV, em fumo, e o loco Cf-9, em tomate, têm revelado uma família de genes agrupados (JONES et al., 1994; WHITHAM et al., 1994).

Além da ocorrência de *crossing-over* desigual, a recombinação em alta freqüência entre genes proximamente ligados tem sido observada no complexo *Rp* em milho (PRYOR, 1987; BENNETZEN et al., 1988). Ambos os eventos são característicos de complexos de genes proximamente ligados e existem evidências genéticas para a ocorrência de tais eventos em alta freqüência. Segundo PRYOR e ELLIS (1993), a alta freqüência de eventos de *crossing-over* desigual e recíproco nos complexos contendo genes R poderia ser a manifestação de algum mecanismo de rearranjo genético favorecendo a geração de novas especificidades capazes de reconhecer novas raças virulentas do patógeno.

No caso do loco L do linho não há evidências sobre a ocorrência de tais rearranjos genéticos, uma vez que SHEPHERD e MAYO (1972) e ISLAM et al. (1989) não conseguiram observar recombinação entre os genes R mapeados nesse loco. A geração de novas especificidades, neste caso, poderia acontecer a partir de modificações nos genes já existentes. Este fato foi observado pela

primeira vez por ISLAM et al. (1989). Estes autores recuperaram em progênies de cruzamentos-testes de plantas heterozigotas para genes *L*, fenótipos de resistência não-parental, os quais ainda não haviam sido observados no linho. Estes tipos modificados de resistência mostraram um novo espectro de reações de resistência, quando inoculadas com raças fisiológicas, para as quais os genótipos parentais eram imunes.

A ocorrência de mutações também é relacionada como uma forma de evolução de novas especificidades em plantas (SUDUPAK et al., 1993). Os patógenos, por meio de uma simples deleção ou mesmo outro mecanismo, podem mutar de avirulento para virulento. No entanto, as plantas, ao longo da evolução, devem produzir novas especificidades de genes de resistência capazes de reconhecer novos produtos de genes de avirulência apresentados pelo patógeno. Portanto, as plantas requerem uma mutação para ganhar uma função.

FISHER (1961) propôs um mecanismo alternativo para a geração de novas especificidades do alelo de auto-incompatibilidade por um processo recombinacional. Nesse modelo, o loco da auto-incompatibilidade é um complexo formado por vários genes proximalmente ligados e a especificidade da auto-incompatibilidade é a expressão coletiva dos elementos individuais dentro do complexo. Novas especificidades são formadas pela recombinação dentro do complexo, ou seja, pela recombinação intergênica. Utilizando um raciocínio análogo, pode-se pensar que a recombinação intragênica também poderia formar novas especificidades. Como, em alguns casos, os genes *R* são compostos por diferentes domínios estruturais situados em diferentes exons, a combinação destes diferentes exons poderia ser também um mecanismo gerador de diversidade. Neste mesmo raciocínio, um gene que codifica uma proteína com vários domínios repetidos poderia ser inativado se um ou mais desses domínios fossem perdidos por recombinação. Este fato foi constatado por ANDERSON et al. (1997), que verificaram que o gene *M* de resistência à ferrugem foi inativado com a perda de uma unidade repetida dentro de uma região que codificava seqüências ricas em leucina (LRR). No gene *L*<sup>6</sup> verificou-se que modificações nas seqüências LRR (por amplificação ou redução) alteram a especificidade do gene.

O conhecimento da organização dos genes *R* tem uma importância prática crucial em programas de melhoramento que visam o desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças. O contraste da organização dos genes alélicos, como no caso dos genes *L* do linho, e dos genes proximalmente ligados, como no

caso dos genes *M* da mesma cultura, tem importantes implicações. Em espécies autógamas, a organização alélica dos genes significa que apenas um único gene pode ser utilizado em um cultivar, a menos que sejam utilizadas técnicas de transformação para incorporar alelos alternativos do gene em diferentes locais do genoma. Por outro lado, a organização de genes proximamente ligados permite a recombinação de mais de um gene em um único cromossomo.

A organização dos genes R tem implicações importantes na estratégia de seleção desses genes. Quando se pensa em diferentes genes R proximamente ligados formando um grupo gênico, a introdução desse grupo em um cultivar suscetível seria mais fácil do que a introdução de diferentes genes R dispersos no genoma. Entretanto, quando se pensa no “piramidamento” de genes, a reunião de diferentes genes R presentes em distintos progenitores em um mesmo grupo gênico seria mais difícil do que a reunião deles em diferentes regiões do genoma.

A seleção dos genes R pode ser feita inoculando-se a progênie segregante com uma única raça ou com uma mistura de raças. Quando se utiliza uma única raça, na verdade estamos selecionando um único gene R (resistência vertical), de modo que os demais genes R podem ser perdidos durante o desenvolvimento do programa de melhoramento. Este tipo de erosão genética é ainda mais problemática quando se pensa em patógenos que apresentam alta variabilidade genética como, por exemplo, *Uromyces appendiculatus*, o agente causador da ferrugem do feijoeiro (FALEIRO, 1997; FALEIRO et al., 1998). No caso, estudos sobre a herança da resistência do feijoeiro-comum a este patógeno revelam que genes de efeito principal e genes de efeito secundário estão envolvidos na resistência (FALEIRO, 1997). Nesta situação, a seleção da resistência baseada na inoculação de uma única raça fatalmente levaria à perda desses genes de efeito secundário durante o melhoramento. Este tipo de erosão genética já havia sido constatada por VAN DER PLANK (1963), que utilizou o termo “efeito vertifolia” para defini-la.

Na verdade, a erosão da resistência pode ocorrer mesmo em casos em que a seleção não é intencionalmente voltada para a resistência vertical. DAVIS et al. (1990) relataram a erosão de resistência à *Puccinia sorghi* em uma população de milho-doce submetida a 10 ciclos de seleção massal de várias características agrônômicas, exceto resistência a *P. sorghi*. Foi verificado um significativo aumento na suscetibilidade média da população melhorada em relação à população original, evidenciando a perda de genes de resistência durante a

seleção. A erosão, segundo os autores, pode ter sido devida à associação da resistência com características agronômicas indesejáveis, que haviam sido eliminadas durante a seleção.

Atualmente, uma das preocupações dos pesquisadores envolvidos em programas de melhoramento é com a vulnerabilidade genética das plantas cultivadas às doenças. Com a evolução da agricultura e a revolução verde, extensas áreas de monocultivos começaram a ser plantadas utilizando cultivares com grande uniformidade genética, nos quais a diversidade de reconhecimento é realmente limitada.

## **6. Aplicações do mapeamento genético no melhoramento de plantas**

O desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares, tanto na análise genética de espécies quanto no melhoramento de plantas. No contexto do melhoramento de plantas, mapas genéticos possibilitam a cobertura e análise completa de genomas, a decomposição de características genéticas complexas nos seus componentes mendelianos, a localização das regiões genômicas que controlam caracteres de importância, a quantificação do efeito destas regiões na característica estudada e a canalização de toda essa informação para uso em programas de melhoramento (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

A construção de um mapa genético estimula a aquisição de informações importantes para o melhoramento genético de uma espécie. Tais informações variam desde a associação de marcadores com caracteres qualitativos e sua localização nos grupos de ligação, até a identificação de regiões genômicas associadas a caracteres quantitativos. Embora não seja o único método para o estudo de associações de caracteres quantitativos com marcadores moleculares (TANKSLEY et al., 1982; EDWARDS et al., 1987; NIENHUIS et al., 1987; OSBORN et al., 1987), o desenvolvimento de um mapa genético oferece condições de testar marcadores distribuídos por todo o genoma maximizando a probabilidade de se encontrar associações significativas. Uma vez encontradas essas associações, os marcadores podem ser utilizados na seleção indireta de caracteres de interesse agronômico.

A seleção indireta usando os marcadores moleculares baseia-se no princípio de que se um gene (ou um grupo de genes) encontra-se ligado a um

marcador genético de fácil identificação, então esse marcador pode ser usado para selecionar a característica de interesse em um programa de melhoramento. Segundo HAYWARD et al. (1994), o método mais eficaz para esse tipo de associação envolve a produção de mapas genéticos detalhados nos quais são localizadas regiões contendo locos para características quantitativas (QTL).

Vários trabalhos, usando dados simulados e dados reais, mostraram que os marcadores moleculares apresentam-se como ferramentas úteis para monitorar etapas de seleção de características quantitativas (GILMELFARB e LANDE, 1994; ARENDONK et al., 1994; STROMBERG et al., 1994). O mesmo modelo de seleção pode ser empregado com marcadores moleculares ligados a características qualitativas. HALEY et al. (1994) verificaram a eficiência de marcadores RAPD na seleção de genótipos de feijoeiro resistentes ao vírus do mosaico-comum.

O uso de marcadores moleculares ampliou significativamente o número de associações detectáveis com locos que determinam características de importância econômica (MELCHINGER, 1990). O grande número de marcadores moleculares distribuídos pelo genoma permite uma amostragem mais completa na busca de ligação gênica com o loco de interesse.

Os marcadores RFLP têm sido utilizados para sinalizar genes principais (“major genes”) envolvidos em resistência a doenças em tomate (YOUNG et al., 1988; SARFATTI et al., 1989; KLEIN-LANKHORST et al., 1991a), *Brassica* (LANDRY et al., 1992; FERREIRA, 1995a, 1995b), arroz (YU et al., 1991), soja (MUEHLBAUER et al., 1991; DIERS et al., 1992) e milho (BENTOTILA et al., 1991). Os marcadores RAPD, desde a sua introdução, vêm sendo utilizados para mapear genes que controlam resistência a doenças em tomate (KLEIN-LANKHORST et al., 1991a, 1991b; MARTIN et al., 1991), feijão (MIKLAS et al., 1993; HALEY et al., 1993), alface (MICHELMORE et al., 1991; PARAN et al., 1991), *Brassica* (FERREIRA, 1993), *Pinus* (DEVEY et al., 1995), entre outras.

Além de genes de interesse, a existência de um mapa genético permite a localização de marcadores morfológicos bem como genes clonados de função desconhecida. Esse processo de integração entre mapas que se baseiam em marcadores moleculares com o mapa clássico não é uma tarefa fácil e, para a maioria das espécies cultivadas, este tipo de estudo ainda não é possível, uma vez que não existe mapa clássico.

Outra aplicação do mapeamento genético é a seleção de marcadores a serem utilizados na caracterização de germoplasma. Com base no mapa genético pode-se selecionar um conjunto de marcadores distribuídos de maneira tal a amostrar o genoma da espécie de modo homogêneo (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

A construção de um mapa genético gera ainda um grande número de informações básicas sobre a estrutura e organização do genoma da espécie estudada, tais como padrões de distorção de segregação mendeliana de segmentos cromossômicos ou a presença de inversões, translocações e duplicações de segmentos de DNA (SLOCUM et al., 1990; TANKSLEY et al., 1992; FERREIRA et al., 1994).

O mapeamento comparativo (“comparative mapping”) utilizando sondas heterólogas entre espécies (ou populações) oferece também a possibilidade de se comparar a estrutura genômica de diferentes espécies, do ponto de vista de homologia de genes e conservação de distância e ordem de ligação nos cromossomos (BONIERBALE et al., 1988; TANKSLEY et al., 1988; SLOCUM et al., 1990; KIANIAN e QUIROS, 1992; WEEDEN et al., 1992; WHITKUS et al., 1992; AHN e TANKSLEY, 1993; PRINCE et al., 1993).

A análise genética do DNA está se tornando cada vez mais eficiente. Com isso, uma grande quantidade de informações sobre genomas de plantas cultivadas está sendo gerada. As perspectivas são de que as próximas décadas assistirão a uma explosão desse conhecimento, abrindo inúmeras oportunidades para a exploração mais eficiente da variabilidade genética existente tanto nas variedades cultivadas como no germoplasma silvestre (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

## **7. Características importantes no melhoramento genético do feijoeiro-comum**

No Brasil, os programas de melhoramento do feijoeiro têm visado sobretudo o aumento da produtividade e a resistência a doenças. Outras características como o tipo e a qualidade do grão, a arquitetura da planta, resistência a pragas, adaptação ao cultivo consorciado, adaptação à colheita mecanizada, resistência à seca, adaptação a solos pobres e ácidos e aumento da eficiência da fixação simbiótica de nitrogênio têm recebido atenção dos melhoristas, mas, em geral, ficam num segundo plano de importância (VIEIRA et al., 1999).

Num programa de melhoramento cujo objetivo é aumentar a capacidade produtiva do feijoeiro, diversas características morfológicas, fisiológicas e de rendimento têm sido consideradas (SINGH, 1991a). A produção por planta é muito afetada pelo stand utilizado sendo o produto de três componentes primários: números de vagens por planta, número de sementes por vagem e o peso médio da semente. Estudos de correlação (ADAMS, 1967; CASTOLDI, 1991) têm mostrado que o aumento de um desses componentes pode trazer diminuição do outro. Tal observação foi denominada por ADAMS (1967) de "compensação entre os componentes de rendimento". Logicamente, a existência de tal compensação não significa, necessariamente, que não se possa identificar material com uma combinação ótima dos componentes, resultando em incremento da produção (VIEIRA et al., 1999).

Além da produção de grãos, o tipo de grão, o hábito de crescimento e a resistência a doenças também assumem grande importância e devem ser considerados pelos melhoristas a fim de que estas variedades atendam os objetivos dos agricultores e consumidores (RAMALHO e ABREU, 1998). A preferência por determinado tipo de grão varia com a região. O feijão tipo carioca é o mais cultivado no Brasil, contudo os grãos de cor preta e bege também ocupam uma parcela considerável do mercado. Com relação ao hábito de crescimento, as variedades de porte mais ereto tem sido preferidas, uma vez que, facilitam os tratos culturais, reduzem as perdas na colheita, permitem a obtenção de grãos de melhor qualidade e menor incidência de alguns patógenos. Inúmeros patógenos ocorrem na cultura do feijoeiro, causando danos econômicos expressivos (PAULA JÚNIOR e ZAMBOLIM, 1998). A resistência a doenças em uma variedade é de grande importância na redução do uso de defensivos, o que representa economia para o produtor e menor prejuízo ao ambiente.

## **CAPÍTULO 1**

### **RESISTÊNCIA DE LINHAGENS DE FEIJOEIRO A QUATRO RAÇAS DE *Uromyces appendiculatus* COLETADAS NO ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL**

#### **1. INTRODUÇÃO**

Apesar da grande importância da cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) para o Brasil, o rendimento médio nacional é muito baixo, em razão, dentre outros fatores, do grande número de doenças às quais está sujeita (VIEIRA, 1983). A ferrugem, causada pelo fungo *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger (sin. *U. phaseoli* (Reben) Wint.), é considerada uma das mais importantes doenças do feijoeiro, podendo causar perdas de até 100% se as condições ambientais forem favoráveis e se forem usadas sementes de cultivares suscetíveis (STAVELY e PASTOR-CORRALES, 1994).

As recomendações para o controle dessa doença incluem práticas culturais como a rotação de culturas e a eliminação dos restos de cultura contaminados (HALL e NASSER, 1994), que visam diminuir o inóculo inicial, assim como o uso de fungicidas e de cultivares resistentes, que diminuem a taxa de progresso da doença (STAVELY e PASTOR-CORRALES, 1994).

O controle da doença pela utilização de cultivares resistentes tem recebido atenção dos pesquisadores por ser um método eficiente, seguro, barato e acessível a produtores de qualquer nível econômico. A primeira etapa para o desenvolvimento de cultivares resistentes é a detecção de genótipos que sirvam como fontes de resistência.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a resistência de oito linhagens de feijoeiro resistentes à ferrugem, desenvolvidas pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, a quatro raças de *Uromyces appendiculatus* coletadas no Estado de Minas Gerais, Brasil.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Sementes das oito linhagens testadas nesse trabalho foram fornecidas pelo Serviço de Pesquisa em Agricultura, Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), Beltsville, Maryland. Estas linhagens foram liberadas recentemente (STAVELY et al., 1992; 1994; 1997) e apresentam diferentes genes de resistência à ferrugem (Quadro 1). Também foram incluídas no teste a variedade Ouro Negro, a qual tem-se apresentada como resistente em condições controladas de casa-de-vegetação (FALEIRO et al., 1996; FALEIRO et al., 1999a) e de campo (VIEIRA et al., 1992) e a variedade US Pinto 111, considerada suscetível universal à ferrugem.

As quatro raças fisiológicas de *U. appendiculatus* utilizadas neste trabalho foram identificadas por FALEIRO et al. (1999b) e re-classificadas por FALEIRO et al. (1999c) como raça 45 (33121211), raça 46 (33122211), raça 49 (33132212) e raça 52 (33222232).

As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação em vasos de 2,5 litros, cada um contendo quatro plantas. Nas inoculações, foram utilizadas oito plantas de cada linhagem/variedade para cada raça do patógeno. Quando as folhas primárias apresentavam aproximadamente 2/3 do seu desenvolvimento completo, 10 dias após a semeadura, foram inoculadas com uma suspensão de uredosporos de cada raça. Os uredosporos, na concentração de  $2,0 \times 10^4$  conídios/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 (CARRIJO et al., 1980), evitando-se atingir o

ponto de escorrimento. Após inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $>95\%$  de umidade relativa), onde permaneceram por 48 horas, 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.

Quadro 1 - Linhagens de feijoeiro-comum resistentes a *Uromyces appendiculatus* desenvolvidas pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

Linhagens	Genes de resistência à ferrugem (nº de raças norte-americanas às quais é resistente)	Ano de liberação
BelDak-RR-2	<i>Ur-3</i> , <i>Ur-6</i> e CNC (86)	1988
BelNeb-RR-2	<i>Ur-5</i> , <i>Ur-6</i> e GN 1140 (87)	1988
BelMiDak-RR-3	<i>Ur-11</i> (86)	1991
BelDakMi-RR-7	<i>Ur-6</i> e <i>Ur-11</i> (86)	1993
BelDakMi-RMR-10	<i>Ur-6</i> e <i>Ur-11</i> (86)	1995
BelMiDak-RMR-12	<i>Ur-4</i> e <i>Ur-11</i> (87)	1995
BelMiNeb-RMR-3	<i>Ur-4</i> e <i>Ur-11</i> (87)	1996
BelDakMi-RMR-11	<i>Ur-6</i> e <i>Ur-11</i> (86)	1997

Foi avaliada a frequência de infecção (FI) e estimado o tamanho médio das pústulas (TMP). A FI foi avaliada 15 dias após a inoculação, considerando-se o número de pústulas/cm<sup>2</sup>. A estimativa do TMP em cada variedade foi obtida quando se completou o período latente (número de dias da inoculação até que 50% das pústulas estivessem esporuladas) e, para isso, foram realizadas observações diárias. Foram considerados seis graus de reação: 1- ausência de pústulas (imune), 2- manchas necróticas sem esporulação (altamente resistente), 3- pústulas com diâmetro < 300µm (resistente), 4- pústulas com diâmetro de 300µm a 499µm (moderadamente resistente), 5- pústulas com diâmetro de 500µm a 800µm (suscetível) e 6- pústulas com diâmetro > 800µm (altamente suscetível). O grau de reação foi determinado mediante 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). Foram

registrados todos os graus de reação observados, relacionando-se primeiro o grau predominante, depois os presentes em menor frequência.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observadas diferenças significativas entre as variedades quanto ao TMP e quanto à FI (Quadros 2 e 3). A FI foi importante para confirmar e complementar os dados relativos ao TMP. A maioria das linhagens desenvolvidas pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos apresentou FI menor que o padrão de suscetibilidade (US Pinto 111). A linhagem BelDakMi-RMR-11 apresentou uma média de FI maior que o padrão de suscetibilidade, porém de acordo com o TMP, esta linhagem é resistente às raças 45, 46 e 49 e moderadamente resistente à raça 52. Segundo Dr. J. Rennie Stavelly, em testes de campo realizados nos Estados Unidos, em condições de infecção natural, esta linhagem tem apresentado apenas pequenas pústulas ( $< 300 \mu\text{m}$ ) nas folhas basais das plantas (comunicação pessoal).

As linhagens BelMiDak-RMR-12 e BelMiDak-RR-3 destacaram-se como as mais resistentes, apresentando, para todas as raças, apenas ( $< 300 \mu\text{m}$ ) na face abaxial da folha. É interessante observar que estas linhagens não são imunes à maioria das raças testadas. As linhagens BelDakMi-RMR-10 e BelNeb RR-2 apresentaram baixa FI média e foram resistentes a quatro e três raças, respectivamente. A linhagem BelDak-RR-2, apesar de sua resistência a todas as raças, apresentou média de FI relativamente alta. As linhagens BelMiNeb-RMR-3 e BelDakMi RR-7 também foram resistentes às quatro raças testadas, porém apresentaram alta média de FI e algumas pústulas com diâmetro maior que  $300\mu\text{m}$ .

Quadro 2 - Estimativa do tamanho médio das pústulas (TMP) de quatro raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus* em dez linhagens de feijoeiro- comum

Variedades	Raça 45	Raça 46	Raça 49	Raça 52
BelMiDak-RR-3	1	3*	3*	3*
BelMiDak-RMR-12	3*	3*	3*	3*
Ouro Negro	3*	3*	3*	3*
BelDakMi-RMR-10	3*	3*	3*	3
BelNeb-RR-2	3*	3*	3*	4,5
BelMiNeb-RMR-3	3*	3*	3,4	3,4
BelDak-RR-2	3	3	3	3
BelDakMi-RR-7	3,4	3,4	3,4	3,4
US Pinto 111	6	6	6	6
BelDakMi-RMR-11	3,4	3,4	3,4	4

\* Pústulas observadas apenas na face abaxial da folha

Quadro 3 - Frequência de infecção (nº de pústulas/cm<sup>2</sup>) de quatro raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus* em dez linhagens de feijoeiro- comum

Variedades	Raça 45	Raça 46	Raça 49	Raça 52	Média de FI
BelMiDak-RR-3	0,0	0,3	1,2	1,3	0,7
BelMiDak-RMR-12	0,5	0,5	3,8	2,5	1,8
Ouro Negro	2,3	0,8	3,6	1,0	1,9
BelDakMi-RMR-10	0,8	0,8	2,7	3,8	2,0
BelNeb-RR-2	0,3	0,3	2,0	5,3	2,0
BelMiNeb-RMR-3	0,8	0,5	13,8	7,8	5,7
BelDak-RR-2	4,8	4,8	9,0	7,0	6,4
BelDakMi-RR-7	6,5	11,8	6,0	7,3	7,9
US Pinto 111	10,5	12,0	12,3	6,0	10,2
BelDakMi-RMR-11	11,0	11,5	10,7	11,5	11,2

Pode-se observar que todas as linhagens norte-americanas, exceto BelNeb-RR-2, foram resistentes às quatro raças testadas. Esta linhagem, apesar de possuir os genes *Ur-5* e *Ur-6*, foi moderadamente suscetível à raça 52. Muitas raças fisiológicas desenvolvem-se em linhagens com o gene *Ur-5* e em linhagens com o gene *Ur-6*, porém poucas raças desenvolvem-se em linhagens com esses dois genes (Dr. J. Rennie Stavely, comunicação pessoal). Todas as linhagens com o gene *Ur-11* foram resistentes às quatro raças testadas. Diante dos resultados, pode-se dizer que os genes de resistência presentes nas linhagens norte-americanas (Quadro 1) são eficientes contra as quatro raças fisiológicas de *U. appendiculatus* coletadas no Estado de Minas Gerais. A resistência das linhagens norte-americanas a um grande número de raças (Quadro 1) tem sido verificada tanto em condições controladas quanto em condições de campo.

O cultivar Ouro Negro foi resistente às quatro raças, com um nível de resistência igual às melhores linhagens norte-americanas. A resistência do cultivar Ouro Negro às quatro raças testadas foi semelhante à resistência apresentada pela linhagem BelMiDak-RR-3, a qual contém o gene *Ur-11*. Estudos preliminares de alelismo, mostram que o cultivar Ouro Negro apresenta um bloco gênico semelhante a *Ur-11*. FALEIRO et al. (1996, 1999a) destacaram a importância da variedade Ouro Negro como fonte doadora de genes de resistência em trabalhos de melhoramento. Além da resistência à ferrugem, outros aspectos como a produtividade, resistência à antracnose e qualidades culinárias (ARAÚJO et al., 1991), recomendam-na para uso em programas de melhoramento.

Estudos de herança tem mostrado o envolvimento de genes de efeito principal e genes de efeito secundário no controle genético da resistência à ferrugem (FALEIRO, 1997). Diante disso, seria de grande importância combinar dois ou mais grupos de genes, em programas de melhoramento, visando um controle genético estável e eficiente da ferrugem do feijoeiro, o que também seria importante face à grande variabilidade do patógeno. Materiais genéticos com diferentes genes de resistência, como as linhagens norte-americanas e o cultivar Ouro Negro, são importantes fontes a serem utilizadas em programas de melhoramento.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

A identificação de fontes de resistência é etapa básica em programas de melhoramento que visam o desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças. Neste trabalho, foram inoculadas, sob condições controladas, linhagens de feijoeiro-comum resistentes à ferrugem desenvolvidas pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, com 4 raças conhecidas de *Uromyces appendiculatus* coletadas no Estado de Minas Gerais. O cultivar Ouro Negro foi utilizado como padrão de resistência e US Pinto 111 (suscetível universal) como padrão de suscetibilidade. Foi avaliada a frequência de infecção (FI) e estimado o tamanho médio das pústulas (TMP). As linhagens BelMiDak-RMR-12 e BelMiDak-RR-3 destacaram-se como as mais resistentes, apresentando, para todas as raças, apenas pústulas (com diâmetro < 300µm) na face abaxial da folha. As linhagens BelDakMi-RMR-10 e BelNeb RR-2 apresentaram baixa média de FI e foram resistentes a quatro e três raças, respectivamente. A linhagem BelDak-RR-2 apesar de sua resistência a todas as raças apresentou média de FI relativamente alta. As linhagens BelMiNeb-RMR-3 e BelDakMi RR-7 também foram resistentes às quatro raças testadas, porém apresentaram alta FI média e algumas pústulas com diâmetro maior que 300µm. A linhagem BelDakMi-RMR-11 foi resistente às raças 45, 46 e 49 e moderadamente resistente à raça 52. O cultivar Ouro Negro foi resistente às quatro raças, com um nível de resistência igual às melhores linhagens norte-americanas.

## CAPÍTULO 2

### OBTENÇÃO DE MARCADORES RAPD LIGADOS A UM BLOCO GÊNICO RELACIONADO À RESISTÊNCIA DO FEIJOEIRO-COMUM A *Uromyces appendiculatus*.

#### 1. INTRODUÇÃO

A cultura do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é suscetível ao ataque de grande número de patógenos que podem afetar quantitativa e qualitativamente o crescimento e a produção das plantas (VIEIRA, 1983; STAVELY e PASTOR-CORRALES, 1994). A ferrugem, causada pelo fungo *Uromyces appendiculatus*, destaca-se entre as principais doenças do feijoeiro, podendo causar perdas significativas no rendimento esperado da cultura (LINDGREN et al., 1995).

As recomendações para o controle dessa doença incluem práticas culturais como a rotação de culturas e a eliminação dos restos de cultura contaminados (HALL e NASSER, 1994), que visam diminuir o inóculo inicial, assim como o uso de fungicidas e de cultivares resistentes, que diminuem a taxa de progresso da doença (STAVELY e PASTOR-CORRALES, 1994).

O controle dessa doença por produtos químicos é pouco utilizado pelos agricultores, principalmente em culturas não-irrigadas, porque essa técnica demanda conhecimento tecnológico adequado e aumenta o custo de produção. Além disso, os produtos químicos contaminam o ambiente e podem prejudicar a saúde do homem. Nesse sentido, o controle dessas doenças pela utilização de

cultivares resistentes tem recebido atenção dos pesquisadores por ser um método eficiente, seguro, barato e acessível a produtores de qualquer nível econômico.

Métodos convencionais de melhoramento genético visando a obtenção de variedades resistentes a *U. appendiculatus* têm sido amplamente usados (COYNE e SCHUSTER, 1975). Entretanto, a resistência pode ser facilmente "quebrada" em virtude da grande variabilidade patogênica do fungo (FALEIRO, 1997). Essa situação requer novas estratégias de melhoramento, como por exemplo a piramidação de genes de resistência. Segundo KELLY et al. (1994), variedades com os genes *Ur-4*, *Ur-5* and *Ur-3* teriam resistência a 63 das 65 raças de *U. appendiculatus* caracterizadas nos EUA.

Contudo, a piramidação de genes pelos métodos convencionais de melhoramento não é tarefa fácil, principalmente em razão das dificuldades na avaliação dos genes individuais sem realizar inoculações múltiplas, as quais podem levar a dúvidas na avaliação da resistência (VINHADELLI et al., 1997).

Os marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WILLIAMS et al., 1990) têm sido utilizados como auxílio nos programas de melhoramento visando a resistência à ferrugem do feijoeiro (HALEY et al., 1993; MIKLAS et al., 1993; KELLY et al., 1994). Marcadores moleculares fortemente ligados a genes de resistência podem ser usados para monitorar indiretamente a presença desses genes em populações segregantes sem a necessidade de inoculações múltiplas.

No presente trabalho, objetivou-se identificar marcadores RAPD ligados a um bloco gênico que confere resistência a *U. appendiculatus*, presente no cultivar de feijoeiro-comum Ouro Negro, uma das melhores fontes de resistência à ferrugem utilizadas no programa de melhoramento realizado na Universidade Federal de Viçosa.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Uma população de 214 plantas  $F_2$  derivadas do cruzamento entre Ouro Negro e US Pinto111 foi utilizada nos experimentos. O cultivar Ouro Negro é resistente a várias raças de *U. appendiculatus* identificadas no Brasil (FALEIRO et al., 1996, 1999a), enquanto o cultivar US Pinto 111 é considerado o suscetível universal à ferrugem.

As sementes  $F_2$  foram plantadas em vasos de 2,5 L e, quando as folhas primárias apresentavam aproximadamente 2/3 do seu desenvolvimento completo, 10 dias após a semeadura, as plantas foram inoculadas com a mistura de oito raças de *Uromyces appendiculatus* (1, 2, 6, 7, 9, 10, 11 e 13) identificadas por FALEIRO et al. (1999b), as quais foram misturadas equitativamente para a produção do inóculo. Os uredosporos foram suspensos em água destilada contendo 0,05% de Tween 20 ajustando-se a concentração para  $2,0 \times 10^4$  uredosporos/mL, e aspergidos em ambas as superfícies foliares, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº15, acionado por um compressor elétrico (CARRIJO et al., 1980). Após inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$  e 100% de umidade relativa), onde permaneceram por 48 horas, sob fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, foram novamente transferidas para casa de vegetação, onde permaneceram até serem avaliadas. O grau de infecção foi avaliado segundo a escala de 1 a 6 proposta no "The Bean Rust Workshop" (STAVELY et al., 1983). Foram consideradas resistentes as plantas com predominância de pústulas menores que  $300 \mu\text{m}$  (nota  $\leq 3$ ).

Após a avaliação da doença, amostras de DNA de folhas de cada planta  $F_2$ ,

do progenitor resistente (Ouro Negro) e do progenitor suscetível (US Pinto111) foram extraídas de acordo com a metodologia de DOYLE e DOYLE (1990). Para a identificação dos marcadores RAPD ligados ao bloco gênico que confere resistência à ferrugem, foi empregada a metodologia de *Bulk Segregant Analysis*. Os *bulks* foram construídos e testados de acordo com a metodologia proposta por MICHELMORE et al. (1991). A amplificação do DNA foi feita por RAPD-PCR (WILLIAMS et al., 1990). Cada reação de amplificação de 25  $\mu$ l constituiu-se de 25 ng de DNA, 0,1 mM de cada um dos deoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 2,0 mM de  $MgCl_2$ ; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM de KCl; 0,4  $\mu$ M de um oligonucleotídeo iniciador ou *primer* (Operon Technologies, Alameda, CA, EUA) e uma unidade de Taq DNA polimerase. As reações de amplificação foram efetuadas em termociclador Perkin-Elmer, modelo 9600. Os ciclos de amplificação constituíram-se de uma etapa de desnaturação a 94°C por 15 segundos, uma etapa de ligação do *primer* ao DNA molde, a 35°C por 30 segundos e uma etapa de extensão a 72°C, por um minuto. Depois de 40 ciclos, foi efetuada uma última etapa de extensão a 72°C, por 7 minutos. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% contendo 10  $\mu$ g/ml de brometo de etídio. As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas com o sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

Para confirmar a co-segregação do marcador e o fenótipo de resistência à doença, os *primers* que geraram bandas polimórficas nos *bulks* foram testados nos progenitores e em todas as 214 plantas  $F_2$ . Testes de  $\chi^2$  foram usados para confirmar a herança dominante simples da resistência à ferrugem e dos marcadores RAPD identificados. O cálculo da frequência de recombinação e das distâncias genéticas entre os marcadores identificados e o gene que confere resistência à ferrugem, bem como a determinação do posicionamento dos marcadores foram feitas com o auxílio do programa MAPMAKER (LANDER et al., 1987; LINCOLN et al., 1992).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de segregação da resistência à mistura de raças evidenciou a ação de um gene de efeito principal, o qual conferiu uma herança monogênica dominante (Quadro 1). Estudos sobre a herança da resistência utilizando raça individual também evidenciaram a ação de um gene de efeito principal na resistência do feijoeiro-comum à ferrugem (FALEIRO, 1997).

Quadro 1 - Análise da segregação da resistência à ferrugem e da presença e ausência dos marcadores OX11<sub>630</sub> e OF10<sub>1050</sub> em plantas F<sub>2</sub> do cruzamento entre Ouro Negro e US Pinto111

Loco avaliado	Relação observada	Relação Esperada	$\chi^2$	Prob.
Resistência:Sucetibilidade	151:63	3:1	1,12	0,32
Presença:Ausência OX11 <sub>630</sub>	149:65	3:1	3,29	0,08
Presença:Ausência OF10 <sub>1050</sub>	150:64	3:1	2,75	0,16

Foram identificados dois marcadores ligados em acoplamento ao gene que confere resistência à ferrugem: um com 630 pb (OX11<sub>630</sub>) e o outro com 1050 pb (OF10<sub>1050</sub>). Os padrões de amplificação com os dois *primers* que geraram esses marcadores foram altamente reprodutíveis (Figura 1). A análise de segregação

desses fragmentos RAPD evidenciou a natureza dominante desse tipo de marcador (Quadro 1). O número de recombinantes mostrou que os marcadores OX11<sub>630</sub> e OF10<sub>1050</sub> estão localizados a  $5,8 \pm 1,6$  cM e  $7,7 \pm 1,7$  cM do gene, respectivamente (Figura 2).

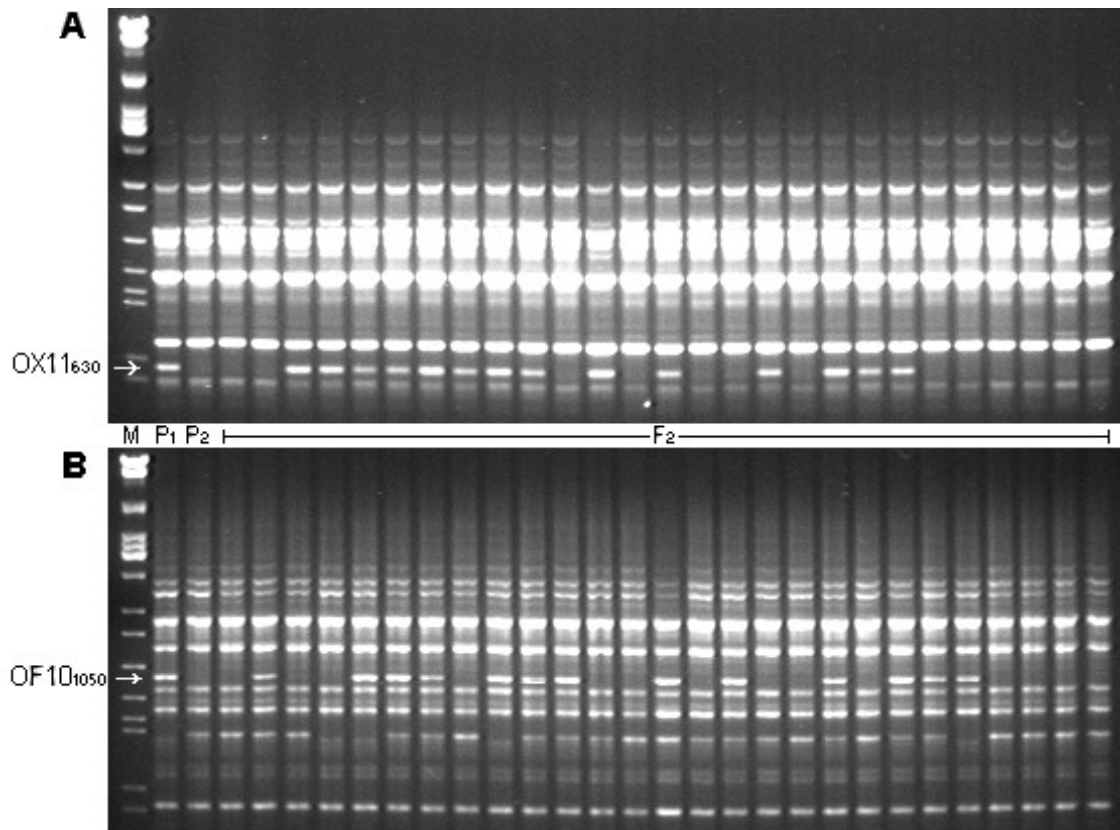


Figura 1 - Produtos de amplificação do DNA dos progenitores Ouro Negro (coluna P<sub>1</sub>) e Pinto111 (coluna P<sub>2</sub>) e das plantas F<sub>2</sub> (demais colunas) utilizando os *primers* OX11 (A) e OF10 (B). A coluna M corresponde ao DNA do fago lambda digerido com *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII* (marcador de peso molecular). As setas indicam as bandas OX11<sub>630</sub> e OF10<sub>1050</sub> ligadas em acoplamento ao gene de resistência à ferrugem.

O fato dos dois marcadores flanquearem o gene de resistência (Figura 2) é extremamente importante para a seleção indireta das plantas resistentes utilizando-se simultaneamente os dois marcadores. Para surgir uma planta

resistente sem os dois marcadores seria necessária a ocorrência de um *crossing-over* em cada lado do loco que contem o gene. Este fato pode ser evidenciado quando estimadas as eficiências de seleção indireta (ESI) de plantas resistentes com base nos marcadores individuais e simultaneamente (Quadro 2). Estimativas preliminares da ESI nas 214 plantas da população F<sub>2</sub> foram 96,6% e 95,3% para os marcadores OX11<sub>630</sub> e OF10<sub>1050</sub>, respectivamente. O uso dos dois marcadores simultaneamente levou a uma eficiência de 100%.

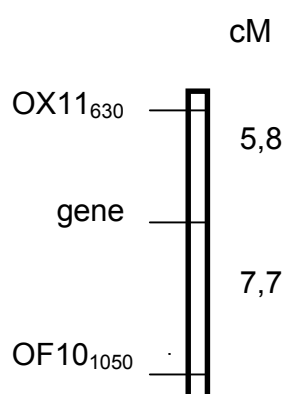


Figura 2 - Distâncias genéticas (cM) dos marcadores OX11<sub>630</sub> e OF10<sub>1050</sub> em relação ao gene de resistência à ferrugem presente no cultivar de feijoeiro-comum Ouro Negro.

Quadro 2 - Eficiência da seleção indireta (ESI) de plantas resistentes à ferrugem com base na presença/ausência de marcadores moleculares individuais ou associados

Marcadores utilizados na seleção indireta	Plantas selecionadas			ESI (%)*
	Resistentes	Suscetíveis	Total	
OX11 <sub>630</sub>	144	5	149	96,6
OF10 <sub>1050</sub>	143	7	150	95,3
OX11 <sub>630</sub> e OF10 <sub>1050</sub>	137	0	137	100,0

\* ESI (%) =(Número de plantas resistentes x 100)/Número total de plantas selecionadas.

\* O cálculo da ESI (%) foi baseado nos indivíduos F<sub>2</sub> utilizados neste trabalho.

Marcadores RAPD ligados a genes de resistência à ferrugem têm sido reportados por outros pesquisadores. MIKLAS et al. (1993) identificaram o marcador OA14<sub>1100</sub> fortemente ligado ao gene *Ur-4* (não encontraram recombinantes em 84 indivíduos F<sub>2</sub>RC<sub>6</sub>). HALEY et al. (1993) identificaram OF10<sub>970</sub> ligado a 2,15 cM do bloco gênico da linha B-190 e o marcador OI19<sub>460</sub> fortemente ligado ao mesmo bloco gênico (não encontraram recombinantes em 97 indivíduos F<sub>2</sub>RC<sub>6</sub>). HALEY et al. (1994) identificaram o marcador OK14<sub>620</sub> ligado a 2,23 cM do gene *Ur-3*. Estes marcadores tem sido utilizados na piramidação dos diferentes genes em um único genótipo (STAVELY et al., 1994, 1997).

Os marcadores citados acima foram testados em nossa população segregante, mas não foi detectado polimorfismo e, em alguns casos, a banda de DNA correspondente ao marcador não foi detectada (dados não apresentados). No entanto, como já discutido, o *primer* OF10 produziu um fragmento de 1050 pb ligado ao gene de resistência do cultivar Ouro Negro. Este *primer* também produziu um fragmento de DNA (970 pb) ligado ao gene que confere a resistência da linha B-190 à ferrugem (HALEY et al., 1993). A pequena diferença entre as bandas de DNA é aparentemente relacionada à metodologia utilizada para estimar os seus tamanhos em pb. Os blocos gênicos de resistência à ferrugem presentes na linha B-190 e no cultivar Ouro Negro são muito semelhantes entre si e provavelmente foram mapeados no mesmo local. Ambos conferem o mesmo tipo de resistência, com imunidade a certas raças de *U. appendiculatus* e pústulas muito pequenas (menores que 0,3 mm de diâmetro) para outras raças. Interessantemente, tanto Ouro Negro quanto B-190 possuem semente preta e alta produtividade.

Os marcadores identificados neste trabalho estão sendo muito úteis para auxiliar a seleção de plantas resistentes à ferrugem no programa de melhoramento do feijoeiro que está sendo desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

A ferrugem, causada pelo fungo *Uromyces appendiculatus*, pode ocasionar perdas significativas na produtividade do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Marcadores RAPD fortemente ligados a genes de resistência à ferrugem podem ser usados em programas de melhoramento para auxiliar no desenvolvimento de cultivares resistentes. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi o de identificar marcadores RAPD ligados a genes de resistência à ferrugem presente no cultivar Ouro Negro. Para isso, foram utilizados 214 indivíduos F<sub>2</sub> originados do cruzamento Ouro Negro (resistente) X US Pinto 111 (suscetível universal). As plantas foram inoculadas com uma mistura de 8 raças de *U. appendiculatus* e a análise da segregação revelou uma herança monogênica dominante. Foi empregada a metodologia de *Bulk Segregant Analysis*. Os *bulks* foram amplificados pela técnica de RAPD com diferentes *primers*. Foram encontrados dois marcadores flanqueando o bloco gênico que confere resistência à ferrugem: OX11<sub>630</sub> (5,8 ± 1,6 cM) e OF10<sub>1050</sub> (7,7 ± 1,7 cM). Considerando os indivíduos F<sub>2</sub>, a seleção indireta de plantas resistentes com base no uso dos dois marcadores simultaneamente leva a 100% de eficiência. Os marcadores identificados neste trabalho estão sendo extremamente úteis no programa de melhoramento da Universidade Federal de Viçosa.

## CAPÍTULO 3

### LIGAÇÃO GÊNICA DA RESISTÊNCIA À FERRUGEM E À ANTRACNOSE NA VARIEDADE DE FEIJOEIRO-COMUM OURO NEGRO

#### 1. INTRODUÇÃO

Apesar da importância da cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) para o Brasil, o rendimento médio nacional é muito baixo. Uma das causas dessa situação é o grande número de doenças às quais a cultura está sujeita (VIEIRA, 1983). A ferrugem e a antracnose, causadas pelos fungos *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* e *Colletotrichum lindemuthianum*, respectivamente, estão entre as mais importantes doenças do feijoeiro, podendo causar perdas de até 100% se as condições ambientais forem favoráveis ao desenvolvimento do patógeno e se cultivares suscetíveis forem utilizadas (VIEIRA, 1983).

As recomendações para o controle dessas doenças incluem práticas culturais, como a rotação de culturas e a eliminação dos restos contaminados de cultura, que visam diminuir o inóculo inicial, assim como o uso de fungicidas e de cultivares resistentes, que diminuem a taxa de progresso da doença (STAVELY e PASTOR-CORRALES, 1994).

A utilização de cultivares resistentes tem recebido atenção dos pesquisadores por ser um método eficiente, seguro, barato e acessível aos

produtores. A primeira etapa para o desenvolvimento de cultivares resistentes é a detecção de genótipos que sirvam como fontes de resistência.

A variedade Ouro Negro apresenta resistência a diferentes raças de ferrugem (FALEIRO et al., 1996; 1999a) e antracnose (LANZA et al., 1997) em condições de casa de vegetação e de campo (VIEIRA et al., 1992). Além da resistência a doenças, outros aspectos como a alta produtividade e boas qualidades culinárias justificam o uso dessa variedade em programa de melhoramento do feijoeiro. No programa de melhoramento realizado na UFV/BIOAGRO/EPAMIG, 'Ouro Negro' tem sido utilizado como fonte de genes de resistência a doenças que estão sendo incorporados na variedade Rudá por retrocruzamentos.

Nos diferentes ciclos de retrocruzamentos envolvendo os genitores Ouro Negro e Rudá, observou-se que a maioria das plantas  $RC_2F_1$  e  $RC_3F_1$  resistentes à ferrugem também eram resistentes à antracnose, indicando que os fatores envolvidos na resistência a essas duas doenças poderiam estar ligados entre si. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estudar a herança da resistência da variedade Ouro Negro à ferrugem e à antracnose, bem como verificar a ocorrência de ligação entre os genes que condicionam a resistência a essas duas doenças.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

A partir de plantas RC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> (Ouro Negro x Rudá) heterozigotas para a resistência à ferrugem e à antracnose, foram obtidas 231 sementes RC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>, as quais foram semeadas em vasos de 2,5 L, sendo 3 plantas por vaso. As folhas primárias com aproximadamente 2/3 do seu desenvolvimento completo, 10 dias após a semeadura, foram inoculadas com uma mistura de uredosporos coletados em diferentes regiões de Minas Gerais. Os uredosporos, na concentração de  $2,0 \times 10^4$  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, evitando-se atingir o ponto de escorrimento. Após inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $>95\%$  de umidade relativa), onde permaneceram por 48 horas, sob fotoperíodo de 12 horas. Em seguida, foram novamente transferidas para a casa-de-vegetação ( $20 \pm 5^\circ\text{C}$ ), onde permaneceram até serem avaliadas. O grau de infecção foi avaliado segundo a escala de 1 a 6 proposta no “The Bean Rust Workshop” (STAVELY et al., 1983). Foram consideradas resistentes as plantas com predominância de pústulas menores que  $300 \mu\text{m}$  (nota  $\leq 3$ ).

Posteriormente à avaliação dos sintomas da ferrugem, aproximadamente 15 dias após a inoculação, a primeira folha trifoliolada das plantas RC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> foi inoculada com uma suspensão contendo  $1,2 \times 10^6$  conídios/mL da raça 89 de *C. lindemuthianum*, com o auxílio de um pincel. 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. Em seguida, 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 feita com base na escala de 1 a 9, descrita por Pastor-Corrales (PASTOR-CORRALES, 1992).

Foram realizadas análises de segregação para testar a hipótese de herança monogênica dominante da resistência à ferrugem e da resistência à antracnose, bem como para testar a hipótese da segregação independente dos genes de resistência às duas doenças. O teste do  $\chi^2$  foi utilizado para tal objetivo.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A hipótese da herança monogênica dominante da resistência à ferrugem não foi rejeitada pelo teste do  $\chi^2$  a uma probabilidade de 0,68 (Quadro 1). A herança monogênica dominante tem sido relatada em vários trabalhos (ZAUMEYER e HARTEY, 1941; AUGUSTIN et al., 1972; CARVALHO et al., 1978; MEINERS, 1981; STAVELY, 1984a; 1984b). Entretanto, existem trabalhos mostrando que a resistência à ferrugem pode ser determinada por um único gene recessivo (ZAITER et al., 1989) e por dois genes com diferentes interações epistáticas (GRAFTON et al., 1985; GRAFTON et al., 1985; SAYLER et al., 1995). Recentemente, FALEIRO (1997), estudando a herança da resistência da variedade Ouro Negro à raça 4 de *U. appendiculatus*, mostrou que um gene de efeito principal possivelmente associado a genes de efeitos secundários seriam responsáveis pela resistência a esta raça fisiológica.

A hipótese da herança monogênica dominante da resistência à antracnose também não foi rejeitada pelo teste do  $\chi^2$  a uma probabilidade de 0,92 (Quadro 1). A ação de um único gene dominante tem sido relatada na literatura (MASTENBROCK, 1960; BANNEROT et al., 1971; ALZATE-MARÍN, 1996). Entretanto, a exemplo do que ocorre com a ferrugem, a herança da resistência à antracnose pode não ser tão simples. PASTOR-CORRALES e ERAZO (1994) demonstraram que dois genes dominantes são responsáveis pela resistência do cultivar G 2333 à raça 571. Além disso, a presença de mais de um gene em interações complexas incluindo epistasia, complementariedade, fatores duplicados e complementares e alelos múltiplos tem sido observada (CÁRDENAS

et al., 1964; MUHALET et al., 1981; PELOSO et al., 1989; VIDIGAL, 1994; ALZATE-MARÍN, 1996).

Quadro 1 - Análises de segregação da resistência à ferrugem e da resistência à antracnose consideradas separada e simultaneamente

Hipóteses	Razão fenotípica teórica esperada	n <sup>o</sup> de plantas observadas em cada classe fenotípica	$\chi^2$	Prob. (%)
Resistência monogênica dominante para a ferrugem	3Rf:1Sf	176Rf:55Sf	0,17	68,3
Resistência monogênica dominante para a antracnose	3Ra:1Sa	174Ra:57Sa	0,01	92,1
Segregação independente dos genes de resistência às duas doenças	9RfRa:3RfSa: 3SfRa:1SfSa	163RfRa:11RfSa: 13SfRa:44SfSa	114,27	1,5

Rf - Plantas resistentes à ferrugem; Sf - Plantas suscetíveis à ferrugem; Ra - Plantas resistentes à antracnose; Sa - Plantas suscetíveis à antracnose.

O teste da hipótese da segregação independente dos genes de resistência à ferrugem e à antracnose presentes na variedade Ouro Negro também é apresentado no Quadro 1. Os dados demonstram que existe uma probabilidade muito baixa (0,015) dos desvios da razão fenotípica esperada (9:3:3:1) serem devidos ao acaso, indicando assim que os genes de resistência à ferrugem e à antracnose presentes em 'Ouro Negro' não segregam independentemente. Considerando que esta variedade é resistente a várias raças de *U. appendiculatus* (FALEIRO et al., 1999a) e a várias raças de *C. lindemuthianum* (LANZA et al., 1997), pode-se deduzir à luz da teoria gene-a-gene, que possam existir em 'Ouro Negro, blocos de genes de resistência à ferrugem e à antracnose localizados no mesmo grupo de ligação. A distância entre estes blocos gênicos é de 12,3 cM,

com base na frequência de recombinação estimada pelo programa MAPMAKER.EXP 3.0 (LANDER et al., 1987).

Para um melhor entendimento da organização genômica de tais genes de resistência, há a necessidade de trabalhos mais detalhados utilizando-se populações segregantes adequadas como, por exemplo, as RIL's (*Recombinant Inbred Lines*), as quais poderiam ser inoculadas com diferentes raças de cada patógeno. Além disso, marcadores moleculares devem ser utilizados para a construção de um mapa de ligação para melhor determinar as posições relativas dos dois potenciais grupos gênicos. O conhecimento detalhado da organização dos genes de resistência pode abrir novas perspectivas para o entendimento da evolução dos genes R e para o desenvolvimento de estratégias eficientes para o melhoramento do feijoeiro-comum visando resistência a doenças

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

A variedade Ouro Negro tem sido utilizada no Programa de Melhoramento do Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) da UFV/BIOAGRO/EPAMIG como fonte de genes de resistência à ferrugem e à antracnose. Para melhor entendimento da herança e da organização desses genes de resistência, foi analisada a segregação de 231 plantas RC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> para a resistência a essas duas doenças. As plantas RC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>, com aproximadamente 10 dias, foram inoculadas com uma mistura de uredosporos de *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* coletados em diferentes municípios de Minas Gerais. Após a avaliação da resistência à ferrugem, as mesmas plantas RC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> foram inoculadas com a raça 89 de *Colletotrichum lindemuthianum*. A análise dos sintomas evidenciou que tanto a resistência à ferrugem, quanto a resistência à antracnose, são controladas por fatores dominantes únicos. Foi também observado que os genes de resistência à ferrugem e à antracnose presentes em 'Ouro Negro' estão ligados entre si. Para melhor entendimento da organização genômica de tais genes de resistência, há a necessidade de trabalhos mais detalhados utilizando-se populações segregantes adequadas como, por exemplo, as RIL's (*Recombinant Inbreed Lines*), as quais poderiam ser inoculadas com diferentes raças de cada patógeno. Além disso, marcadores moleculares devem ser utilizados para a construção de um mapa de ligação para melhor determinação das posições relativas dos dois potenciais blocos gênicos.

## **CAPÍTULO 4**

### **MAPEAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA DO FEIJOEIRO-COMUM À FERRUGEM, ANTRACNOSE E MANCHA-ANGULAR COM O AUXÍLIO DE MARCADORES RAPD**

#### **1. INTRODUÇÃO**

Os genes R que conferem resistência específica às raças atuam diferenciadamente de acordo com o genótipo do patógeno (raças fisiológicas), segundo a teoria gene-a-gene. Segundo FLOR (1955), para cada gene que condiciona uma reação de resistência no hospedeiro existe um gene correspondente no patógeno que condiciona a avirulência. A evolução das interações gene-a-gene tem, como conseqüência na população de plantas, uma diversidade de genes R em diferentes indivíduos de uma espécie hospedeira e uma correspondente diversidade de genes de avirulência em diferentes raças do patógeno (STASKAWICZ et al., 1995).

O estudo da diversidade de genes R, bem como de sua organização genômica têm despertado o interesse de diferentes pesquisadores porque tais estudos abrem novas perspectivas para o entendimento da evolução dos genes R e para o desenvolvimento de estratégias eficientes para o melhoramento visando resistência a doenças. Diferentes trabalhos têm mostrado que as plantas possuem muitos genes que conferem resistência raça-específica, os quais não apresentam

uma distribuição aleatória no genoma. Os genes podem estar organizados em diferentes grupos de ligação ou podem estar ligados (organizados em seqüência ou não), sendo que em todos os casos podem possuir diferentes formas alélicas (PRYOR e ELLIS, 1993).

A organização genômica de genes R tem sido estudada em diferentes patossistemas. No linho, os 30 genes de resistência a *Melampsora lini* foram mapeados em cinco locos, sendo 13 genes no loco *L* e sete no loco *M* (ELLIS et al., 1988). No milho, pelo menos 17 genes de resistência a *Puccinia sorghi* estão agrupados no loco complexo *Rp*, localizado na extremidade do braço curto do cromossomo 10, e outros seis genes foram mapeados no loco *Rp3* do cromossomo 3 (HOOKER, 1985; HULBERT, 1997). Na cevada existem 14 genes de resistência ao míldio-pulverulento localizados no loco *Mla* e vários outros genes no loco *Mlk*. Os locos *Mla* e *Mlk* estão localizados no cromossomo 5, separados por 10 unidades mapa (GIESE, 1981; GIESE et al., 1981). Na alface, 13 genes dominantes de resistência ao míldio estão agrupados em quatro grupos de ligação (PARAN et al., 1991). Os genes *Cf-2* e *Cf-5*, que conferem resistência do tomateiro ao fungo *Cladosporium fulvum*, também estão agrupados (WORDRAGEN et al., 1994). Vários análogos de genes de resistência (RGA) apresentam distribuição não-aleatória no genoma. Por exemplo, no grupo de ligação J de soja, foram mapeados vários clones correspondentes a oito RGA. Neste grupo de ligação e nos demais onde foram localizados RGA, já foram mapeados vários genes de resistência (KANASIN et al., 1996; YU et al., 1996).

No caso do feijoeiro-comum, com o advento dos marcadores moleculares, houve um incremento nos estudos visando o mapeamento de diferentes genes R (KELLY e MIKLAS, 1998). Recentemente, CORRÊA (1999) iniciou o estudo da organização de diferentes genes de resistência da variedade Ouro Negro com o auxílio de marcadores moleculares RAPD. Esta variedade tem apresentado resistência a diferentes raças de *Uromyces appendiculatus* (FALEIRO et al., 1996; FALEIRO et al., 1999a), *Colletotrichum lindemuthianum* (LANZA et al., 1997) e *Phaeoisariopsis griseola* (NIETSCHKE, 1997) em condições de casa de vegetação e também em condições de campo (VIEIRA et al., 1992). CORRÊA (1999), utilizando a técnica de inoculações múltiplas com diferentes raças fisiológicas de *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* e *P. griseola* em populações F<sub>2</sub> derivadas do cruzamento entre Ouro Negro e US Pinto 111 e as respectivas famílias F<sub>2:3</sub>,

demonstrou que a resistência a diferentes raças de *U. appendiculatus* e *C. lindemuthianum* presente em Ouro Negro é conferida por diferentes genes de resistência proximamente ligados e que os genes de resistência às raças 63.39 e 31.23 de *P. griseola* são independentes.

O presente trabalho foi desenvolvido com dois objetivos principais: a) complementar os estudos da organização dos diferentes genes de resistência da variedade Ouro Negro, analisando a segregação da resistência em uma população de 154 linhas endogâmicas recombinantes (RIL's) e b) validar a utilização de diferentes marcadores moleculares, previamente identificados como ligados a genes de resistência do feijoeiro-comum à ferrugem, antracnose e mancha-angular.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material genético

A população segregante composta por 154 RIL's de feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) foi originada do cruzamento entre o cultivar resistente Ouro Negro e o cultivar Rudá, em casa-de-vegetação. O cultivar Rudá apresenta grão tipo carioca e ótimas qualidades agronômicas, contudo é suscetível a várias raças fisiológicas dos fungos causadores da ferrugem, antracnose e mancha-angular. A confirmação dos cruzamentos foi feita utilizando a cor de flor como “gene marcador”. Foram obtidas aproximadamente 40 sementes  $F_1$  as quais foram semeadas em casa de vegetação. Uma amostra de 160 sementes  $F_2$  foi avançada até a geração  $F_7$  utilizando-se o método do descendente de uma única semente, comumente conhecido como SSD (*Single Seed Descent*). Este método é realizado tomando-se uma única semente de cada indivíduo de uma geração para estabelecer a geração subsequente (BRIM, 1966). Conforme sugerido por BRIM (1966), foram semeadas três sementes de cada planta  $F_2$  para assegurar a representatividade da população base. Após a emergência, uma única planta foi preservada. Tal procedimento foi repetido nas gerações seguintes até a geração  $F_7$ , quando o nível de homozigose desejado foi obtido. Cada planta  $F_7$  obtida a partir de uma planta  $F_2$  foi considerada uma linhagem endogâmica recombinante (RIL) e suas sementes foram multiplicadas em casa-de-vegetação para avaliar a segregação da resistência às raças fisiológicas dos fungos causadores da ferrugem, antracnose e mancha-angular.

## 2.2. Avaliação da resistência a doenças

As raças fisiológicas utilizadas neste trabalho foram escolhidas por causarem reações diferenciais nos genitores Rudá e Ouro Negro e por serem identificadas e coletadas no Estado de Minas Gerais. Para cada raça fisiológica, uma semente de cada RIL e genitor (Rudá e Ouro Negro) foi cultivada em casa-de-vegetação. As sementes foram pré-germinadas em papel germitex a 36 °C e, após a emissão da radícula, transferidas para bandejas plásticas contendo uma 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. Em cada bandeja foram plantadas 31 RIL's. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação, antes da inoculação.

### 2.2.1. Resistência à ferrugem

Foram utilizados para a avaliação da resistência das 154 RIL's a *Uromyces appendiculatus* as seguintes raças fisiológicas identificadas por FALEIRO (1999b) e re-classificadas por FALEIRO et al. (1999c): 32 (32132212), 45 (33121211), 46 (33122211), 47 (33131113), 49 (33132212), 52 (33222232) e 56 (33232232). As culturas monospóricas armazenadas a 5 °C e 50% de umidade relativa foram multiplicadas no hospedeiro suscetível US Pinto 111 alguns dias antes da inoculação, visando recuperar a viabilidade dos uredosporos. A inoculação foi feita quando as folhas primárias apresentavam aproximadamente 2/3 do seu desenvolvimento completo, 10 dias após a semeadura. Os uredosporos, na concentração de  $2,0 \times 10^4$  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 inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $>95\%$  de umidade relativa), onde permaneceram por 48 horas, 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 o momento de avaliação dos sintomas. Foi estimado o tamanho médio das pústulas (TMP), quando se completou o período latente (número de dias da inoculação até que 50% das pústulas estivessem esporuladas). O grau de infecção foi avaliado segundo a escala de 1 (imune) a 6 (altamente suscetível) proposta no "The Bean

Rust Workshop” (STAVELY et al., 1983). Foram consideradas resistentes as plantas com predominância de pústulas menores que 300 µm (nota  $\leq 3$ ).

### 2.2.2. Resistência à antracnose

Foram utilizadas as raças fisiológicas 73, 81 e 89 de *Colletotrichum lindemuthianum* para a avaliação da resistência das 154 RIL's a este patógeno. As culturas monospóricas originais das três raças utilizadas 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 raça fisiológica 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 sob temperatura de 23 °C para produção dos conídios a serem utilizados na inoculação. A inoculação foi feita 10 dias após o plantio, utilizando uma suspensão contendo  $1,2 \times 10^6$  conídios/ mL, a qual foi aplicada em ambas 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 feita 10 dias após a inoculação, com base na escala de 1 (imune) a 9 (altamente suscetível) descrita por PASTOR-CORRALES (1992). As plantas que apresentam graus de reação  $\leq 3$ , foram consideradas resistentes.

### 2.2.3. Resistência à mancha-angular

Foram utilizados para a avaliação da resistência das 154 RIL's a *Phaeoisariopsis griseola* as raças fisiológicas 31.23, 31.55, 63.31 e 63.19, identificadas por NIETSCHE (1997). O inóculo de cada raça foi reproduzido em placas contendo meio de suco de vegetais V8 (Campbell Soup Company, EUA) a partir de uma suspensão de conídios e fragmentos de micélio obtidos da cultura original do patógeno. As placas foram incubadas por 12 dias, a 24 °C para produção dos conídios a serem utilizados na inoculação. A inoculação foi feita 15

dias após o plantio, utilizando uma suspensão contendo  $2,0 \times 10^4$  conídios/ mL, a qual foi aplicada em ambas superfícies das folhas primárias, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss n<sup>o</sup> 15, acionado por um compressor elétrico. Após a inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $>95\%$  de umidade relativa), onde permaneceram por 48 horas, 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 mancha-angular foi feita 15 dias após a inoculação, com base em uma escala de severidade de 1 (imune) a 9 (altamente suscetível) (VAN SCHOONHOVEN e PASTOR-CORRALES, 1987). As plantas que apresentam graus de reação  $\leq 3$  foram consideradas resistentes.

### 2.3. Análise dos marcadores moleculares

Amostras de DNA de folhas de cada uma das 154 RIL's, do progenitor resistente (Ouro Negro) e do progenitor suscetível (US Pinto111) foram extraídas de acordo com a metodologia de DOYLE e DOYLE (1990) e amplificadas com 70 diferentes *primers*, 37 dos quais, de acordo com a literatura, geraram marcadores RAPD e SCAR, previamente identificados como ligados a genes de resistência do feijoeiro-comum à ferrugem, antracnose e mancha-angular (Quadro 1). Os *primers* que revelaram polimorfismos nos progenitores foram usados para amplificar amostras de DNA das 154 RIL's. Testes de  $\chi^2$  foram usados para confirmar a herança monogênica dos marcadores moleculares e da resistência a cada uma das raças fisiológicas de *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* e *P. griseola*. O cálculo da frequência de recombinação e das distâncias genéticas entre os marcadores moleculares e os genes de resistência, bem como a determinação do posicionamento dos marcadores foram feitas utilizando a função de mapeamento de Kosambi com o auxílio do programa MAPMAKER (LANDER et al., 1987; LINCOLN et al., 1992). O agrupamento das marcas foi feito adotando um valor de LOD de 4,0 e uma frequência máxima de recombinação de 40 % ( $r= 0,40$ ).

Quadro 1 - Marcadores moleculares ligados a genes de resistência do feijoeiro-comum à ferrugem, antracnose e mancha-angular

Marcador RAPD	Distância (cM) e orientação	Gene de resistência	Patógeno	Fonte de resistência	Referência
OF10 <sub>530</sub>	1,9 - repulsão	<i>Co-1</i>	antracnose	Michigan DRK	YOUNG e KELLY (1997)
OQ4 <sub>1440</sub>	5,5 - acoplamento	<i>Co-2</i>	antracnose	Cornell 49242	YOUNG e KELLY (1996)
OH20 <sub>450</sub>	0,5 - acoplamento	<i>Co-2</i>	antracnose	Cornell 49242	ADAMBLONDON et al. (1994)
OY20 <sub>830</sub>	0,0 - acoplamento	<i>Co-4</i>	antracnose	TO	ALZATE-MARIN et al. (1999a)
OC8 <sub>900</sub>	9,7 - acoplamento	<i>Co-4</i>	antracnose	TO	ALZATE-MARIN et al. (1999a)
OB3 <sub>1800</sub>	3,7 - repulsão	<i>Co-4</i>	antracnose	TO	ALZATE-MARIN et al. (1999a)
OH18 <sub>830</sub>	9,2 - acoplamento	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	antracnose	G 2333	ALZATE-MARIN et al. (1999b)
OAS13 <sub>950</sub>	0,0 - acoplamento	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	antracnose	SEL 1308	YOUNG et al. (1998)
OAL9 <sub>740</sub>	4,5 - acoplamento	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	antracnose	G 2333	YOUNG et al. (1998)
OAB3 <sub>450</sub>	5,9 - acoplamento	<i>Co-5</i>	antracnose	TU, G 2333, SEL 1360	YOUNG e KELLY (1997)
OAH1 <sub>780</sub>	12,3 - acoplamento	<i>Co-6</i>	antracnose	AB 136	YOUNG e KELLY (1997)
OAK20 <sub>890</sub>	7,3 - repulsão	<i>Co-6</i>	antracnose	Catrachita	YOUNG e KELLY (1997)
OAZ20 <sub>940</sub>	7,1 - acoplamento	<i>Co-6</i>	antracnose	AB 136	ALZATE-MARIN et al. (1999a)
OAZ4 <sub>560</sub>	8,5 - acoplamento	<i>Co-6</i>	antracnose	AB 136	ALZATE-MARIN et al. (1999c)
OAZ9 <sub>950</sub>	20,4 - repulsão	<i>Co-6</i>	antracnose	AB 136	ALZATE-MARIN et al. (1999c)
OK14 <sub>620</sub>	2,2 - acoplamento	<i>Ur-3</i>	ferrugem	NEP-II	HALEY et al. (1994)
OAC20 <sub>490</sub>	0,0 - acoplamento	<i>Ur-3</i> <sup>2</sup>	ferrugem	PI 181996	JOHNSON et al. (1995)
OAE19 <sub>890</sub>	6,2 - repulsão	<i>Ur-3</i> <sup>2</sup>	ferrugem	PI 181996	JOHNSON et al. (1995)
OA14 <sub>1100</sub>	0,0 - acoplamento	<i>Ur-4</i>	ferrugem	Early Gallatin	MIKLAS et al. (1993)
OF10 <sub>970</sub>	2,1 - acoplamento	<i>Ur-5</i>	ferrugem	México 309	HALEY et al. (1993)
OI19 <sub>460</sub>	0,0 - acoplamento	<i>Ur-5</i>	ferrugem	México 309	HALEY et al. (1993)
OAA11 <sub>500</sub>	0,0 - acoplamento	<i>Ur-7</i>	ferrugem	Jules (Tara)	PARK et al. (1999)
OAD12 <sub>550</sub>	0,0 - acoplamento	<i>Ur-7</i>	ferrugem	Jules (Tara)	PARK et al. (1999)
OAF17 <sub>900</sub>	0,0 - acoplamento	<i>Ur-7</i>	ferrugem	Jules (Tara)	PARK et al. (1999)
OAB16 <sub>850</sub>	2,2 - acoplamento	<i>Ur-7</i>	ferrugem	Jules (Tara)	PARK et al. (1999)
OAD9 <sub>550</sub>	2,2 - acoplamento	<i>Ur-7</i>	ferrugem	Jules (Tara)	PARK et al. (1999)

Continua...

Quadro 1, Cont.

Marcador RAPD	Distância (cM) e orientação	Gene de resistência	Patógeno	Fonte de resistência	Referência
OJ13 <sub>1800</sub>	5,0 - acoplamento	<i>Ur-9</i>	ferrugem	Pompadour Checa	JUNG et al. (1996)
SCARF10 <sub>1050</sub>	6,9 - acoplamento	<i>Ur-5, Ur-11</i> (?)	ferrugem	Ouro Negro	CORRÊA et al. (1998)
SCARBA8 <sub>560</sub>	6,0 - acoplamento	<i>Ur-5, Ur-11</i> (?)	ferrugem	Ouro Negro	CORRÊA (1999)
OAJ18 <sub>560</sub>	11,1 - acoplamento	<i>Ur-5, Ur-11</i> (?)	ferrugem	Ouro Negro	CORRÊA (1999)
OX-11 <sub>550</sub>	5,8 - acoplamento	<i>Ur-5, Ur-11</i> (?)	ferrugem	Ouro Negro	FALEIRO et al. (2000a)
OE4 <sub>500</sub>	5,8 - acoplamento	Resist. à raça 63.39	Mancha-angular	MAR-2	FERREIRA et al. (1999)
OH13 <sub>490</sub>	5,5 - acoplamento	<i>Phg-1</i>	Mancha-angular	AND277	CARVALHO et al. (1998)
ON2 <sub>890</sub>	5,9 - acoplamento	<i>Phg-2</i>	Mancha-angular	Mexico 54	SARTORATO et al. (1999a)
OAC14 <sub>2400</sub>	6,6 - acoplamento	<i>Phg-2</i>	Mancha-angular	Mexico 54	SARTORATO et al. (1999a)
SCARN2 <sub>890</sub>	5,9 - acoplamento	<i>Phg-2</i>	Mancha-angular	Mexico 54	SARTORATO et al. (1999b)
OAA19 <sub>400</sub>	10,0 - acoplamento	Resist. à raça 63.39	Mancha-angular	Ouro Negro	CORRÊA (1999)
OM2 <sub>425</sub>	5,6 - acoplamento	Resist. à raça 63.23	Mancha-angular	Ouro Negro	CORRÊA (1999)

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Segregação e ligação genética entre os genes de resistência

A análise da segregação da resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular na população de 154 RIL's é apresentada no Quadro 2.

No caso da ferrugem, verificou-se que a segregação da resistência às raças fisiológicas 32, 47, 49, 52 e 56 é típica de uma característica monogênica, enquanto às raças 45 e 46 é típica de uma característica governada por dois genes. Todos os genes de resistência foram herdados a partir do cultivar Ouro Negro. FALEIRO et al. (1996, 1999a) destacaram este cultivar como importante fonte de genes de resistência à ferrugem. Estudos preliminares de alelismo indicam que o grupo de genes de resistência presente no cultivar Ouro Negro difere dos identificados até o momento, entretanto, sugerem que o mesmo pode ser semelhante ao bloco gênico *Ur-11*, o qual está presente nas PI's 181996 e 190078 (STAVELY, comunicação pessoal). FALEIRO et al. (2000a) levantaram a hipótese de que o bloco gênico presente no cultivar Ouro Negro é semelhante ao bloco gênico *Ur-5*, presente na linhagem B-190, baseando-se nas semelhanças fenotípicas entre Ouro Negro e B-190 e na presença, em ambos os genótipos, de um marcador molecular, identificado por HALEY et al. (1993), gerado pelo *primer* OPF10 ligado à resistência à ferrugem. CORRÊA (1999) verificou que o cultivar México 309, que possui o bloco gênico *Ur-5*, também apresentava o mesmo marcador molecular. A presença de tal marcador molecular não garante que Ouro Negro, B-190 e México 309 tenham os mesmos genes no loco marcado, contudo tal observação, juntamente com os dados fenotípicos, evidenciam que tais

cultivares possuem genes de resistência à ferrugem organizados de forma similar.

Quadro 2 - Caracterização fenotípica das 154 RIL's e dos progenitores Ouro Negro (ON) e Rudá quanto à resistência à ferrugem, antracnose e mancha angular

Raças fisiológicas	Notas		Razão teórica nas RIL's*	Relação observada	$\chi^2$	Prob. (%)
	ON	Rudá				
32 (32132212) <sup>Ua</sup>	3	5	1:1	85:69	1,662	19,73
45 (33121211) <sup>Ua</sup>	3	4;3	3:1	111:42	0,49	48,38
46 (33122211) <sup>Ua</sup>	3	4	3:1	114:39	0,02	88,86
47 (33131113) <sup>Ua</sup>	3	5	1:1	80:74	0,234	62,87
49 (33132212) <sup>Ua</sup>	3	5	1:1	82:72	0,649	42,03
52 (33222232) <sup>Ua</sup>	3	4	1:1	79:75	0,104	74,72
56 (33232232) <sup>Ua</sup>	3	6	1:1	80:72	0,421	51,64
73 <sup>Cl</sup>	1	7	1:1	87:67	2,597	10,70
81 <sup>Cl</sup>	1	9	1:1	81:73	0,416	51,91
89 <sup>Cl</sup>	1	9	1:1	89:65	3,74	5,31
31.23 <sup>Pg</sup>	8	2	1:3	45:101	2,639	10,42
31.55 <sup>Pg</sup>	2	7	1:1	84:63	3,00	8,33
63.31 <sup>Pg</sup>	1	5	1:1	85:62	3,599	5,78
63.19 <sup>Pg</sup>	4	2	3:1	98:46	3,704	5,43

<sup>Ua</sup> Raças fisiológicas de *U. appendiculatus*

<sup>Cl</sup> Raças fisiológicas de *C. lindemuthianum*

<sup>Pg</sup> Raças fisiológicas de *P. griseola*

\* Razão teórica esperada 1:1 (hipótese da resistência monogênica); 3:1 e 1:3 (hipótese da resistência determinada por dois genes) e 1:3 (hipótese da resistência determinada por dois genes complementares)

No caso da antracnose, a segregação da resistência das RIL's às raças fisiológicas 73, 81 e 89 evidencia uma herança monogênica da resistência a cada uma das raças. Como ocorreu para a resistência à ferrugem, todos os genes foram herdados a partir do cultivar Ouro Negro. Na tentativa de entender a origem desses genes de resistência, CORRÊA (1999) verificou que os cultivares Cornell 49-242, México 222 e AB 136, que possuem os genes de resistência à antracnose Co-2, Co-3 e Co-6, respectivamente, apresentavam os marcadores SCARF10 e SCARBA8. Esses marcadores moleculares apresentam-se ligados aos genes de resistência à antracnose presentes no cultivar Ouro Negro. Estudos de alelismo envolvendo esses genótipos estão sendo conduzidos para um melhor entendimento da origem dos genes de resistência do cultivar Ouro Negro.

No caso da mancha-angular, a análise de segregação dos genes de resistência às quatro raças fisiológicas testadas mostra diferentes modos de herança. Para as raças fisiológicas 31.55 e 63.31, a herança é tipicamente monogênica, enquanto para a raça fisiológica 63.19, a resistência é conferida por dois genes. No caso da resistência à raça fisiológica 31.23, a segregação de uma planta resistente para cada três suscetíveis indica o envolvimento de dois genes complementares, ou seja, o fenótipo de resistência somente é manifestado com a presença dos dois genes. CORRÊA (1999) analisando a herança da resistência do cultivar Ouro Negro à raça fisiológica 31.23 em uma população F<sub>2</sub>, hipotetizou que a resistência era determinada por um gene recessivo. Tal hipótese não foi confirmada na população de RIL's, uma vez que a segregação de uma planta suscetível para cada planta resistente não foi verificada.

A análise de ligação genética entre os genes de resistência que segregaram na razão monogênica de 1:1 é apresentada na Figura 1. Verifica-se que os genes de resistência às raças fisiológicas 32, 47, 49, 52 e 56 de *U. appendiculatus* estão proximamente ligados. Tal ligação também é verificada para os genes de resistência às raças fisiológicas 73, 81 e 89 de *C. lindemuthianum* e às raças fisiológicas 31.55 e 63.31 de *P. griseola*. O agrupamento de genes de resistência de plantas já foi relatado em diversas plantas. O exemplo típico é o loco *M* de resistência à ferrugem do linho. Neste loco, arranjos em seqüência de genes R relacionados com diferentes especificidades são encontrados no genoma da planta (ELLIS et al., 1988). Similarmente, análises moleculares do loco N de resistência ao TMV em fumo e o loco Cf-9 em tomate têm revelado uma família de genes agrupados (JONES et al., 1994; WHITHAM et al., 1994).

A análise de ligação genética também mostra que os genes de resistência à ferrugem encontram-se no mesmo grupo de ligação que contém os genes de resistência à antracnose. Como todos os genes de resistência à ferrugem e antracnose são herdados a partir de Ouro Negro, a introgressão desses genes em cultivares com grão tipo carioca tem sido facilitada no Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV (FALEIRO et al., 2000b).

### **3.2. Validação do uso de diferentes marcadores moleculares**

A amplificação das 154 RIL's com os 70 diferentes *primers* geraram 50 bandas polimórficas, 26 das quais foram geradas pelos *primers* que originaram os

marcadores listados no Quadro 1. Das 50 bandas, 43 apresentaram segregação monogênica (1:1) e foram utilizadas na análise de ligação genética com os genes de resistência. Das 43 bandas polimórficas, nove foram mapeadas nos grupos de ligação que contêm os genes de resistência (Figura 1).

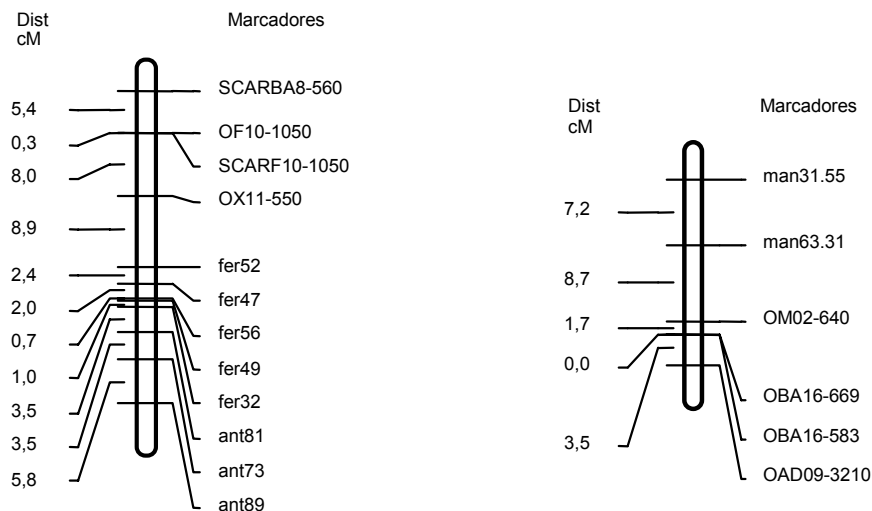


Figura 1 - Distâncias genéticas e ordem dos locos nos grupos de ligação contendo os genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular e marcadores moleculares RAPD e SCAR.

Pôde-se verificar que a utilidade de marcadores RAPD, previamente identificados como ligados a genes de resistência do feijoeiro a doenças é muito restrita. Apenas foram validados, nas RIL's, os marcadores identificados em populações segregantes obtidas a partir de cruzamento inicial envolvendo o progenitor resistente Ouro Negro: SCARF10<sub>1050</sub>, SCARBA8<sub>560</sub>, OF10<sub>1050</sub>, OX11<sub>550</sub> e OM2<sub>425</sub>.

Os marcadores OAJ18<sub>560</sub> e OAA19<sub>400</sub>, embora tenham sido identificados em populações advindas do progenitor Ouro Negro, não foram validados na população de RIL's. Este fato indica que, para alguns marcadores, a mudança do progenitor suscetível pode comprometer a sua utilidade. Os dois marcadores citados acima foram identificados em populações segregantes obtidas do cruzamento entre Ouro Negro e US Pinto 111. Estudos de diversidade, utilizando marcadores moleculares RAPD, mostraram que a variedade US Pinto 111 é mais

distante do Ouro Negro do que a variedade Rudá (VASCONCELOS et al., 1996). Esta maior distância genética permitiu a identificação de maior número de marcadores nas populações Ouro Negro x US Pinto 111 do que nas populações Ouro Negro x Rudá.

A comparação dos resultados desse trabalho com os obtidos por CORRÊA (1999) mostra que os marcadores *SCAR*F10<sub>1050</sub>, *SCAR*BA8<sub>560</sub>, OF10<sub>1050</sub>, OX11<sub>550</sub> e OM2<sub>425</sub> ficaram mais distantes dos genes de resistência na população Ouro Negro x Rudá do que na população Ouro Negro x US Pinto 111, além da mudança de posição de alguns dos marcadores. Como a distância genética é calculada com base na frequência de recombinação, a maior similaridade entre Ouro Negro e Rudá pode ter favorecido um maior número de recombinações, aumentando assim, as distâncias genéticas. A mudança de posição pode ser explicada com base na ação de diferentes genes "menores" de resistência presentes nos cultivares Rudá e US Pinto 111, os quais levaram a diferentes avaliações fenotípicas da resistência nas diferentes populações.

A utilidade de marcadores moleculares RAPD em populações diferentes daquela onde foram identificados vai depender entre outros fatores do grau de ligação entre o marcador e o gene de interesse e da similaridade genética entre os genitores utilizados nas diferentes populações. Normalmente, a identificação de marcadores e o desenvolvimento de variedades melhoradas têm envolvido diferentes populações e diferentes genitores, o que tem limitado muito o impacto esperado do melhoramento assistido por marcadores (TANKSLEY e NELSON, 1996).

Três novos marcadores moleculares ligados à resistência do feijoeiro-comum às raças fisiológicas 31.55 e 63.31 de *P. griseola* foram identificados neste trabalho (Figura 1). As amplificações desses fragmentos foram consistentes e permitiram uma visualização clara em géis de agarose (Figura 2). Os marcadores OBA16<sub>669</sub> e OAB16<sub>583</sub> estão ligados em acoplamento e o marcador OAD9<sub>3210</sub> em repulsão ao bloco gênico de resistência do cultivar Ouro Negro à mancha-angular.

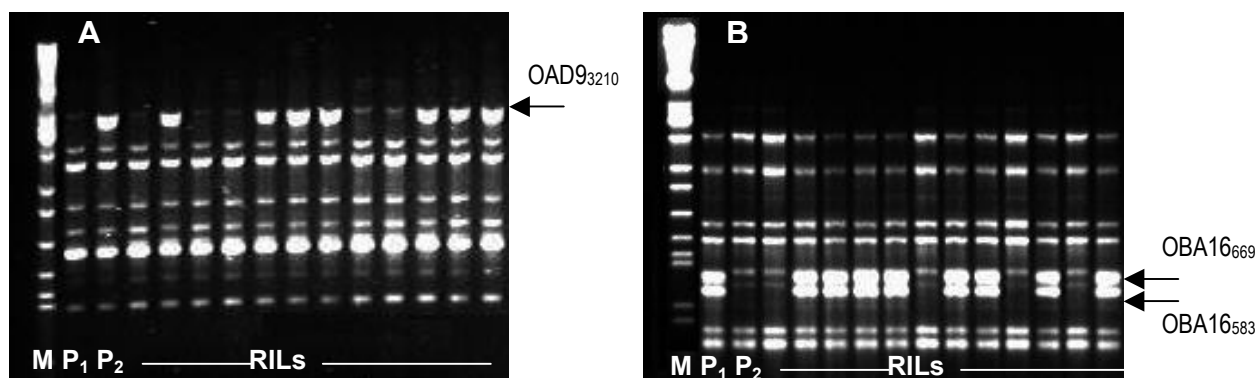


Figura 2 – Produtos de amplificação de produzidos com os *primers* OAD9 (A) e OBA16 (B). Em ambos géis, P<sub>1</sub> corresponde ao cultivar Ouro Negro, P<sub>2</sub> ao cultivar Rudá e RIL's a 12 linhagens da população. Linha M contem DNA de fago-lambda digerido com *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII* (marcador de peso molecular). As setas indicam os marcadores OAD9<sub>3210</sub> (A), OBA16<sub>669</sub> e OBA16<sub>583</sub>(B).

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

A organização de diferentes genes de resistência da variedade Ouro Negro de feijoeiro-comum à ferrugem, antracnose e mancha-angular foi estudada com o auxílio de marcadores moleculares. Uma população de 154 linhas endogâmicas recombinantes (RIL's) obtidas do cruzamento inicial entre Ouro Negro e Rudá foram inoculadas com sete raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus*, três de *Colletotrichum lindemuthianum* e quatro de *Phaeoisariopsis griseola*. Amostras de DNA de cada uma das RIL's foram amplificadas via PCR utilizando 70 diferentes primers. A análise da segregação da resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular na população de 154 RIL's revelou diferentes modos de herança da resistência a cada uma das raças fisiológicas. A análise de ligação genética revelou o agrupamento dos diferentes genes de resistência à ferrugem e à antracnose no mesmo grupo de ligação. Os genes de resistência à mancha-angular também foram mapeados juntos, porém em outro grupo de ligação. Verificou-se neste trabalho que a utilidade de marcadores RAPD, previamente identificados como ligados a genes de resistência do feijoeiro a doenças, é restrita, visto que apenas cinco dos 38 marcadores moleculares testados foram validados na população de RIL's como ligados aos genes de resistência. Foram identificados os marcadores OBA16<sub>669</sub> e OAB16<sub>583</sub>, ligados em acoplamento, e o marcador OAD9<sub>3210</sub>, ligado em repulsão, ao bloco gênico de resistência do cultivar Ouro Negro à mancha-angular.

## **CAPÍTULO 5**

### **ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS GENÉTICOS, CORRELAÇÕES FENOTÍPICAS, GENOTÍPICAS E AMBIENTAIS E ANÁLISE DE TRILHA EM RIL's DE FEIJOEIRO-COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.)**

#### **1. INTRODUÇÃO**

No planejamento e execução de um programa de melhoramento, no contexto da genética quantitativa, é de fundamental importância o conhecimento de uma série de informações da população que está sendo melhorada. A quantificação da variabilidade genética e a estimação de parâmetros são fundamentais, pois possibilitam conhecer a estrutura genética da população. O estudo de correlações entre diferentes características de interesse também assume grande importância, principalmente quando, ao efetuar-se a seleção de um caráter, ocorrem modificações em outras características relacionadas a ele (RAMALHO et al., 1979).

O conhecimento dos coeficientes de correlação é um requisito básico, quando se objetiva quantificar a magnitude e direção das influências de uma determinada característica sobre outra ou quando pretende-se 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).

Este trabalho teve como objetivo obter informações sobre uma população de 154 *Recombinant Inbred Lines* (RIL's) de feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) por meio da estimação de diferentes parâmetros genéticos e correlações fenotípicas, genotípicas e ambientais entre diferentes características agronômicas. Procurou-se também verificar os efeitos diretos e indiretos de cada característica sobre a produção, mediante o uso da análise de trilha.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho, o ensaio foi conduzido no período de abril a julho de 1999, na Estação Experimental de Coimbra da Universidade Federal de Viçosa.

### 2.1. Material genético

Foi utilizada no ensaio uma população segregante composta por 154 RIL's de feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), a qual foi obtida visando o desenvolvimento de um mapa genético intra-específico e a seleção de linhagens promissoras de feijoeiro a serem enviadas para a realização de Ensaio Preliminares de Linhagens pela EMBRAPA-Arroz e Feijão. Para a obtenção da população segregante, o cultivar Rudá foi cruzado com o cultivar Ouro Negro, em casa-de-vegetação. A confirmação dos cruzamentos foi feita utilizando a cor de flor como “gene marcador”. Foram obtidas, aproximadamente 40 sementes  $F_1$ , as quais foram semeadas em casa de vegetação. Uma amostra de 160 sementes  $F_2$  foi avançada até a geração  $F_7$  utilizando o método do descendente de uma única semente, comumente conhecido como SSD (*Single Seed Descent*). Este método é realizado tomando-se uma única semente de cada indivíduo de uma geração para estabelecer a geração subsequente (BRIM, 1966). Conforme sugerido por BRIM (1966), foram semeadas três sementes de cada planta  $F_2$  para assegurar a representatividade da população base. Após a emergência, uma única planta foi preservada. Tal procedimento foi repetido nas gerações seguintes até a  $F_7$ , quando o nível de homozigose desejado foi obtido. Cada planta  $F_7$  obtida a partir de uma planta  $F_2$  foi considerada uma linhagem endogâmica recombinante (RIL) e

suas sementes foram multiplicadas em casa-de-vegetação para do ensaio no campo.

## **2.2. Delineamento experimental**

Foi utilizado no ensaio o delineamento de blocos completos casualizados, com quatro repetições. Cada parcela experimental foi formada por 10 sementes distribuídas em uma fileira de 1,0 metro de comprimento espaçadas de 0,5 m entre si. Foi utilizada uma bordadura, contornando todo o experimento. Os tratamentos culturais foram os normalmente recomendados para a cultura do feijão, sendo utilizada a irrigação quando necessária.

## **2.3. Caracteres avaliados**

Número de dias até o florescimento (FLOR) - A partir do plantio, foi contado o número de dias até que, pelo menos, 50% das plantas apresentassem uma flor.

Número de dias até a maturação (MAT) - A partir do plantio, foi contado o número de dias até quando 90% das vagens estivessem secas.

"Stand" final (STFI) - Número total de plantas presentes na parcela, na data da colheita.

Número de vagens por parcela (VAPAR) - Número total de vagens por parcela.

Peso de 100 sementes (P100) - Peso de 100 sementes amostradas em cada parcela.

Produção de grãos (PRTOT) - Peso total das sementes de cada parcela, expresso em gramas.

Número médio de vagens por planta (VAPLA) - Foi calculado dividindo-se VAPAR por STFI.

Número médio de sementes por planta (SEPLA) - Foi calculado pela fórmula:

$$SEPLA = \frac{PRTOT * 100}{P100 * STFI}$$

Número médio de sementes por vagem (SEVAG) - Foi calculado dividindo-se SEPLA por VAPLA.

Produção média por planta (PRPLA) - Foi calculada dividindo-se PRTOT por STFI.

Produção média por vagem (PRVAG) - Foi calculada dividindo-se PRTOT por VAPAR.

#### 2.4. Análises de variância

A análise de variância foi feita para cada uma das características. O modelo estatístico adotado foi o seguinte:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + B_j + \varepsilon_{ij} ,$$

em que

$Y_{ij}$  = Valor da característica da i-ésima RIL no j-ésimo bloco;

$\mu$  = média geral;

$G_i$  = efeito da i-ésima RIL ( $i = 1, 2, \dots, g$ );

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

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

No Quadro 1, encontra-se o esquema da análise de variância desse modelo.

Quadro 1. Esquema da análise de variância do modelo em blocos completos casualizados

FV	GL	QM	E(Q.M.)	F
Blocos	$r - 1$			
Genótipos	$g - 1$	QMg	$\sigma^2 + r\sigma_g^2$	QMg/QMe
Erro	$(r - 1)(g - 1)$	QMe	$\sigma^2$	

#### 2.5. Parâmetros genéticos e seus estimadores

A partir das análises de variância de cada característica, foram obtidas as estimativas da variância genotípica entre linhagens ( $\hat{\sigma}_g^2$ ), da variância fenotípica a nível de média ( $\hat{\sigma}_f^2$ ) e da variância ambiental média ( $\hat{\sigma}_e^2$ ). Os demais parâmetros genéticos estimados foram:

Herdabilidade ao nível de média ( $h^2$ ) -

$$h^2 (\%) = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\text{QMg}} 100$$

Coefficiente de variação experimental (CVe) -

$$\text{CVe} (\%) = \frac{\sqrt{\text{QMe}}}{\bar{x}} 100, \text{ onde } \bar{x} = \text{média do carácter considerado}$$

Coefficiente de variação genético (CVg) -

$$\text{CVg} (\%) = \frac{\sqrt{\hat{\sigma}_g^2}}{\bar{x}} 100$$

Relação CVg/CVe -

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

## 2.6. 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 destas análises, foram obtidas as estimativas da covariância genotípica, fenotípica e ambiental entre os caracteres dois a dois e finalmente os coeficientes de correlação como segue:

Coefficiente de correlação genotípica ( $r_g$ ) -

$$r_g = \frac{\text{Cov}_g(X, Y)}{\sqrt{\hat{\sigma}_g^2(X) \cdot \hat{\sigma}_g^2(Y)}}$$

Coefficiente de correlação fenotípica ( $r_f$ ) -

$$r_f = \frac{\text{Cov}_f(X, Y)}{\sqrt{\hat{\sigma}_f^2(X) \cdot \hat{\sigma}_f^2(Y)}}$$

Coefficiente de correlação ambiental ( $r_a$ ) -

$$r_a = \frac{\text{Cov}_a(X, Y)}{\sqrt{\hat{\sigma}^2(X) \cdot \hat{\sigma}^2(Y)}}$$

em que:

$C\hat{v}_g(X, Y)$ ,  $C\hat{v}_f(X, Y)$  e  $C\hat{v}_a(X, Y)$  = Estimadores da covariância genotípica, fenotípica e ambiental, respectivamente, entre dois caracteres X e Y;

$\hat{\sigma}_g^2(X)$ ,  $\hat{\sigma}_f^2(X)$  e  $\hat{\sigma}^2(X)$  = Estimadores da variância genotípica, fenotípica e ambiental, respectivamente, do carácter X;

$\hat{\sigma}_g^2(Y)$ ,  $\hat{\sigma}_f^2(Y)$  e  $\hat{\sigma}^2(Y)$  = Estimadores da variância genotípica, fenotípica e ambiental, respectivamente, do carácter Y.

## 2.7. Análise de trilha

Para a análise de trilha foi considerado um único modelo causal, em que a variável principal, produção por planta, seria influenciada pelos diferentes caracteres, considerando-se o efeito direto de cada carácter e efeitos indiretos via outros caracteres correlacionados. 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 e fenotípica foram desdobrados em efeitos diretos e indiretos sobre a produção por planta.

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 a análise de trilha, os dados de cada carácter em estudo são padronizados, através da divisão de seu desvio, em relação à média pelo seu 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:

$$y = p_1 x_1 + p_2 x_2 + \dots + p_n x_n + p_\varepsilon u$$

Por este modelo estimam-se os efeitos diretos e indiretos dos caracteres explicativos sobre o carácter principal, considerado a produção por planta. Os

coeficientes de trilha são estimados a partir do sistema de equações  $X'X\hat{\beta} = X'Y$ , sendo:

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

Assim, tem-se:

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

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

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

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

Neste trabalho, os coeficiente de trilha foram calculados com base tanto na matriz de correlações genotípicas quanto na matriz de correlações fenotípicas. 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:

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

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

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 utilizados 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, descrita por BELSLEY et al. (1980).

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

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Análise de variância e estimativas de parâmetros genéticos**

Os resultados da análise de variância de cada caráter, quanto aos quadrados médios, bem como as estimativas de diferentes parâmetros genéticos, são apresentados no Quadro 2. Verifica-se que há diferenças significativas pelo teste F a 1% de probabilidade entre as RIL's em todos os caracteres, indicando a existência de considerável variabilidade genética entre elas. As estimativas das variâncias genótípicas frente às estimativas das variâncias fenotípicas e ambientais confirmam a existência de variabilidade genética entre as RIL's para todos os caracteres avaliados. Esta variabilidade genética é primordial para a realização do programa de melhoramento, permitindo ao melhorista a seleção e obtenção de linhagens superiores (ALLARD, 1971).

As estimativas da herdabilidade no sentido amplo ao nível de médias foram superiores a 70% para cinco dos oito caracteres avaliados. A menor estimativa da herdabilidade foi obtida com o caráter produção por planta, sendo de 37,25%. Esta estimativa, apesar de ser bem inferior às demais, pode ser considerada satisfatória para o sucesso na seleção deste caráter. Os caracteres VAPLA, P100 e SEVAG, considerados determinantes primários para a produção, tiveram estimativas de herdabilidade relativamente altas: 51,00%, 91,26% e 70,77%, respectivamente. Estas estimativas altas de herdabilidade possibilitam maior eficiência no processo seletivo, sendo importante salientar que o material genético utilizado apresenta nível de homozigose elevado, em virtude das sete gerações de autofecundação, o que possibilita dizer que praticamente toda herdabilidade é devida à presença de

genes de natureza aditiva.

Com relação aos coeficientes de variação ambiental (CVe), que permitem avaliar a precisão do experimento, as estimativas variaram de 1,60% a 27,05%, sendo que, de acordo com o critério de classificação de GOMES (1985), houve, cinco caracteres com CVe baixo e três com CVe alto. Os caracteres que apresentaram maior coeficiente de variação foram VAPLA, SEPLA e PRPLA. Entretanto, a magnitude destes CVe é semelhante a encontrada por outros autores (RAMALHO et al., 1979; CASTOLDI, 1991) e está dentro dos limites aceitáveis na experimentação agrícola.

Quadro 2 - Quadrados médios de genótipos (QMg) e do erro (QMe) e estimativas das variâncias genotípica ( $\hat{\sigma}_g^2$ ), fenotípica a nível de média ( $\hat{\sigma}_f^2$ ) e ambiental ( $\hat{\sigma}_e^2$ ), da herdabilidade ao nível de média ( $h^2$ ), dos coeficientes de variação experimental (CVe) e genético (CVg), da relação CVg/CVe e da média ( $\bar{x}$ ) de cada caráter avaliado em 154 RIL's de feijoeiro-comum

Estimativas	Caracteres							
	FLOR	MAT	VAPLA	P100	SEPLA	SEVAG	PRPLA	PRVAG
QMg	12,19	17,23	28,82	13,59	787,52	0,35	27,33	0,035
QMe	1,02	2,34	14,13	1,19	393,10	0,10	17,15	0,006
$\hat{\sigma}_g^2$	2,79	3,72	3,67	3,10	97,35	0,062	2,55	0,0072
$\hat{\sigma}_f^2$	3,05	4,31	7,21	3,40	196,88	0,089	6,83	0,0087
$\hat{\sigma}_e^2$	0,25	0,59	3,53	1,19	99,52	0,026	4,29	0,0015
$h^2(\%)$	91,62	86,39	51,00	91,26	49,45	70,77	37,25	83,05
CVe(%)	2,40	1,60	22,81	5,72	24,77	6,57	27,05	8,24
CVg(%)	3,96	2,02	11,63	9,24	12,25	5,11	10,42	9,12
CVg/CVe	1,65	1,26	0,51	1,62	0,49	0,78	0,38	1,11
$\bar{x}$	42,15	95,64	16,48	19,06	80,54	4,90	15,31	0,93

Todos QMg foram significativos a 1% de probabilidade pelo teste F; FLOR (número de dias até o florescimento); MAT (número de dias até a maturação); VAPLA (número médio de vagens por planta); P100 (peso de 100 sementes); SEPLA (número médio de sementes por planta); SEVAG (número médio de sementes por vagem); PRPLA (produção média por planta) e PRVAG (produção média por vagem).

A utilização do coeficiente de variação genético (CVg) permite a comparação da variabilidade genética dos diferentes caracteres analisados. Observa-se pelo Quadro 2, que os valores obtidos variaram de 2,02% a 12,25%, sendo que altos CVg foram obtidos com caracteres primários da produção, como VAPLA, SEPLA e PRPLA. Contudo, para se ter uma idéia real da situação de cada carácter visando o melhoramento, é importante analisar o CVg juntamente com o CVe, por meio da relação CVg/CVe. Os caracteres com situações mais favoráveis ao melhoramento apresentam CVg superior ao CVe. De acordo com esse critério, os caracteres FLOR, MAT, P100 e PRVAG seriam os mais satisfatórios ao melhoramento.

Grandes variações nas estimativas de parâmetros genéticos dos caracteres do feijoeiro-comum são observadas na literatura. No entanto, deve-se considerar que tais variações podem ser consequência dos diferentes métodos utilizados na estimação, dos distintos materiais genéticos analisados, das diferentes condições ambientais e da época de plantio, dentre outros fatores (FALCONER, 1987; VENCOVSKY e BARRIGA, 1992).

### **3.2. Coeficientes de correlação**

As estimativas dos coeficientes de correlação genotípica, fenotípica e ambiental são apresentadas no Quadro 3. Estes resultados mostram que houve concordância de sinais nas correlações fenotípicas e genotípicas. Com relação às magnitudes, de um modo geral, as correlações genotípicas foram maiores que as fenotípicas. Tal superioridade não foi observada nas correlações dos caracteres MAT, VAPLA, SEPLA, SEVAG, PRVAG com a produção por planta, indicando que a expressão fenotípica da associação destes caracteres com a produção por planta é aumentada pelas influências do ambiente. Este fato é confirmado pelos altos valores da correlação ambiental entre estes caracteres com a produção por planta.

As correlações genotípicas e ambientais, envolvendo o carácter produção por planta com os outros caracteres não apresentaram diferenças de sinais. Esta observação é importante, pois indica que a possibilidade de seleção indireta, baseada nos índices de correlação genotípica, não seria prejudicada pela ação diferencial do ambiente sobre as variáveis envolvidas.

Quadro 3- Estimativas dos coeficientes de correlação genotípica, fenotípica e ambiental entre oito caracteres estudados em 154 RIL's de feijoeiro-comum

Carac- teres	Corre- lações	Caracteres						
		MAT	VAPLA	P100	SEPLA	SEVAG	PRPLA	PRVAG
FLOR	$r_g$	0,862	0,240	-0,574	0,431	0,3939	-0,035	-0,329
	$r_f$	0,816	0,164	-0,528	0,2881	0,3141	-0,024	-0,2921
	$r_a$	0,456	0,001	-0,0311	-0,008	-0,019	-0,018	-0,043
MAT	$r_g$		0,355	-0,396	0,453	0,212	0,151	-0,246
	$r_f$		0,342	-0,337	0,393	0,157	0,191	-0,200
	$r_a$		0,411	0,132	0,369	-0,043	0,360	0,056
VAPLA	$r_g$			-0,387	0,883	-0,204	0,6411	-0,499
	$r_f$			-0,209	0,925	-0,077	0,805	-0,243
	$r_a$			0,267	0,967	0,119	0,947	0,285
P100	$r_g$				-0,535	-0,305	0,284	0,800
	$r_f$				-0,306	-0,244	0,2672	0,784
	$r_a$				0,255	0,005	0,434	0,718
SEPLA	$r_g$					0,244	0,642	-0,346
	$r_f$					0,265	0,825	-0,094
	$r_a$					0,315	0,975	0,437
SEVAG	$r_g$						-0,005	0,248
	$r_f$						0,125	0,323
	$r_a$						0,294	0,593
PRPLA	$r_g$							0,333
	$r_f$							0,365
	$r_a$							0,551

FLOR (número de dias até o florescimento); MAT (número de dias até a maturação); VAPLA (número médio de vagens por planta); P100 (peso de 100 sementes); SEPLA (número médio de sementes por planta); SEVAG (número médio de sementes por vagem); PRPLA (produção média por planta); e PRVAG (produção média por vagem).

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 mais tarde. As correlações entre estes dois caracteres com a produção por planta foram pequenas, indicando a possibilidade de obtenção de linhagens produtivas com diferentes ciclos de produção.

Os caracteres VAPLA e SEPLA foram os que apresentaram maiores correlações genotípicas com a produção por planta: 0,641 e 0,642, respectivamente. As correlações fenotípicas destes dois caracteres com a produção por planta foram ainda maiores (0,805 e 0,825, respectivamente) visto que a alta correlação ambiental ( $>0.94$ ) entre os caracteres envolvidos, ou seja, o ambiente que favorece a produção por planta, favorece também os caracteres VAPLA e SEPLA.

Os caracteres P100, SEVAG e PRVAG, também considerados componentes primários da produção, não apresentaram altas correlações genotípicas com a produção por planta, sendo de 0,284, -0,005 e 0,333 respectivamente. Estes resultados mostram que o P100, SEVAG e PRVAG não serviriam como bons critérios de seleção, pelo menos quando usados individualmente, visando o aumento da produção por planta, na população analisada neste trabalho.

### **3.3. Análise de trilha**

Com base no diagnóstico de multicolinearidade, foi verificado que as matrizes de correlações genotípicas e fenotípicas com todos os caracteres avaliados apresentam problemas severos de multicolinearidade. As matrizes  $X'X$  das correlações genotípicas e fenotípicas apresentam determinantes de 0,000000 e 0,000002 e número de condição (NC) de 6603 e 1337, respectivamente. Segundo MONTGOMERY e PECK (1981), determinante da matriz próximo de zero e  $NC > 1000$  é indício de multicolinearidade severa. Analisando os elementos dos autovetores associados aos autovalores das matrizes de correlações genotípicas e fenotípicas, segundo método descrito por BELSLEY et al. (1980), foi verificado que os caracteres FLOR, SEVAG e PRVAG apresentavam pouca importância na explicação do modelo e levavam aos problemas de multicolinearidade, sendo por isso, eliminados do modelo.

A eliminação das características FLOR, SEVAG e PRVAG das matrizes de correlações genotípicas e fenotípicas alterou os determinantes das matrizes para 0,1139 e 0,0987, respectivamente, diminuindo consideravelmente o problema de multicolinearidade. O grau elevado de multicolinearidade presente nas matrizes de correlações utilizadas na análise de trilha pode tornar o processo de estimação dos coeficientes não confiável e também afetar o coeficiente de determinação total

( $R^2$ ) da análise. Problemas de multicolinearidade pode tornar a matriz  $X'X$ , utilizada na análise de trilha, não-singular, fazendo, conseqüentemente, com que as estimativas de mínimos quadrados não sejam confiáveis (CRUZ, 1997).

Após a eliminação dos caracteres FLOR, SEVAG e PRVAG das matrizes de correlações genotípicas e fenotípicas, a análise de trilha foi feita utilizando um modelo causal único, onde cada um dos caracteres explicativos MAT, VAPLA, P100 e SEPLA exerceriam sobre o carácter principal, produção por planta, um efeito direto e efeitos indiretos via outros caracteres correlacionados (Figura 1).

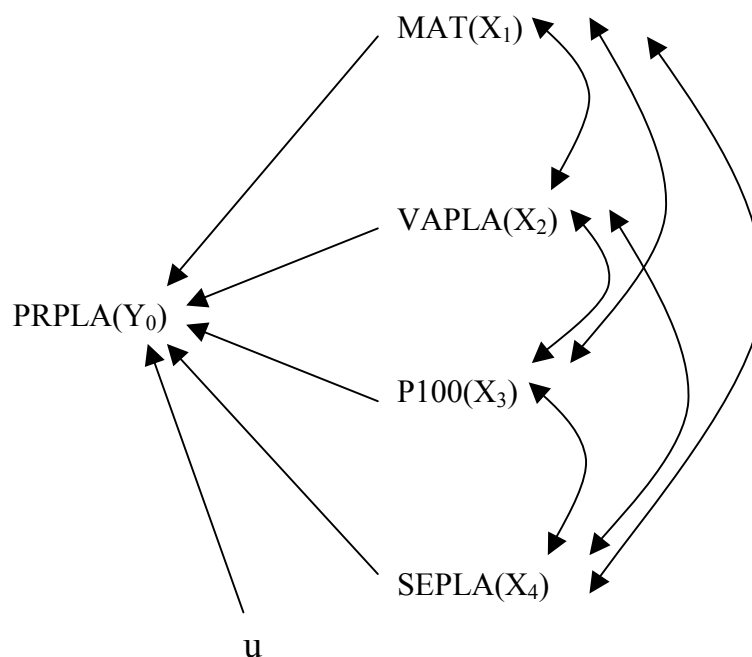


Figura 1 - Diagrama causal indicando o inter-relacionamento dos caracteres explicativos (MAT, VAPLA, P100 e SEPLA) e residual ( $u$ ) sobre o carácter principal (produção por planta). As setas unidirecionais indicam efeito direto de cada caracter explicativo ( $p_{0i}$ ), enquanto as setas bidirecionais representam a interdependência de duas variáveis explicativas, cuja magnitude é quantificada pelas correlações genotípicas e fenotípicas ( $r_{ij}$ ).

A análise de trilha e desdobramento das correlações fenotípicas e genotípicas em efeitos diretos e indiretos dos caracteres explicativos sobre a produção por planta, com base no diagrama causal apresentado na Figura 1, estão no Quadro 4.

Quadro 4 - Análise de trilha e desdobramento das correlações fenotípicas e genotípicas em efeitos diretos e indiretos dos caracteres explicativos MAT, VAPLA, P100 E SEPLA sobre o carácter principal , a produção por planta (PRPLA)

Caracteres	Efeitos	Estimador	Estimativas	
			utilizando correlações genotípicas	utilizando correlações fenotípicas
MAT	direto sobre PRPLA	$\hat{p}_{01}$	-0,0072	-0,0110
	indireto via VAPLA	$\hat{p}_{02}r_{12}$	-0,0023	-0,0022
	indireto via P100	$\hat{p}_{03}r_{13}$	-0,3483	-0,1953
	indireto via SEPLA	$\hat{p}_{04}r_{14}$	0,5085	0,4080
	total	$r_{01}$	0,1506	0,1995
VAPLA	direto sobre PRPLA	$\hat{p}_{02}$	-0,0066	-0,0064
	indireto via MAT	$\hat{p}_{01}r_{12}$	-0,0026	-0,0038
	indireto via P100	$\hat{p}_{03}r_{23}$	-0,3405	-0,1217
	indireto via SEPLA	$\hat{p}_{04}r_{24}$	0,9908	0,9367
	total	$r_{02}$	0,6411	0,8048
P100	direto sobre PRPLA	$\hat{p}_{03}$	0,8796	0,5713
	indireto via MAT	$\hat{p}_{01}r_{13}$	0,0029	0,0037
	indireto via VAPLA	$\hat{p}_{02}r_{23}$	0,0025	0,0014
	indireto via SEPLA	$\hat{p}_{04}r_{34}$	-0,6011	-0,3139
	total	$r_{03}$	0,284	0,2625
SEPLA	direto sobre PRPLA	$\hat{p}_{04}$	1,1225	1,0130
	indireto via MAT	$\hat{p}_{01}r_{14}$	-0,0033	-0,0044
	indireto via VAPLA	$\hat{p}_{02}r_{24}$	-0,0058	-0,0059
	indireto via P100	$\hat{p}_{03}r_{34}$	-0,4710	-0,1771
	total	$r_{04}$	0,6424	0,8256
Coeficiente de determinação ( $R^2$ )		$R^2 = \sum_{i=1}^4 p_{0i}r_{0i}$	0,9656	0,9790
Efeito da variável residual ( $\hat{p}_{0u}$ )		$\hat{p}_e = \sqrt{1 - R^2}$	0,1855	0,1450

MAT (número de dias até a maturação); VAPLA (número médio de vagens por planta); P100 (peso de 100 sementes); SEPLA (número médio de sementes por planta); SEVAG (número médio de sementes por vagem); e PRPLA (produção média por planta).

A análise de trilha baseada nas correlações genotípicas e a baseada nas correlações fenotípicas foram muito semelhantes no que se refere às estimativas dos efeitos diretos e indiretos de cada carácter explicativo, do coeficiente de determinação e do efeito da variável residual. Esta semelhança das estimativas baseadas nas correlações genotípicas e fenotípicas também foi verificada por SANTOS et al. (1986).

O maior efeito direto sobre a produção por planta foi apresentado pelo carácter SEPLA. Este carácter, além do alto efeito direto, apresenta alta correlação favorável com a produção por planta. Este 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 SEPLA. Outro resultado que mostra a importância do carácter SEPLA é que as características MAT e VAPLA apresentam altos efeitos indiretos sobre a produção por planta via SEPLA.

O carácter VAPLA apresenta alta correlação favorável com a produção por planta, mas com efeito direto em sentido desfavorável. Este fato indica a ausência de causa e efeito, ou seja, o carácter VAPLA não é o principal determinante das alterações na produção por planta, existindo outros caracteres que proporcionariam maior impacto em termos de ganho de seleção. O carácter MAT, além da baixa correlação com produção por planta, apresenta efeito direto em sentido desfavorável, indicando, como no carácter VAPLA, a ausência de causa e efeito.

O carácter P100, embora não apresente alta correlação com a produção por planta, apresenta alto efeito direto sobre este carácter. Pode-se observar que a baixa correlação de P100 com produção por planta é devida ao efeito indireto negativo via SEPLA, o que ocorre devido à correlação negativa entre P100 e SEPLA. Este 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. Esta independência genética permite considerar o carácter P100, juntamente com o carácter SEPLA, na seleção de plantas mais produtivas, o que pode aumentar o ganho de seleção.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo obter informações sobre uma população de 154 linhagens endogâmicas recombinantes (RIL's) de feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) por meio da estimação de diferentes parâmetros genéticos e correlações fenotípicas, genotípicas e ambientais entre diferentes características agrônômicas. Procurou-se também verificar os efeitos diretos e indiretos de cada característica sobre a produção, mediante o uso da análise de trilha. A população segregante foi obtida pelo método do SSD a partir do cruzamento inicial entre as variedades Ouro Negro e Rudá. Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados com 4 repetições. Verificou-se considerável variabilidade genética entre as linhagens endogâmicas recombinantes para todos os caracteres avaliados. Os caracteres VAPLA, SEVAG e P100, considerados determinantes primários para a produção, tiveram altas estimativas de herdabilidade, sendo que os dois primeiros foram os que apresentaram maiores correlações genotípicas e fenotípicas com a produção por planta. O carácter SEPLA apresentou o maior efeito direto sobre a produção por planta, sendo portanto de grande importância para fins de melhoramento visando o aumento da produção, pois torna eficiente a resposta correlacionada por meio da seleção indireta.

## **CAPÍTULO 6**

### **COMPARAÇÃO DOS DELINEAMENTOS EM BLOCOS CASUALIZADOS E COM TESTEMUNHAS INTERCALARES NA ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS GENÉTICOS EM RIL's DE FEIJOEIRO-COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.)**

#### **1. INTRODUÇÃO**

O trabalho de melhoramento exige contínua avaliação do material genético que está sendo gerado pelo programa. Diferentes delineamentos experimentais são utilizados para a avaliação de características quantitativas importantes na comparação entre famílias segregantes ou entre linhagens já obtidas (GOMES, 1985).

Os blocos casualizados constituem, talvez, o tipo mais importante de delineamento experimental e tem sido muito utilizado para avaliações genéticas. Neste delineamento cada família ou linhagem é representada no ensaio  $r$  vezes ( $r \geq 2$ ), de modo que estas repetições fornecem estimativas das variações ambientais, as quais são extrapoladas como componente da variação fenotípica entre as famílias ou linhagens, permitindo assim a estimativa de diferentes parâmetros genéticos úteis para o melhoramento (CRUZ e REGAZZI, 1997).

Um outro método para a estimação das variações ambientais é a utilização de testemunhas intercalares em ensaios de comparação de famílias ou

linhagens. Neste método, cada uma das famílias ou linhagens é representada no ensaio por uma única parcela, enquanto as testemunhas são repetidas  $r$  vezes. Este tipo de delineamento assume grande importância no melhoramento de plantas, uma vez que, em muitos casos, a quantidade de sementes disponíveis de cada família é muito pequena, impossibilitando as repetições. Este delineamento também tem grande importância nos casos em que o número de famílias ou linhagens a ser avaliado é muito elevado, havendo dificuldades experimentais ou pela indisponibilidade de área para experimentação com bom controle local ou pela necessidade de redução de custos e de mão-de-obra na avaliação do material genético.

No delineamento experimental com testemunhas intercalares, as análises são realizadas apenas com base nas informações individuais. Os dados das testemunhas são utilizados nas análises de variância mais apuradas. Desse modo, diferentemente do delineamento em blocos casualizados, as estimativas das variações ambientais são baseadas apenas nas testemunhas. Em consequência, a utilização do delineamento em blocos casualizados ou com testemunhas intercalares pode levar a diferentes estimativas dos parâmetros genéticos.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de comparar as estimativas de diferentes parâmetros genéticos obtidas a partir da avaliação de 154 linhagens recombinantes endogâmicas (RIL's) de feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em dois experimentos: um usando o delineamento em blocos casualizados com três repetições e o outro usando um ensaio comparativo, no qual as linhagens foram representadas por parcelas únicas avaliadas juntamente com testemunhas intercalares.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho os ensaios foram conduzidos no período de abril a julho de 1999, na estação experimental de Coimbra da Universidade Federal de Viçosa.

### 2.1. Material genético

Foram utilizados nos ensaios 154 RIL's de feijoeiro-comum juntamente com os genitores Rudá e Ouro Negro, os quais foram utilizados como testemunhas. Para a obtenção da população segregante, o cultivar Rudá foi cruzado com o Ouro Negro, em casa-de-vegetação. A confirmação dos cruzamentos foi feita com base na cor de flor como "gene marcador". Foram obtidas, aproximadamente, 40 sementes  $F_1$ , as quais foram semeadas em casa de vegetação. Uma amostra de 160 sementes  $F_2$  foi avançada até a geração  $F_7$  pelo método do descendente de uma única semente, comumente conhecido como SSD (*Single Seed Descent*), não tendo sido feito nenhum tipo de seleção durante o processo. Este método é realizado tomando-se uma única semente de cada indivíduo de uma geração para estabelecer a geração subsequente (BRIM, 1966). Conforme sugerido por BRIM (1966), foram semeadas três sementes de cada planta  $F_2$  para assegurar a representatividade da população base. Após a emergência, uma única planta foi preservada. Tal procedimento foi repetido nas gerações seguintes até a geração  $F_7$ , quando um elevado nível de homozigose é obtido. Cada planta  $F_7$  conseguida a partir de uma planta  $F_2$  foi considerada uma linhagem endogâmica recombinante

(RIL) e suas sementes foram multiplicadas em casa-de-vegetação para o ensaio no campo.

## **2.2. Delineamentos experimentais**

Foram conduzidos dois ensaios simultaneamente, sendo um no delineamento em blocos casualizados com três repetições e o outro, no qual as linhagens foram representadas por parcelas únicas, avaliadas juntamente com testemunhas intercalares. Neste caso, os genitores Rudá e Ouro Negro foram utilizados como testemunhas intercalares sendo repetidos 27 vezes ao longo do experimento. Cada parcela experimental foi formada por 10 sementes distribuídas em uma fileira de 1,0 metro de comprimento espaçadas de 0,5 m entre si. Foi utilizada uma bordadura, contornando todo o experimento. Os tratos culturais foram os normalmente recomendados para a cultura do feijoeiro, sendo utilizada a irrigação quando necessária.

## **2.3. Caracteres avaliados**

Número de dias até o florescimento (FLOR) - número de dias decorridos do plantio até que, pelo menos, 50% das plantas apresentassem uma flor aberta.

Número de dias até a maturação (MAT) - número de dias decorridos do plantio até quando 90% das vagens estivessem secas.

"Stand" final (STFI) - número total de plantas presentes na parcela, na data da colheita.

Número de vagens por parcela (VAPAR) - número total de vagens por parcela.

Peso de 100 sementes (P100) - peso de 100 sementes amostradas em cada parcela.

Produção de grãos (PRTOT) - peso total das sementes de cada parcela, expresso em gramas.

Número médio de vagens por planta (VAPLA) – razão entre VAPAR e STFI.

Número médio de sementes por planta (SEPLA) – resultado da fórmula:

$$SEPLA = \frac{PRTOT.100}{P100.STFI}$$

Número médio de sementes por vagem (SEVAG) – razão entre SEPLA e VAPLA.

Produção média por planta (PRPLA) – razão entre PRTOT e STFI.

Produção média por viagem (PRVAG) – razão entre PRTOT e VAPAR.

#### 2.4. Análises de variância

Delineamento em blocos completos casualizados - A análise de variância foi feita para cada uma das características. O modelo estatístico adotado foi o seguinte:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + B_j + \varepsilon_{ij} ,$$

em que

$Y_{ij}$  = valor da característica da i-ésima RIL no j-ésimo bloco;

$\mu$  = média geral;

$G_i$  = efeito da i-ésima RIL ( $i = 1, 2, \dots, g$ );

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

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

No Quadro 1, encontra-se o esquema da análise de variância desse modelo.

Quadro 1 - Esquema da análise de variância do modelo em blocos completos casualizados

FV	GL	QM	E(Q.M.)	F
Blocos	$r - 1$	QM <sub>b</sub>	$\sigma^2 + g\sigma_b^2$	-
Genótipos	$g - 1$	QM <sub>g</sub>	$\sigma^2 + r\sigma_g^2$	QM <sub>g</sub> /QM <sub>e</sub>
Erro	$(r - 1)(g - 1)$	QM <sub>e</sub>	$\sigma^2$	

Delineamento com testemunhas intercalares - A análise de variância também foi feita para cada uma das características. O modelo estatístico adotado foi o seguinte:

$$\text{Para as testemunhas } Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij} ,$$

em que:

$Y_{ij}$  = valor da característica da i-ésima testemunha na j-ésima repetição;

$\mu$  = média geral das testemunhas;

$T_i$  = efeito da i-ésima testemunha ( $i = 1,2$ );

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

Para as RIL's  $Y_i = \mu + G_i + \varepsilon_{ij}$ ,

em que:

$Y_i$  = valor da característica da i-ésima RIL;

$\mu$  = média geral das RIL's;

$G_i$  = efeito da i-ésima RIL ( $i = 1,2,\dots, g$ );

$\varepsilon_{ij}$  = erro aleatório que incide sobre as RIL's,  $\varepsilon_{ij} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$ .

No Quadro 2, encontra-se o esquema da análise de variância desses modelos.

Quadro 2 - Esquema da análise de variância do modelo com a utilização de testemunhas intercalares

FV	GL	QM	E(Q.M.)	F
Genótipos	$g - 1$	QMg	$\sigma^2 + \sigma_g^2$	QMg/QMe
Testemunhas	$t - 1$	QMt	$\sigma^2 + r\phi_t$	
Erro	$t(r - 1)$	QMe	$\sigma^2$	

## 2.5. Parâmetros genéticos analisados e seus estimadores

Média - No cálculo da média, foram considerados apenas os valores das características das 154 RIL's.

Valor da estatística F -

$$\text{Valor F} = \frac{\text{QMg}}{\text{QMe}}$$

Variabilidade genética ( $\hat{\sigma}_g^2$ ) -

$$\hat{\sigma}_g^2 = \frac{\text{QMg} - \text{QMe}}{r} \text{ (delineamento em blocos completos casualizados)}$$

$$\hat{\sigma}_g^2 = \text{QMg} - \text{QMe} \text{ (delineamento com testemunhas intercalares)}$$

Coeficiente de variação experimental (CVe) -

$$\text{CVe} (\%) = \frac{\sqrt{\text{QMe}}}{\bar{x}} \cdot 100$$

Herdabilidades ( $h^2$ ) -

$$h^2 (\%) = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\text{QMg}} \cdot 100 \text{ (delineamento em blocos completos casualizados)}$$

$$h^2 (\%) = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\text{QMg}} \cdot 100 \text{ (delineamento com testemunhas intercalares)}$$

Coeficiente de variação genético (CVg) -

$$\text{CVg} (\%) = \frac{\sqrt{\hat{\sigma}_g^2}}{\bar{x}} \cdot 100,$$

Relação CVg/CVe -

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

Coeficiente de coincidência (CC) - No cálculo do CC, foi considerado um índice de 20% das linhagens superiores (as 31 RIL's com maiores médias) e 20% das linhagens inferiores (as 31 RIL's com menores médias). O cálculo do CC (%) é feito pela seguinte fórmula:

$$\text{CC}(\%) \text{ (20\% superiores)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de RIL's coincidentes entre as 31 superiores}}{31} \cdot 100$$

$$\text{CC}(\%) \text{ (20\% inferiores)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de RIL's coincidentes entre as 31 inferiores}}{31} \cdot 100$$

A análise de variância e a estimação dos parâmetro genéticos foram feitas com o auxílio do Programa GENES (CRUZ, 1997).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros genéticos das oito características avaliados em 154 RIL's de feijoeiro-comum, utilizando o delineamento em blocos casualizados com três repetições (DBC) e o delineamento com testemunhas intercalares (DTI) são apresentados no Quadro 3.

As médias de cada característica em cada um dos delineamentos foram calculados com o objetivo de verificar se os ambientes onde foram instalados os dois experimentos eram equivalentes. Esta verificação é possível, uma vez que foi utilizada a mesma população de 154 RIL's de feijoeiro-comu nos dois experimentos. Verificaram-se pequenas diferenças entre as estimativas das médias de cada característica avaliada no DBC e no DTI, indicando a equivalência dos ambientes onde foram instalados os dois experimentos. A equivalência ambiental é importante para a comparação mais precisa entre os parâmetros genéticos estimados nos dois experimentos.

Com relação aos valores F, verifica-se que as estimativas a partir do DBC foram superiores às estimativas a partir do DTI. Isto significa que o DBC teve maior capacidade de detecção da variabilidade genética que o DTI. O teste dos valores F a 1% de probabilidade mostrou variabilidade significativa entre as RIL's em sete e cinco características utilizando o DBC e o DTI, respectivamente. Pôde-se verificar que as características que não apresentaram variância genética significativa entre as RIL's apresentaram menores herdabilidades. Como a detecção da variabilidade genética é um requisito básico para a eficiência da seleção no melhoramento (ALLARD, 1971), a utilização do DTI pode comprometer o processo seletivo das

Quadro 3 - Parâmetros genéticos de oito características estimados com base em dados provenientes do delineamento em blocos casualizados com três repetições e com testemunhas intercalares

Parâmetros genéticos	FLOR	MAT	VAPLA	P100	SEPLA	SEVAG	PRPLA	PRVAG
Média <sup>1</sup>	42,11	95,73	16,49	19,24	80,98	4,91	15,53	0,94
Média <sup>2</sup>	42,43	95,42	16,46	18,62	79,55	4,84	14,76	0,90
Valor F <sup>1</sup>	10,09**	5,60**	1,54**	9,38**	1,52**	4,51**	1,23	4,98**
Valor F <sup>2</sup>	6,80**	3,31**	1,26	1,99**	1,07	1,68**	0,86	1,69**
CVe(%) <sup>1</sup>	2,33	1,60	24,46	5,70	26,50	5,35	29,07	8,27
CVe(%) <sup>2</sup>	1,83	1,57	20,00	7,36	22,92	6,57	25,79	9,13
Herdabilidade % <sup>1</sup>	90,09	82,14	35,42	89,34	34,34	77,82	18,91	79,90
Herdabilidade % <sup>2</sup>	85,30	69,80	20,63	49,65	6,53	40,59	-	40,87
CVg(%) <sup>1</sup>	4,06	1,99	10,45	9,52	11,06	5,78	8,11	9,52
CVg(%) <sup>2</sup>	4,42	2,40	10,38	7,36	6,21	5,46	-	7,68
CVg/CVe <sup>1</sup>	1,74	1,24	0,43	1,67	0,42	1,08	0,29	1,15
CVg/CVe <sup>2</sup>	2,41	1,52	0,51	1,00	0,26	0,83	-	0,83
CC % (20% superiores)	67,74	58,06	35,48	77,42	32,26	54,84	32,26	51,61
CC % (20% inferiores)	51,61	70,97	35,48	58,06	35,48	48,39	41,94	51,61

<sup>1</sup> Estimado com base em dados provenientes do delineamento em blocos casualizados com três repetições.

<sup>2</sup> Estimado com base em dados provenientes do delineamento com testemunhas intercalares, sem a correção do efeito ambiental.

\*\* - Significativo a 1%

‘-’ Não foi possível estimar

características de baixa herdabilidade e, assim, tornar inviável um programa de melhoramento dessas características.

Para avaliação da precisão experimental de cada delineamento, foram comparadas as estimativas do coeficiente de variação ambiental (C<sub>Ve</sub>) de cada característica nos experimentos utilizando o DBC e o DTI. Verificou-se que esses experimentos foram equivalentes quanto à precisão, uma vez que foram observadas apenas pequenas diferenças entre os C<sub>Ve</sub> de cada característica avaliada nos dois experimentos. A classificação dos C<sub>Ve</sub> para cada característica, segundo critério de GOMES (1985), foi a mesma nos dois experimentos, sendo que cinco e três características tiveram C<sub>Ve</sub> baixo e alto, respectivamente. As características que apresentaram C<sub>Ve</sub> alto foram aquelas com menor herdabilidade, indicando que para essas características a baixa precisão experimental levou a uma baixa acurácia nas avaliações.

Para avaliação da acurácia experimental de cada delineamento, foram comparadas as estimativas de herdabilidade de cada característica nos experimentos utilizando o DBC e o DTI. Foram observadas diferenças expressivas nas estimativas de herdabilidade nos dois tipos de delineamentos experimentais. De modo geral, as estimativas de herdabilidade a partir de dados do DBC foram maiores que aquelas obtidas a partir dos dados do DTI. As diferenças entre as estimativas de herdabilidade obtidas no DBC e no DTI foram maiores para as características de baixa herdabilidade. Por exemplo, para a característica FLOR a diferença foi de 5,32%, enquanto para a característica SEPLA a diferença foi de 80,98%. No caso da característica PRPLA, não foi possível a obtenção de estimativas da herdabilidade a partir dos dados do DTI. Diante disso, pode-se dizer que o DBC tem maior acurácia que o DTI, sendo que a menor acurácia do DTI é mais problemática em características de baixa herdabilidade.

Adicionalmente à herdabilidade, o CV<sub>g</sub> e a razão CV<sub>g</sub>/C<sub>Ve</sub> também são parâmetros utilizados na quantificação da variabilidade genética disponível na população, quando se deseja determinar o seu potencial para fins de melhoramento (SANTOS, 1985). O CV<sub>g</sub> dá idéia sobre a proporcionalidade do ganho em relação à média e a relação CV<sub>g</sub>/C<sub>Ve</sub> > 1 indica situação favorável à seleção. As estimativas desses parâmetros a partir dos dados do DBC e do DTI são apresentadas no Quadro 3. No caso do CV<sub>g</sub>, não foram detectadas grandes diferenças. A maior diferença foi verificada na característica SEPLA, sendo de

56,15%. A relação CVg/CVe mostrou que existe situação favorável à seleção de cinco e três características utilizando o DBC e o DTI, respectivamente. Como seria esperado, situações favoráveis à seleção são observadas nas características de maior herdabilidade.

Uma última comparação entre DBC e DTI foi feita analisando o coeficiente de coincidência (CC%) entre as RIL's selecionadas, considerando uma porcentagem de seleção de 20% para o aumento e também para a diminuição do valor de cada característica. Com este parâmetro pretendeu-se avaliar a equivalência dos dois delineamentos na identificação de genótipos com desempenho superior e inferior. Esta identificação é de grande importância para o melhorista no processo de seleção dos genótipos, no qual é necessária a transferência de genes desejáveis para a próxima geração e a eliminação de genes desfavoráveis. Os CC% obtidos entre os dois delineamentos ficaram entre 32 e 78%. Verificou-se que maiores CC% foram obtidos com as características de maiores herdabilidades. Para as características VAPLA, SEPLA e PRPLA, as quais apresentaram baixa herdabilidade, os CC%, tanto para o aumento quanto para a diminuição do valor da característica ficaram entre 32 e 42%. O baixo CC% entre os dois delineamentos em relação a estas características é um indicativo de que o processo seletivo em, pelo menos, um dos dois delineamentos não seria eficiente.

Em última análise, pode-se concluir que as estimativas de herdabilidade foram as mais influenciadas pelo delineamento experimental utilizado, tendo sido observadas reduções nas estimativas obtidas no DBC em relação ao DTI, principalmente nas características de menores herdabilidades. Verificou-se também que as diferenças observadas nas estimativas dos outros parâmetros genéticos têm sempre alguma relação com as estimativas de herdabilidade. O uso de repetições, no caso do DBC, foi de grande importância para obtenção de maiores estimativas de herdabilidade, aumentando assim a acurácia experimental. No caso do DTI, seria possível aumentar as estimativas de herdabilidade por meio da melhoria do controle ambiental e também por meio de métodos matemáticos de correção do efeito do ambiente que levem a uma menor variância fenotípica.

Além das vantagens e desvantagens de cada delineamento experimental, as diferenças obtidas nas estimativas de herdabilidade devem ser consideradas na escolha de um ou outro delineamento, pois a herdabilidade de um caráter é um

dos mais importantes parâmetros genéticos. As estimativas de herdabilidades expressam a confiança do valor fenotípico como guia para o valor genotípico e fazem parte da maioria das expressões empregadas no melhoramento genético, principalmente na predição de ganhos genéticos decorrentes de seleção (FALCONER, 1987; CRUZ e REGAZZI, 1997). A obtenção de altas estimativas de herdabilidade de uma determinada característica também é muito importante quando se pensa no mapeamento genético e na identificação de regiões genômicas associadas à essas características (QTLs), uma vez que as inferências genotípicas são feitas com base no fenótipo (CHURCHILL e DOERGE, 1998).

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

O objetivo deste trabalho foi comparar as estimativas de diferentes parâmetros genéticos obtidas a partir da avaliação de 154 linhagens recombinantes endogâmicas (RIL's) de feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em dois experimentos: um usando o delineamento em blocos casualizados com três repetições (DBC) e o outro usando um ensaio comparativo, no qual as linhagens foram representadas por parcelas únicas avaliadas juntamente com testemunhas intercalares (DTI). As linhagens foram obtidas pelo método do SSD a partir do cruzamento inicial entre os cultivares Ouro Negro e Rudá, os quais foram utilizados como testemunhas. Cada parcela experimental foi formada por 10 sementes distribuídas em uma fileira de 1,0 metro de comprimento espaçadas de 0,5 m entre si. Em cada experimento, foram avaliadas oito características quantitativas e estimados sete parâmetros genéticos de cada característica. A média das características e a precisão experimental foi semelhante nos dois delineamentos, entretanto, o DBC teve uma maior capacidade de detecção de variabilidade genética e maior acurácia que o DTI. A utilização do DTI é uma alternativa importante para os ensaios realizados durante o programa de melhoramento, entretanto, é necessário um bom controle ambiental e também o desenvolvimento de métodos matemáticos de correção do efeito do ambiente que diminuam a variância fenotípica, aumentando a acurácia experimental e permitindo assim uma melhor comparação entre as famílias e as linhagens que estão sendo avaliadas.

## **CAPÍTULO 7**

### **SELEÇÃO DE LINHAGENS DE FEIJOEIRO-COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.) COM BASE NA PRODUÇÃO, TIPO DE GRÃO, HÁBITO DE CRESCIMENTO E RESISTÊNCIA A DOENÇAS**

#### **1. INTRODUÇÃO**

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) destaca-se no Brasil por sua importância econômica e, sobretudo, social. O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão. O seu valor como alimento substituto da proteína animal e o seu amplo consumo por parte da população brasileira justificam a pesquisa no sentido de se obter melhores níveis de produtividade. Altas produtividades são conseguidas com a utilização de variedades melhoradas aliada ao uso correto das práticas de manejo da cultura.

Para a obtenção de variedades melhoradas de feijão, além da produção de grãos, outros caracteres como o tipo de grão, o hábito de crescimento e a resistência a doenças devem ser considerados pelos melhoristas a fim de que estas variedades atendam os objetivos dos agricultores e consumidores (RAMALHO e ABREU, 1998). A preferência por determinado tipo de grão varia com a região. O feijão tipo carioca é o mais cultivado no Brasil, contudo os grãos de cor preta e bege também ocupam uma parcela do mercado. Com relação ao hábito de crescimento, as variedades de porte mais ereto têm sido

preferidas, uma vez que, facilitam os tratos culturais, reduzem as perdas na colheita, permitem a obtenção de grãos de melhor qualidade e menor incidência de alguns patógenos. Inúmeros patógenos ocorrem na cultura do feijoeiro, causando danos econômicos expressivos (VIEIRA, 1983). A característica de resistência a doenças em uma variedade é de grande importância na redução do uso de defensivos, o que representa economia para o produtor e menor prejuízo ao meio ambiente.

O Programa de Melhoramento do Feijoeiro da UFV/BIOAGRO/EPAMIG tem objetivado a obtenção de variedades de feijoeiro com grão tipo carioca resistentes às principais doenças dessa cultura. Para isso, diferentes genitores têm sido utilizados, entre os quais estão as variedades Rudá e Ouro Negro. A variedade Rudá é originária do CIAT, apresenta grão tipo carioca, hábito de crescimento IIb (semi-trepadora) e ótima produtividade, porém é suscetível a várias doenças, como a ferrugem (FALEIRO et al., 1996; FALEIRO et al., 1999a), a antracnose (LANZA et al., 1997) e a mancha-angular (NIETSCHE, 1997). A variedade Ouro Negro é originária de Honduras, apresenta grão de cor preta, hábito de crescimento IIIb (prostadas ou trepadoras) e, além da alta produtividade e ótimas qualidades culinárias (ARAÚJO et al., 1991), tem apresentado resistência à ferrugem (FALEIRO et al., 1996; FALEIRO et al., 1999a), antracnose (LANZA et al., 1997) e mancha-angular (NIETSCHE, 1997). Com base nestas características contrastantes e complementares, foi desenvolvida uma população de 154 linhagens endogâmicas recombinantes (RIL's) a partir do cruzamento inicial entre as variedades Rudá e Ouro Negro, objetivando o desenvolvimento de uma população permanente para o mapeamento genético intra-específico do feijoeiro-comum e a obtenção de linhagens promissoras a serem avaliadas no ensaio preliminar de linhagens (EPL) conduzidos pela EMBRAPA - Arroz e Feijão.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de selecionar na população de 154 RIL's, linhagens com produção igual ou superior à dos genitores Rudá e Ouro Negro, com tipo de grão carioca, preto ou bege, arquitetura de planta não prostrada e resistência a doenças importantes como ferrugem, antracnose e mancha-angular.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

A avaliação das características de produção, tipo de grão e hábito de crescimento foi feita com base em um ensaio de campo conduzido no período de abril a julho de 1999, na estação experimental de Coimbra da Universidade Federal de Viçosa. A avaliação das características de resistência a doenças foi feita em condições controladas de câmara de nevoeiro e casa-de-vegetação.

### 2.1. Material genético

Para a obtenção da população segregante composta por 154 RIL's de feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), o cultivar Rudá foi cruzado com o cultivar Ouro Negro, em casa-de-vegetação. A confirmação dos cruzamentos foi feita utilizando a cor de flor como "gene marcador". Foram obtidas aproximadamente 40 sementes  $F_1$ , as quais foram semeadas em casa de vegetação. Uma amostra de 160 sementes  $F_2$  foi avançada até a geração  $F_7$  utilizando-se o método do descendente de uma única semente, comumente conhecido como SSD (*Single Seed Descent*). Este método é realizado tomando-se uma única semente de cada indivíduo de uma geração para estabelecer a geração subsequente (BRIM, 1966). Conforme sugerido por BRIM (1966), foram semeadas três sementes de cada planta  $F_2$  para assegurar a germinação. Após a emergência, uma única planta foi preservada. Tal procedimento foi repetido nas gerações seguintes até a geração  $F_7$ , quando o nível de homozigose desejado foi obtido. Cada planta  $F_7$  obtida a partir de uma planta  $F_2$  foi considerada uma linhagem endogâmica recombinante

(RIL) e suas sementes foram multiplicadas em casa-de-vegetação para do ensaio no campo.

## **2.2. Ensaio de campo**

### *2.2.1. Delineamento experimental*

Foi utilizado no ensaio o delineamento de blocos completos casualizados, com quatro repetições, juntamente com testemunhas adicionais (variedades Rudá, Pérola, Ouro Negro e Meia Noite). Cada parcela experimental foi formada por 10 sementes distribuídas em uma fileira de 1,0 metro de comprimento espaçadas de 0,5 m entre si. Foi utilizada uma bordadura, contornando todo o experimento. Os tratamentos culturais foram os normalmente recomendados para a cultura do feijoeiro, sendo utilizada a irrigação quando necessária.

### *2.2.2. Caracteres avaliados*

"Stand" final (STFI) - Número total de plantas presentes na parcela, na data da colheita.

Produção de grãos (PRTOT) - Peso total das sementes de cada parcela, expresso em gramas.

Produção média por planta (PRPLA) - Foi calculada dividindo-se PRTOT por STFI.

Hábito de crescimento (HC)

Tipo de grão - Cor do grão (TG)

### *2.2.3. Análises de variância*

A análise de variância foi feita para a característica produção média por planta (PRPLA), 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 RIL's (154) e  $t$  o número de testemunhas (4);

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

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

A soma de quadrados de tratamentos foi decomposta em soma de quadrados de linhagens endogâmicas recombinantes (RIL's), soma de quadrados de testemunhas e soma de quadrados de grupos (linhagens vs testemunhas). Como o interesse do trabalho é a comparação da produção entre os tratamentos, adotou-se os efeitos de tratamentos como fixos. 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 para o 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	$\sigma^2$	

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

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

#### 2.2.4. Parâmetros genéticos e comparação entre as médias

Os parâmetros genéticos coeficiente de determinação a nível de média ( $h^2$ ) e coeficiente de variação ambiental (CVe) foram estimados pelas seguintes expressões:

$$h^2 (\%) = \frac{\phi_g}{QMg} \frac{100}{r}$$

$$CVe (\%) = \frac{\sqrt{QMe}}{\bar{x}} 100, \text{ em que } \bar{x} = \text{m\u00e9dia da PRPLA}$$

A an\u00e1lise de vari\u00e2ncia e a estimat\u00e7\u00e3o de par\u00e2metros gen\u00e9ticos foram feitas com o aux\u00edlio do Programa Genes (CRUZ, 1997). As diferen\u00e7as m\u00ednimas significativas entre as m\u00e9dias da PRPLA dos tratamentos foram avaliadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (GOMES, 1990).

### **2.3. Avalia\u00e7\u00e3o da resist\u00eancia a doen\u00e7as**

As ra\u00e7as fisiol\u00f3gicas utilizadas neste trabalho foram escolhidas por causarem rea\u00e7\u00f5es diferenciais nos genitores Rud\u00e1 e Ouro Negro e por serem identificadas e coletadas no Estado de Minas Gerais. Para cada ra\u00e7a fisiol\u00f3gica de cada pat\u00f3geno, uma semente de cada RIL e cada genitor (Rud\u00e1 e Ouro Negro) foi cultivada em casa-de-vegeta\u00e7\u00e3o. As sementes foram pr\u00e9-germinadas em papel germitex a 36 \u00b0C e, ap\u00f3s a emiss\u00e3o da rad\u00edcula, transferidas para bandejas pl\u00e1sticas contendo uma mistura de solo e esterco curtido, na propor\u00e7\u00e3o de 4:1, adubada no momento do preparo com 5 Kg do adubo 4-14-8 por m<sup>3</sup> de substrato. Em cada bandeja foram plantadas 31 RIL's. As plantas foram mantidas em casa-de-vegeta\u00e7\u00e3o, antes da inocula\u00e7\u00e3o.

#### *2.3.1. Resist\u00eancia \u00e0 ferrugem*

Foram utilizados para a avalia\u00e7\u00e3o da resist\u00eancia das 154 RIL's a *Uromyces appendiculatus* as seguintes ra\u00e7as fisiol\u00f3gicas identificadas por FALEIRO (1997) e re-classificadas por FALEIRO et al. (1999c): 32 (32132212), 45 (33121211), 46 (33122211), 47 (33131113), 49 (33132212), 52 (33222232) e 56 (33232232). As culturas monosp\u00f3ricas armazenadas a 5 \u00b0C e 50% de umidade relativa foram multiplicadas no hospedeiro suscet\u00edvel US Pinto 111 dias antes da inocula\u00e7\u00e3o, visando recuperar a viabilidade dos uredosporos. A inocula\u00e7\u00e3o foi feita quando as folhas prim\u00e1rias apresentavam aproximadamente 2/3 do seu desenvolvimento completo, 10 dias ap\u00f3s a semeadura. Os uredosporos, na concentra\u00e7\u00e3o de 2,0 x 10<sup>4</sup> esporos/mL, foram suspensos em \u00e1gua destilada contendo 0,05% de Tween 20 e aspergidos em ambas as superf\u00edcies foliares, com o aux\u00edlio de um atomizador De Vilbiss n\u00b0 15, acionado por um compressor el\u00e9trico. Ap\u00f3s inocula\u00e7\u00e3o e r\u00e1pida secagem ao ar, as plantas foram transferidas para c\u00e2mara de nevoeiro (20 \u00b1 1\u00b0C e >95% de umidade relativa), onde permaneceram por 48 horas, sob fotoper\u00edodo 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. Foi estimado o tamanho médio das pústulas (TMP), quando se completou o período latente (número de dias da inoculação até que 50% das pústulas estivessem esporuladas). O grau de infecção foi avaliado segundo a escala de 1 (imune) a 6 (altamente suscetível) proposta no “The Bean Rust Workshop” (STAVELY et al., 1983). Foram consideradas resistentes as plantas com predominância de pústulas menores que  $300 \mu\text{m}$  (nota  $\leq 3$ ).

### 2.3.2. Resistência à antracnose

Foram utilizadas as raças fisiológicas 73, 81 e 89 de *Colletotrichum lindemuthianum* para a avaliação da resistência das 154 RIL's a este patógeno. As culturas monospóricas originais das três raças utilizadas 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 raça fisiológica 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 sob temperatura de  $23^{\circ}\text{C}$  para produção dos conídios a serem utilizados na inoculação. A inoculação foi feita 10 dias após o plantio, utilizando uma suspensão contendo  $1,2 \times 10^6$  conídios/ mL, a qual foi aplicada em ambas 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 feita 10 dias após a inoculação, com base na escala de 1 (imune) a 9 (altamente suscetível) descrita por PASTOR-CORRALES (1992). As plantas que apresentam graus de reação  $\leq 3$ , foram consideradas resistentes.

### 2.3.3. Resistência à mancha-angular

Foram utilizados para a avaliação da resistência das 154 RIL's a *Phaeoisariopsis griseola*, as raças fisiológicas 31.23, 31.55, 63.31 e 63.19,

identificadas por NIETSCHE (1997). O inóculo de cada raça foi reproduzido em placas contendo meio de suco de vegetais V8 (Campbell Soup Company, EUA) a partir de uma suspensão de conídios e fragmentos de micélio obtidos da cultura original do patógeno. As placas foram incubadas por 12 dias, a 24 °C para produção dos conídios a serem utilizados na inoculação. A inoculação foi feita 15 dias após o plantio, utilizando uma suspensão contendo  $2,0 \times 10^4$  conídios/ mL, a qual foi aplicada em ambas superfícies das folhas primárias, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss n° 15, acionado por um compressor elétrico. Após a inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $>95\%$  de umidade relativa), onde permaneceram por 48 horas, 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 mancha-angular foi feita 15 dias após a inoculação, com base em uma escala de severidade de 1 (imune) a 9 (altamente suscetível) (VAN SCHOONHOVEN e PASTOR-CORRALES, 1987). As plantas que apresentam graus de reação  $\leq 3$  foram consideradas resistentes.

#### *2.3.4. Seleção das linhagens mais resistentes*

A seleção das linhagens com maior nível de resistência foi feita utilizando o princípio do índice base de seleção proposto por WILLIAMS (1962), o qual estabelece índices mediante a combinação linear dos valores fenotípicos médios dos caracteres ponderados diretamente pelos seus respectivos pesos econômicos. No nosso caso, os valores fenotípicos corresponderam aos graus de reação médio de cada RIL a cada raça fisiológica de cada patógeno e foi considerado que cada grau de reação teria um peso econômico igual a 1. O índice resultante dessa combinação linear foi dividido pelo número de raças fisiológicas utilizadas para avaliar a resistência da respectiva linhagem. Dessa maneira, um índice de suscetibilidade de cada linhagem foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$I_{s_i} = \frac{\sum_j^n g_{ij}}{n_i}$$

em que:

$I_{s_i}$  = Índice de suscetibilidade da  $i$ -ésima RIL ( $i = 1, 2, \dots, 154$ );

$g_{ij}$  = Grau de reação da  $i$ -ésima RIL à  $j$ -ésima raça fisiológica. Foram utilizadas na avaliação da resistência sete raças de ferrugem, três de antracnose e quatro de mancha-angular, totalizando 14 raças fisiológicas;

$n_i$  = Número de raças fisiológicas utilizadas para avaliar a resistência da  $i$ -ésima RIL.

Pela fórmula, pode-se observar que quanto maior o  $ls$  menor é a resistência da respectiva RIL.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise de variância da produção média por planta (PRPLA), quanto aos quadrados médios, média geral, coeficientes de variação e herdabilidade, estão no Quadro 2.

Quadro 2 - Análise de variância, média geral e estimativas do coeficiente de determinação genotípico em nível de média e dos coeficientes de variação ambiental e genético da produção média por planta (PRPLA) avaliada em 154 RIL's e quatro testemunhas de feijoeiro-comum. Coimbra, MG

FV	GL	QM	F
Blocos	3	45,251	
Tratamentos (Tr)	157	27,092	1,606**
Linhagens (G)	153	27,330	1,620**
Testemunhas (Te)	3	22,624	1,341 <sup>ns</sup>
G vs Te	1	4,016	0,238 <sup>ns</sup>
Erro	471	16,867	
Média geral (g/planta)	15,32		
CVe(%)	26,81		
h <sup>2</sup> (%)	38,28		

\*\* Significativo a 1% de probabilidade.

Pela estatística F, verifica-se que há diferenças significativas ( $P < 0,01$ ) entre os tratamentos quanto à produção média por planta (PRPLA). A análise da decomposição da soma de quadrados de tratamentos mostrou que existem diferenças significativas entre as RIL's e não existem entre as testemunhas. Esta variabilidade genética verificada entre as RIL's dá suporte à seleção. Também pela estatística F verifica-se que não existe diferença significativa entre a média de todas as RIL's e a média de todas as testemunhas, ou seja, existe uma semelhança entre o desempenho médio das RIL's e das testemunhas.

Com relação à precisão do experimento, o coeficiente de variação foi de 26,81%, sendo considerado alto segundo o critério de classificação de GOMES (1985). Entretanto, a magnitude deste CV está dentro dos limites aceitáveis na experimentação agrícola (CASTOLDI, 1991). Esta baixa precisão experimental contribuiu para a obtenção de um baixo coeficiente de determinação genotípico ou herdabilidade ( $h^2$ ), o qual foi de 38,28%.

O teste de médias, apresentado no Quadro 3, mostra a semelhança de comportamento entre as RIL's e as testemunhas quanto à produção média por planta. Esta semelhança é explicada pela utilização das testemunhas Ouro Negro e Rudá, ambos com produção média alta, na formação da população de RIL's. É importante que os dados de produção média por planta não sejam extrapolados para rendimento por hectare devido ao tamanho reduzido das parcelas avaliadas.

As distribuições de frequência das 154 RIL's relativas à produção média por planta (PRPLA), ao tipo de grão (TG), ao hábito de crescimento (HC) e ao índice de suscetibilidade (Is) são apresentadas na Figura 1. A PRPLA apresentou uma distribuição tipicamente normal, evidenciando a natureza quantitativa deste carácter. Com relação ao TG, verificou-se na população segregante quatro tipos, quanto à cor da semente: preta, creme com estrias pretas, creme com estrias marrons (tipo carioca) e bege. Houve segregação da cor da semente na mesma linhagem em 6,5% das RIL's. A distribuição de frequência do TG evidencia um controle genético complexo da cor da semente do feijão. Por outro lado, a distribuição de frequência do hábito de crescimento, em 1:1, evidencia um controle genético envolvendo provavelmente um fator genético único (Figura 1). Com relação ao Índice de suscetibilidade, a distribuição de frequência é típica de uma característica qualitativa, em que um grande número de RIL's é agrupado na mesma classe dos genitores, não sendo portanto uma distribuição normal.

Quadro 3 - Médias da produção média por planta (PRPLA) em gramas avaliada em 154 RIL's e quatro testemunhas de feijoeiro-comum.

Trat.	Médias	Trat.	Médias	Trat.	Médias	Trat.	Médias	Trat.	Médias
78	24,76a	<b>T2</b>	<b>17,45abc</b>	114	15,84abc	83	14,50abc	145	12,99abc
52	23,12ab	53	17,42abc	54	15,83abc	<b>T1</b>	<b>14,50abc</b>	12	12,94abc
82	21,72abc	115	17,40abc	150	15,77abc	101	14,47abc	70	12,69abc
86	20,36abc	42	17,31abc	41	15,74abc	140	14,43abc	77	12,68abc
125	19,54abc	147	17,23abc	93	15,73abc	4	14,39abc	116	12,58abc
87	19,41abc	56	17,21abc	67	15,65abc	128	14,33abc	17	12,56abc
75	19,40abc	15	17,12abc	98	15,59abc	124	14,28abc	20	12,54abc
5	19,30abc	132	17,04abc	113	15,59abc	37	14,27abc	137	12,52abc
129	19,29abc	131	17,01abc	138	15,44abc	149	13,92abc	59	12,49abc
110	19,16abc	79	16,91abc	105	15,38abc	100	13,83abc	39	12,47abc
62	19,00abc	60	16,87abc	23	15,31abc	134	13,79abc	24	12,36abc
104	18,99abc	11	16,86abc	31	15,28abc	130	13,78abc	97	12,22abc
81	18,96abc	117	16,81abc	58	15,20abc	148	13,78abc	84	12,20abc
16	18,91abc	154	16,76abc	88	15,20abc	112	13,68abc	50	12,17abc
57	18,91abc	21	16,75abc	152	15,18abc	9	13,64abc	80	12,15abc
38	18,83abc	92	16,75abc	35	15,17abc	29	13,59abc	85	11,94 bc
25	18,66abc	107	16,75abc	40	15,15abc	151	13,59abc	8	11,74 bc
45	18,34abc	48	16,64abc	89	15,06abc	143	13,58abc	26	11,52 bc
69	18,34abc	141	16,64abc	55	15,04abc	46	13,56abc	139	11,52 bc
36	18,32abc	74	16,53abc	90	15,03abc	119	13,55abc	126	11,47 bc
102	18,24abc	1	16,51abc	122	15,03abc	106	13,51abc	133	11,34 bc
<b>T4</b>	<b>18,15abc</b>	33	16,42abc	49	14,99abc	121	13,40abc	32	11,29 bc
10	18,12abc	64	16,36abc	7	14,97abc	34	13,38abc	51	11,27 bc
66	18,10abc	43	16,23abc	27	14,74abc	91	13,36abc	65	11,19 bc
120	18,08abc	127	16,21abc	22	14,68abc	103	13,33abc	99	11,16 bc
71	18,07abc	136	16,14abc	73	14,63abc	146	13,32abc	3	11,11 bc
144	18,05abc	118	16,09abc	28	14,57abc	6	13,31abc	61	11,04 bc
123	18,01abc	96	15,91abc	14	14,54abc	76	13,29abc	109	10,85 bc
44	17,96abc	142	15,89abc	30	14,54abc	153	13,25abc	111	10,04 c
68	17,92abc	135	15,87abc	47	14,53abc	94	13,19abc	63	9,63 c
95	17,68abc	18	15,84abc	108	14,52abc	19	13,16abc		
2	17,66abc	72	15,84abc	13	14,51abc	<b>T3</b>	<b>13,15abc</b>		

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

Trat. = Tratamentos: 1-154 = RIL's; T1 = Ouro Negro; T2 = Rudá; T3 = Meia Noite; T4 = Pérola. Obs.: As testemunhas estão salientadas em negrito

Uma aspecto interessante observado na Figura 1 é o agrupamento dos genitores em classes não-extremas quanto à produção média por planta e Índice de suscetibilidade. O efeito do ambiente pode ter causado tal agrupamento, contudo, uma explicação genética para tal fato é a presença de genes complementares nos dois genitores (FALCONER, 1987). Assim, a reunião dos genes favoráveis do genitor Ouro Negro e do genitor Rudá em uma mesma RIL faz com que esta tenha um desempenho melhor que o dos genitores.

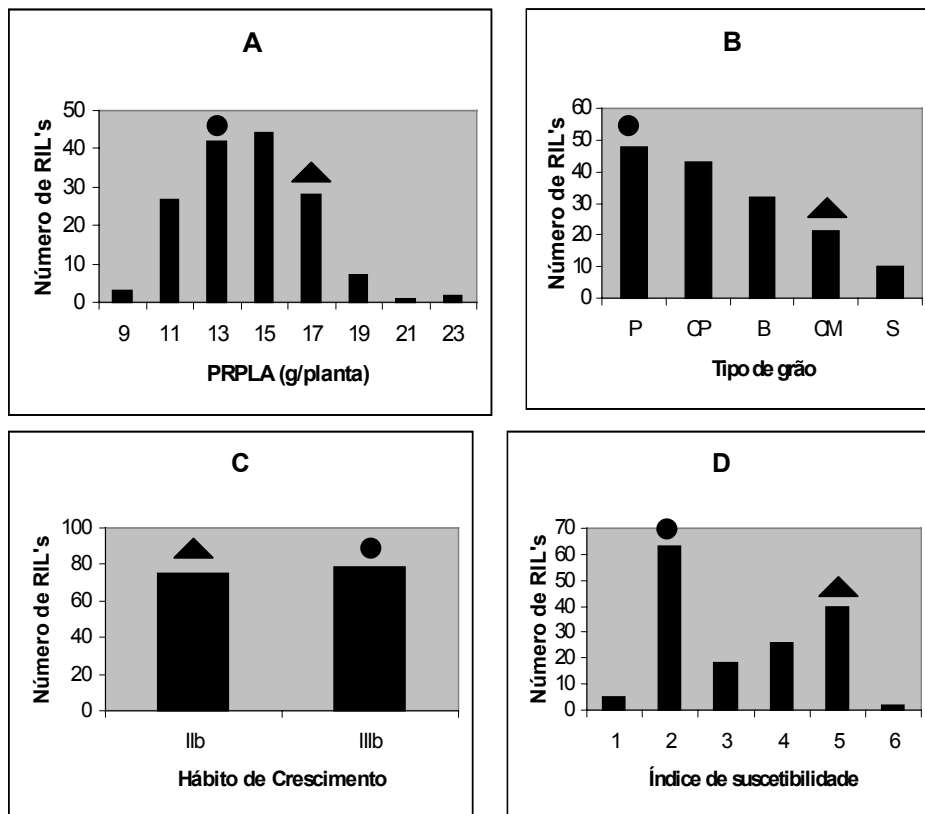


Figura 1 - Distribuições de freqüência das 154 RIL's de feijoeiro-comum relativas à produção média por planta (PRPLA) (A), ao tipo de grão (P = preta; CP = creme com estrias pretas; B = bege; CM = creme com estrias marrons; S = segregação de cores)(B), ao hábito de crescimento (C) e ao índice de suscetibilidade (D).

● Classe do genitor Ouro Negro; ▲ Classe do genitor Rudá.

A classificação das linhagens com base no Índice de suscetibilidade (Is), bem como a caracterização quanto ao tipo de grão e hábito de crescimento são apresentadas no Quadro 4. As RIL's com Is inferior ao do genitor Ouro Negro foram divididas em três grupos estabelecidos pelos tipos de grãos comerciais, ou seja, grão preto, carioca e bege. As RIL's com hábito de crescimento tipo IIIb, com grão de cor creme com estrias pretas ou com segregação de cores e as com produção média por planta inferior a do genitor Ouro Negro foram descartadas. Seguindo estes critérios, dez RIL's foram selecionadas e uma caracterização mais detalhada das mesmas quanto à resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular é apresentada no Quadro 5.

Quadro 4 - Índices de suscetibilidade do feijoeiro-comum à ferrugem, antracnose e mancha-angular, tipo de grão e hábito de crescimento avaliados em 154 RIL's e duas testemunhas

Trat.	Is <sup>TG, HC</sup>	Trat.	Is <sup>TG, HC</sup>	Trat.	Is <sup>TG, HC</sup>	Trat.	Is <sup>TG, HC</sup>	Trat.	Is <sup>TG, HC</sup>
119	1,786 <sup>B,2</sup>	136	2,357 <sup>CP,3</sup>	90	2,786 <sup>CP,2</sup>	70	4,321 <sup>P,3</sup>	107	5,357 <sup>P,3</sup>
33	1,846 <sup>CP,2</sup>	48	2,429 <sup>B,2</sup>	127	2,786 <sup>CP,2</sup>	25	4,357 <sup>P,3</sup>	144	5,357 <sup>CM,2</sup>
20	1,857 <sup>P,3</sup>	1	2,462 <sup>CM,2</sup>	14	2,885 <sup>CM,3</sup>	85	4,417 <sup>S,3</sup>	152	5,385 <sup>B,2</sup>
112	1,929 <sup>CM,2</sup>	126	2,462 <sup>P,2</sup>	66	2,929 <sup>CP,2</sup>	47	4,464 <sup>CM,3</sup>	49	5,393 <sup>S,2</sup>
121	1,929 <sup>CP,2</sup>	68	2,500 <sup>B,3</sup>	<b>T1</b>	<b>2,929<sup>P,3</sup></b>	30	4,500 <sup>CP,2</sup>	154	5,429 <sup>CM,3</sup>
36	2,000 <sup>B,3</sup>	122	2,500 <sup>CP,2</sup>	151	3,071 <sup>P,2</sup>	32	4,500 <sup>CP,3</sup>	28	5,500 <sup>B,3</sup>
81	2,000 <sup>S,3</sup>	23	2,571 <sup>CP,3</sup>	129	3,143 <sup>P,2</sup>	62	4,500 <sup>P,3</sup>	53	5,500 <sup>B,2</sup>
99	2,000 <sup>CM,2</sup>	58	2,571 <sup>CM,2</sup>	59	3,214 <sup>CM,2</sup>	71	4,571 <sup>CP,3</sup>	50	5,536 <sup>B,2</sup>
3	2,071 <sup>CM,2</sup>	76	2,571 <sup>CP,2</sup>	138	3,214 <sup>P,2</sup>	87	4,571 <sup>CP,3</sup>	5	5,571 <sup>CP,3</sup>
26	2,071 <sup>CP,3</sup>	77	2,571 <sup>CP,3</sup>	140	3,231 <sup>CP,2</sup>	97	4,607 <sup>S,3</sup>	7	5,571 <sup>P,3</sup>
38	2,071 <sup>P,2</sup>	78	2,571 <sup>P,2</sup>	19	3,357 <sup>P,2</sup>	133	4,769 <sup>P,3</sup>	11	5,571 <sup>CP,3</sup>
4	2,143 <sup>CP,3</sup>	86	2,571 <sup>P,3</sup>	18	3,393 <sup>B,2</sup>	29	4,786 <sup>P,2</sup>	72	5,571 <sup>S,3</sup>
63	2,143 <sup>CP,3</sup>	96	2,571 <sup>P,3</sup>	109	3,464 <sup>P,3</sup>	89	4,786 <sup>CP,3</sup>	142	5,571 <sup>S,2</sup>
80	2,143 <sup>P,2</sup>	131	2,571 <sup>B,2</sup>	43	3,500 <sup>P,2</sup>	146	4,786 <sup>P,2</sup>	116	5,607 <sup>P,2</sup>
98	2,143 <sup>CP,2</sup>	132	2,571 <sup>CP,3</sup>	139	3,500 <sup>P,2</sup>	34	4,923 <sup>CP,2</sup>	93	5,643 <sup>CM,3</sup>
101	2,143 <sup>B,2</sup>	134	2,571 <sup>P,3</sup>	64	3,536 <sup>P,2</sup>	143	4,923 <sup>CM,3</sup>	123	5,643 <sup>B,3</sup>
110	2,143 <sup>B,2</sup>	44	2,615 <sup>B,3</sup>	145	3,643 <sup>CP,3</sup>	10	4,929 <sup>CP,2</sup>	42	5,692 <sup>P,3</sup>
113	2,143 <sup>B,2</sup>	130	2,615 <sup>CP,2</sup>	108	3,786 <sup>CM,3</sup>	39	5,000 <sup>P,3</sup>	83	5,708 <sup>CP,2</sup>
95	2,167 <sup>P,3</sup>	103	2,636 <sup>CP,2</sup>	117	3,786 <sup>P,2</sup>	52	5,000 <sup>P,3</sup>	41	5,769 <sup>CP,2</sup>
125	2,167 <sup>B,3</sup>	88	2,643 <sup>S,2</sup>	74	3,808 <sup>P,3</sup>	61	5,000 <sup>CP,3</sup>	153	5,769 <sup>B,2</sup>
22	2,214 <sup>CP,3</sup>	6	2,714 <sup>S,S</sup>	120	3,846 <sup>CM,2</sup>	45	5,071 <sup>B,3</sup>	17	5,786 <sup>P,2</sup>
51	2,214 <sup>P,3</sup>	12	2,714 <sup>B,2</sup>	27	3,857 <sup>P,3</sup>	69	5,071 <sup>P,2</sup>	135	5,786 <sup>B,2</sup>
104	2,214 <sup>CM,2</sup>	15	2,714 <sup>CM,2</sup>	75	3,923 <sup>CP,2</sup>	84	5,077 <sup>P,3</sup>	114	5,857 <sup>P,3</sup>
111	2,214 <sup>CP,2</sup>	55	2,714 <sup>P,2</sup>	147	4,000 <sup>CP,3</sup>	<b>T2</b>	<b>5,107<sup>CM,2</sup></b>	148	5,857 <sup>P,2</sup>
8	2,231 <sup>CM,2</sup>	56	2,714 <sup>S,2</sup>	149	4,000 <sup>B,2</sup>	2	5,143 <sup>B,3</sup>	150	5,857 <sup>P,3</sup>
91	2,250 <sup>B,2</sup>	65	2,714 <sup>B,2</sup>	35	4,071 <sup>P,3</sup>	13	5,143 <sup>CP,3</sup>	92	5,964 <sup>P,3</sup>
73	2,286 <sup>B,3</sup>	94	2,714 <sup>B,3</sup>	37	4,071 <sup>CP,3</sup>	16	5,143 <sup>CM,3</sup>	21	6,385 <sup>CP,3</sup>
79	2,286 <sup>S,2</sup>	106	2,714 <sup>B,3</sup>	60	4,107 <sup>CP,3</sup>	102	5,250 <sup>B,3</sup>	82	6,385 <sup>CP,3</sup>
118	2,286 <sup>CP,2</sup>	115	2,714 <sup>P,3</sup>	31	4,214 <sup>CM,3</sup>	9	5,308 <sup>CM,2</sup>		
124	2,286 <sup>P,3</sup>	137	2,714 <sup>B,3</sup>	67	4,214 <sup>B,3</sup>	105	5,308 <sup>P,3</sup>		
128	2,286 <sup>P,2</sup>	46	2,769 <sup>CP,3</sup>	40	4,231 <sup>B,2</sup>	141	5,321 <sup>P,2</sup>		
54	2,357 <sup>CP,3</sup>	57	2,786 <sup>P,2</sup>	24	4,286 <sup>CP,2</sup>	100	5,357 <sup>CM,2</sup>		

Trat. = Tratamentos: 1-154 = RIL's; T1 = Ouro Negro; T2 = Rudá

TG = Tipo de grão - Cor do grão (P = preto; CP = creme com listras pretas; B = bege; CM = creme com listras marrons - carioca; S = segregação de cores)

HC = Hábito de crescimento (2 = IIb; 3 = IIIb)

Quadro 5 - Resistência das dez RIL's selecionadas e dos genitores Ouro Negro (T1) e Rudá (T2) a diferentes raças de *Uromyces appendiculatus*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Phaeoisariopsis griseola*

Trat.	Tipo de grão	PRPLA	Raças fisiológicas													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	Carioca	16,51	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	*	R
58	Carioca	15,20	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
78	Preto	24,76	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R
57	Preto	18,91	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
38	Preto	18,83	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
55	Preto	15,04	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R
110	Bege	19,16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
131	Bege	17,01	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
48	Bege	16,64	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
113	Bege	15,59	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>T1</b>	<b>Preto</b>	<b>14,50</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>S</b>
<b>T2</b>	<b>Carioca</b>	<b>17,45</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>R</b>

1 a 7 = Raças fisiológicas de *U. appendiculatus* 56, 52, 49, 45, 46, 47, 32, respectivamente;  
 8 a 10 = Raças fisiológicas de *C. lindemuthianum* 73, 81, 89, respectivamente;  
 11 a 14 = Raças fisiológicas de *P. griseola* 31.23, 31.55, 63.31, 63.19, respectivamente;  
 R = resistente; S = suscetível e \* = não avaliada.  
 Todas RIL's selecionadas apresentam hábito de crescimento tipo IIb.

As RIL's 38 e 113 apresentaram reação de resistência a todas as 14 raças fisiológicas utilizadas neste estudo, as quais causam reações contrastantes nos dois genitores Ouro Negro e Rudá. As RIL's 38 e 113 reuniram genes de resistência presentes nos dois genitores, o que conferiu a essas linhagens uma resistência a todas as raças fisiológicas. Apesar disso, elas apresentam Is de 2,071 e 2,143, respectivamente. O fato de os Is serem superiores à unidade indica que estas RIL's não apresentam resistência completa, ou imunidade, para todas as raças fisiológicas avaliadas. Pode-se também dizer que a RIL 38 é mais resistente que a RIL 113 devido ao seu menor Is. Esta maior resistência da RIL 38, possivelmente, é devido à presença de genes de efeito secundário, os quais complementam a resistência conferida pelos genes de efeito principal (HAMMOND-KOSACK e JONES, 1996).

As RIL's selecionadas trazem vantagens como a introdução de importantes genes de resistência em feijão com grão tipo carioca e bege e também o desenvolvimento de linhagens de feijão com grão preto produtivas, resistentes a doenças e com hábito de crescimento não-prostrado (IIb). As dez RIL's selecionadas foram enviadas para a EMBRAPA - Arroz e Feijão, onde serão complementados os dados de produtividade e resistência a doenças no Ensaio Preliminar de Linhagens-EPL.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Foram obtidas 154 linhagens endogâmicas recombinantes (RIL's) a partir do cruzamento entre as variedades Rudá e Ouro Negro, objetivando o desenvolvimento de uma população permanente para o mapeamento genético intra-específico do feijoeiro-comum e a obtenção de linhagens promissoras a serem avaliadas no ensaio preliminar de linhagens (EPL) conduzido pela EMBRAPA - Arroz e Feijão. Foram avaliados a produção média por planta (PRPLA), a cor da semente e o hábito de crescimento das 154 RIL's com base em um ensaio de campo em blocos casualizados com testemunhas adicionais. Foi também avaliada a resistência das RIL's a sete raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus*, três raças de *Colletotrichum lindemuthianum* e quatro raças de *Phaeoisariopsis griseola* em condições controladas. Foram selecionadas dez RIL's, sendo duas com grãos tipo carioca, quatro com grãos pretos e quatro com grãos bege. As RIL's selecionadas apresentaram hábito de crescimento não-prostrado (IIb) e foram resistentes a todas raças fisiológicas de ferrugem e antracnose utilizadas no estudo. As RIL's 38 e 113 foram resistentes a todas as raças, inclusive as de mancha-angular. As RIL's selecionadas podem dar origem a variedades de feijão com grãos tipo carioca e bege, contendo importantes genes de resistência e também a variedades produtivas, com grão preto, resistentes a doenças e com hábito de crescimento não-prostrado (IIb).

## CAPÍTULO 8

### CARACTERIZAÇÃO DE 154 RIL's E MAPEAMENTO DE LOCOS DE CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS ASSOCIADAS AO CICLO E AO RENDIMENTO DO FEIJOEIRO-COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.)

#### 1. INTRODUÇÃO

O feijoeiro-comum, *Phaseolus vulgaris* L., é uma leguminosa diplóide ( $2n = 2x = 22$ ) com um genoma relativamente pequeno, contendo 0,66 picogramas de DNA por genoma haplóide, o que equivale a  $6,33 \times 10^8$  pares de nucleotídeos (ARUMUGANATHAN e EARLE, 1991).

Os trabalhos de mapeamento genético do feijoeiro-comum tiveram início na década de 60, quando LAMPRECHT (1961) construiu um mapa de ligação. A partir desta época, numerosos trabalhos de ligação entre genes marcadores têm aparecido. BASSETT (1991) publicou um mapa de ligação revisado do feijoeiro-comum, o qual consistia de 13 grupos de ligação que incluem genes que controlam, em sua maioria, características morfológicas e de pigmentação, tais como cor de flor e semente. Nesta última década, alguns marcadores isoenzimáticos têm sido usados para o mapeamento (VALLEJOS e CHASE, 1991a, 1991b). O avanço das técnicas de biologia molecular e o desenvolvimento dos marcadores moleculares do DNA têm permitido a construção de mapas genéticos mais abrangentes para o feijoeiro-comum (VALLEJOS et al., 1992;

NODARI et al., 1993; MIKLAS et al., 1998).

O desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares na análise genética de espécies e, potencialmente, no melhoramento de plantas. No contexto do melhoramento de plantas, mapas genéticos possibilitam a cobertura e análise completa de genomas, a decomposição de características genéticas complexas nos seus componentes mendelianos, a localização de regiões genômicas que controlam caracteres de importância, a quantificação do efeito destas regiões na característica estudada e a canalização de toda essa informação para uso em programas de melhoramento. A construção de um mapa genético estimula a aquisição de informações importantes para o melhoramento genético de uma espécie. Tais informações variam desde a associação de marcadores com caracteres qualitativos e localização dos mesmos nos grupos de ligação, até a identificação de regiões genômicas associadas a caracteres quantitativos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

Diferentes características têm sido utilizadas para a construção de mapas genéticos. Até meados da década de 60, tais estudos utilizavam marcadores morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual, como cor de pétalas, de semente, de hipocótilo e morfologia floral e foliar. Esses marcadores contribuíram significativamente para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e para a construção das primeiras versões de mapas genéticos. Entretanto, devido ao seu número limitado, a probabilidade de se encontrar associações significativas entre esses marcadores e caracteres de importância econômica era reduzida. A revolução neste quadro iniciou-se com o desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos, os quais dobraram o número de marcadores genéticos disponíveis. Com o advento das técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

Objetivou-se neste trabalho caracterizar 154 linhagens endogâmicas recombinantes (RIL's) por meio da avaliação de características quantitativas, morfológicas, moleculares e de resistência a doenças e mapear locos de características quantitativas relacionadas ao ciclo e ao rendimento do feijoeiro-comum, visando lançar bases para o desenvolvimento de mapas específicos saturados e de utilidade nos programas de melhoramento dessa cultura.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material genético

A população segregante composta por 154 RIL's de feijoeiro-comum foi originada do cruzamento entre o cultivar Ouro Negro e o cultivar Rudá, em casa-de-vegetação. O Ouro Negro tem apresentado resistência a diferentes raças de *Uromyces appendiculatus*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Phaeoisariopsis griseola* em condições de casa de vegetação (FALEIRO et al., 1996, 1999a; LANZA et al., 1997) e em condições de campo (VIEIRA et al., 1992). O cultivar Rudá apresenta grão do tipo carioca e ótimas qualidades agronômicas, contudo é suscetível a várias raças fisiológicas de *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* e *P. griseola*. A confirmação dos cruzamentos foi feita utilizando a cor de flor como “gene marcador”. Foram obtidas, aproximadamente 40 sementes F<sub>1</sub>, as quais foram semeadas em casa de vegetação. Uma amostra de 160 sementes F<sub>2</sub> foi avançada até a geração F<sub>7</sub>, utilizando o método do descendente de uma única semente, comumente conhecido como SSD (*Single Seed Descent*). Esse método é realizado tomando-se uma única semente de cada indivíduo de uma geração para estabelecer a geração subsequente (BRIM, 1966). Conforme sugerido por BRIM (1966), foram semeadas três sementes de cada planta F<sub>2</sub> para garantir a representatividade da população base. Após a emergência, uma única planta foi preservada. Tal procedimento foi repetido nas gerações seguintes até a geração F<sub>7</sub>, quando o nível de homozigose desejado foi obtido. Cada planta F<sub>7</sub> obtida a partir de uma planta F<sub>2</sub> foi considerada uma linhagem endogâmica recombinante (RIL) e suas sementes foram multiplicadas em casa-de-vegetação para avaliar a

segregação da resistência às doenças e para avaliar as características quantitativas e morfológicas no ensaio de campo. Amostra de DNA de cada RIL foi extraída para a obtenção dos marcadores moleculares.

## **2.2. Avaliação da resistência às doenças**

As raças fisiológicas utilizadas neste trabalho foram escolhidas por causarem reações diferenciais nos genitores Rudá e Ouro Negro e por serem identificadas e coletadas no Estado de Minas Gerais. Para cada raça fisiológica, uma semente de cada RIL e genitor (Rudá e Ouro Negro) foram cultivadas em casa-de-vegetação. As sementes foram pré-germinadas em papel germitex a 36 °C e, após a emissão da radícula, transferidas para bandejas plásticas contendo uma 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. Em cada bandeja foram plantadas 31 RIL's. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação, antes da inoculação.

### *2.2.1. Resistência à ferrugem*

Foram utilizados para a avaliação da resistência das 154 RIL's a *Uromyces appendiculatus* as seguintes raças fisiológicas identificadas por FALEIRO et al. (1999b) e re-classificadas por FALEIRO et al. (1999c): 32 (32132212), 45 (33121211), 46 (33122211), 47 (33131113), 49 (33132212), 52 (33222232) e 56 (33232232). As culturas monospóricas armazenadas a 5 °C e 50% de umidade relativa foram multiplicadas no hospedeiro suscetível US Pinto 111 dias antes da inoculação, visando recuperar a viabilidade dos uredosporos. A inoculação foi realizada quando as folhas primárias apresentavam aproximadamente 2/3 do seu desenvolvimento completo, 10 dias após a semeadura. Os uredosporos, na concentração de  $2,0 \times 10^4$  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 inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $>95\%$  de umidade relativa), onde permaneceram por 48 horas, 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. Foi estimado o tamanho médio das pústulas (TMP), quando se

completou o período latente (número de dias da inoculação até que 50% das pústulas estivessem esporuladas). O grau de infecção foi avaliado segundo a escala de 1 (imune) a 6 (altamente suscetível) proposta no “The Bean Rust Workshop” (STAVELY et al., 1983). Foram consideradas resistentes as plantas com predominância de pústulas menores que 300 µm (nota ≤ 3).

### 2.2.2. Resistência à antracnose

Foram utilizadas as raças fisiológicas 73, 81 e 89 de *Colletotrichum lindemuthianum* para a avaliação da resistência das 154 RIL's a este patógeno. As culturas monospóricas originais das três raças utilizadas 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 raça fisiológica 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 sob a temperatura de 23 °C para produção dos conídios a serem utilizados na inoculação. A inoculação foi feita 10 dias após o plantio, utilizando 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 feita 10 dias após a inoculação, com base na escala de 1 (imune) a 9 (altamente suscetível) descrita por PASTOR-CORRALES (1992). As plantas que apresentam graus de reação ≤ 3, foram consideradas resistentes.

### 2.2.3. Resistência à mancha-angular

Foram utilizados para a avaliação da resistência das 154 RIL's a *Phaeoisariopsis griseola* as raças fisiológicas 31.23, 31.55, 63.31 e 63.19, identificadas por NIETSCHE (1997). O inóculo de cada raça foi reproduzido em placas contendo meio de suco de vegetais V8 (Campbell Soup Company, EUA) a partir de uma suspensão de conídios e fragmentos de micélio obtidos da cultura

original do patógeno. As placas foram incubadas por 12 dias, a 24 °C, para produção dos conídios a serem utilizados na inoculação. Esta foi realizada 15 dias após o plantio, utilizando uma suspensão contendo  $2,0 \times 10^4$  conídios/ mL, a qual foi aplicada em ambas as superfícies das folhas primárias, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss n° 15, acionado por um compressor elétrico. Após a inoculação e rápida secagem ao ar, as plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $>95\%$  de umidade relativa), onde permaneceram por 48 horas, 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 mancha-angular foi feita 15 dias após a inoculação, com base em uma escala de severidade de 1 (imune) a 9 (altamente suscetível) (VAN SCHOONHOVEN e PASTOR-CORRALES, 1987). As plantas que apresentam graus de reação  $\leq 3$  foram consideradas resistentes.

Testes de  $\chi^2$  foram usados para determinar a herança da resistência a cada uma das raças fisiológicas de *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* e *P. griseola*.

### **2.3. Análise das características morfológicas**

Foram avaliadas as seguintes características morfológicas: cor da flor, cor do hipocótilo, cor do cotilédone, cor da listra da semente, cor do tegumento, tipo de grão e hábito de crescimento. Para a tabulação e análise das características morfológicas, elas foram transformadas em dados numéricos conforme descrito no Quadro 1A. Testes de  $\chi^2$  foram usados para testar a herança das características.

### **2.4. Análise dos marcadores moleculares**

Amostras de DNA de folhas de cada uma das 154 RIL's e dos progenitores Ouro Negro e Rudá foram extraídas de acordo com a metodologia de DOYLE e DOYLE (1990). As amostras de DNA dos progenitores foram amplificadas por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) com 100 diferentes *primers*, incluindo decâmeros e SCAR's. Os *primers* que revelaram polimorfismos entre os progenitores foram usados para amplificar amostras de DNA das 154 RIL's. A partir dos produtos de amplificação do DNA, foi construída uma matriz de valores binários, construída de acordo com a presença (1) ou ausência (0) de bandas nos

progenitores e RIL's. Testes de  $\chi^2$  foram usados para confirmar a herança monogênica dos marcadores moleculares.

## 2.5. Análise das características quantitativas

A avaliação das características quantitativas foi feita com base em um ensaio de campo conduzido no período de abril a julho de 1999, na estação Experimental de Coimbra da Universidade Federal de Viçosa.

Foi utilizado o delineamento de blocos completos casualizados, com quatro repetições. Cada parcela experimental foi constituída por 10 sementes, distribuídas em uma fileira de 1,0 metro de comprimento espaçadas de 0,5 m entre si. Foi utilizada uma bordadura, contornando todo o experimento. Os tratos culturais foram os normalmente recomendados para a cultura do feijoeiro, sendo utilizada a irrigação quando necessária.

Foram avaliadas os seguintes caracteres:

Número de dias até o florescimento (FLOR) - A partir do plantio, foi contado o número de dias até que, pelo menos, 50% das plantas apresentassem uma flor.

Número de dias até a maturação (MAT) - A partir do plantio, foi contado o número de dias até quando 90% das vagens estivessem secas.

"Stand" final (STFI) - Número total de plantas presentes na parcela, na data da colheita.

Número de vagens por parcela (VAPAR) - Número total de vagens por parcela.

Peso de 100 sementes (P100) - Peso de 100 sementes amostradas em cada parcela.

Produção de grãos (PRTOT) - Peso total das sementes de cada parcela, expresso em gramas.

Número médio de vagens por planta (VAPLA) - Foi calculado dividindo-se VAPAR por STFI.

Número médio de sementes por planta (SEPLA) - Foi calculado pela fórmula:

$$SEPLA = \frac{PRTOT * 100}{P100 * STFI}$$

Número médio de sementes por vagem (SEVAG) - Foi calculado dividindo-se SEPLA por VAPLA.

Produção média por planta (PRPLA) - Foi calculada dividindo-se PRTOT por STFI.

Produção média por vagem (PRVAG) - Foi calculada dividindo-se PRTOT por VAPAR.

A análise de variância foi feita para cada uma das seguintes características quantitativas: FLOR, MAT, VAPLA, P100, SEPLA, SEVAG, PRPLA, PRVAG. O modelo estatístico adotado foi o seguinte:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + B_j + \varepsilon_{ij} ,$$

em que

$Y_{ij}$  = Valor da característica da i-ésima RIL no j-ésimo bloco;

$\mu$  = média geral;

$G_i$  = efeito da i-ésima RIL ( $i = 1, 2, \dots, g$ );

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

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

A partir das análises de variância de cada característica, foram obtidas as estimativas da variância genotípica entre linhagens ( $\hat{\sigma}_g^2$ ), da variância fenotípica em nível de média ( $\hat{\sigma}_f^2$ ) e da variância ambiental ( $\hat{\sigma}^2$ ).

Foram estimados coeficientes de correlações genotípicas e fenotípicas entre as oito características quantitativas. Para isso, foram obtidos os produtos médios entre os vários caracteres analisados utilizando o método relatado por KEMPTHORNE (1966). A partir destas análises, foram obtidas as estimativas da covariância genotípica e fenotípica entre as características duas a duas e finalmente os coeficientes de correlação, como segue:

Coeficiente de correlação genotípica ( $r_g$ ) -

$$r_g = \frac{\text{C}\hat{\text{v}}_g(X, Y)}{\sqrt{\hat{\sigma}_g^2(X) \cdot \hat{\sigma}_g^2(Y)}}$$

Coeficiente de correlação fenotípica ( $r_f$ ) -

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

em que:

$C\hat{ov}_g(X, Y)$  e  $C\hat{ov}_f(X, Y)$  = Estimadores da covariância genotípica e fenotípica, respectivamente, entre duas características X e Y;

$\hat{\sigma}_g^2(X)$  e  $\hat{\sigma}_f^2(X)$  = Estimadores da variância genotípica e fenotípica, respectivamente, da característica X;

$\hat{\sigma}_g^2(Y)$  e  $\hat{\sigma}_f^2(Y)$  = Estimadores da variância genotípica e fenotípica, respectivamente, da característica Y.

Também foi estimada, para cada característica, a herdabilidade ao nível de

$$\text{média (h}^2\text{), sendo: } h^2 (\%) = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\frac{QMg}{r}} 100$$

## 2.6. Construção do mapa genético de ligação

O mapa genético foi construído com base em características morfológicas, moleculares e de resistência a doenças que segregaram de acordo com a proporção esperada de herança monogênica em RIL's, ou seja 1:1. O cálculo da frequência de recombinação e das distâncias genéticas entre os diferentes marcadores genéticos, bem como a determinação do posicionamento dos marcadores foram feitas com o auxílio do programa MAPMAKER (Lander et al., 1987; LINCOLN et al., 1992). O agrupamento dos marcadores foi feito adotando um valor de LOD de 4,0 e uma frequência máxima de recombinação de 40 ( $r=0,40$ ). A conversão da frequência de recombinação para centiMorgans (cM) foi feita utilizando a distância de mapeamento de Kosambi (KOSAMBI, 1944).

## 2.7. Identificação e mapeamento de QTL's

A identificação de marcadores moleculares associados às características quantitativas foi feita por meio de análise de variância entre médias de cada característica quantitativa e os diferentes marcadores moleculares. A proporção da variância fenotípica explicada pela segregação do marcador ligado a um loco que controla uma característica quantitativa (QTL) foi determinada por análise de regressão simples e múltipla (DRAPER e SMITH, 1966). As análises de regressão foram realizadas com auxílio do programa *Jump* 3.1.6.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC), determinando-se a proporção da variância fenotípica de cada característica

quantitativa explicada por cada marcador e pelo conjunto de marcadores que foram significativos na regressão múltipla a  $P < 0,05$ .

A localização dos QTL's nos grupos de ligação foi determinada com base nas informações do mapa de ligação por meio do mapeamento por intervalo composto (ZENG, 1993 e 1994, JANSEN, 1993), utilizando-se o programa *QTL Cartographer* (BASTEN et al., 1994; BASTEN et al., 1999). Este tipo de metodologia diferencia-se do mapeamento por intervalo clássico, por isolar o efeito de outros QTLs ligados ao intervalo.

A determinação do ponto de corte para o mapeamento de QTL's foi obtido a partir da expressão  $LOD = \chi^2(2)\alpha/2\ln(10)$ , considerando a aproximação da razão de verossimilhança, representada por seu logaritmo natural (LOD), com o  $\chi^2$ . A significância de um QTL é atribuída pela razão de verossimilhança entre a hipótese de existência do QTL, e a hipótese de que nenhum QTL existe em determinada posição do mapa de ligação. No mapeamento por intervalo composto, o  $\chi^2$  possui dois graus de liberdade, pois o denominador da expressão de verossimilhança possui dois parâmetros a mais no denominador, em relação ao numerador.

## 2.8. Divergência genética

Foi feito um estudo de divergência genética das 154 RIL's com base em cada um dos grupos de características: resistência a doenças, morfológicas, quantitativas e moleculares. Para os três primeiros grupos, foram calculadas medidas de dissimilaridade entre as RIL's utilizando o método das distâncias euclidianas médias padronizadas, descrito a seguir:

Seja:

$$x_{ij} = \frac{X_{ij}}{S(X_j)} \text{ em que,}$$

$X_{ij}$  é o valor fenotípico da  $j$ -ésima característica na  $i$ -ésima RIL e  $S(X_j)$  o desvio-padrão dos dados da  $j$ -ésima característica, então:

$$d_{ii'} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_j^n (x_{ij} - x_{i'j})^2} \text{ em que,}$$

$d_{ii'}$  é a distância euclidiana média padronizada entre a RIL  $i$  e a RIL  $i'$  e  $n$  é o número de características analisadas.

Para o grupo de características moleculares, baseadas em dados binários, foram calculadas medidas de dissimilaridade com base no complemento aritmético do coeficiente de coincidências simples (SNEATH e SOKAL, 1973):

$$D_{ij} = \frac{b+c}{a+b+c+d} \text{ em que:}$$

$D_{ij}$  = Distância genética entre a linhagem ou progenitor  $i$  e a linhagem ou progenitor  $j$ ;  $a$  = número de encontros 1, 1;  $b$  = número de encontros 1, 0;  $c$  = número de encontros 0, 1;  $d$  = número de encontros 0, 0.

As distâncias calculadas com base em cada grupo de características foram transformadas em distâncias genéticas relativas ( $DR_{ij}$ ) e, para isso, a maior  $D_{ij}$  foi transformada para 100% e as demais  $D_{ij}$  foram corrigidas proporcionalmente. Foram também calculadas distâncias genéticas relativas médias baseadas na média aritmética das  $D_{ij}$ , calculadas com base em cada grupo de características.

Para analisar o interrelacionamento entre as medidas de dissimilaridade calculadas com base nos diferentes grupos de características foram calculados coeficientes de correlação simples (CRUZ e REGAZZI, 1997).

Para analisar as distâncias genéticas entre as 154 RIL's e os genitores, foi feita uma análise de distribuição de frequência das RIL's em intervalos de distâncias genéticas relativas em relação ao genitor Rudá.

Os cálculos das distâncias genéticas e das correlações foram feitos com o auxílio do Programa Genes (CRUZ, 1997).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Análise das diferentes características nas 154 RIL's e nos progenitores Ouro Negro e Rudá**

A caracterização das 154 RIL's e dos progenitores Ouro Negro (ON) e Rudá com base em 14 características de resistência a doenças, 7 características morfológicas, 49 marcadores moleculares e 8 características quantitativas é apresentada nos Quadros 1A, 2A, 3A e 4A (Apêndice).

A utilização de uma população de RIL's foi fundamental para os propósitos deste trabalho. As sucessivas autofecundações utilizadas para a obtenção desse tipo de população segregante fazem com que ocorra a fixação gênica, ou seja, a eliminação de locos em heterozigose de modo que, ao final do processo de obtenção, todos os genes, teoricamente, terão uma segregação de 1:1 (AA:aa) (PATERSON, 1996). Esse fato permite a replicação de progênies, a qual permitiu inoculações com diferentes raças fisiológicas de diferentes patógenos e ainda a montagem de um experimento de campo, com repetições, para a avaliação das características quantitativas. Além dessa grande vantagem, o desenvolvimento de RIL's em plantas autógamas, como o feijoeiro-comum, é extremamente fácil, uma vez que estas plantas reproduzem-se normalmente por autofecundação.

### 3.1.1. Análise de segregação das características de resistência, morfológicas e moleculares

A análise de segregação das características foi feita considerando a hipótese monogênica (1:1) utilizando o teste do  $\chi^2$  ( $P < 0,05$ ). Das 14 características de resistência a doenças, 10 segregaram de acordo com a hipótese monogênica, sendo cinco características de resistência à ferrugem, três à antracnose e duas à mancha-angular (Quadro 1). As quatro características de resistência que não segregaram na proporção 1:1, possivelmente, são governadas por dois ou mais genes.

Quadro 1 - Análise da segregação das características de resistência a diferentes raças fisiológicas de *U. appendiculatus*, *C. lindemuthianum* e *P. griseola* nas 154 RIL's

Raças fisiológicas	Notas*		Relação observada	$\chi^2$ **	Prob.(%)
	ON	Rudá			
32 (32132212) <sup>Ua</sup>	3	5	85:69	1,662	19,73
45 (33121211) <sup>Ua</sup>	3	4;3	111:42	31,12	0,00
46 (33122211) <sup>Ua</sup>	3	4	114:39	36,76	0,00
47 (33131113) <sup>Ua</sup>	3	5	80:74	0,234	62,87
49 (33132212) <sup>Ua</sup>	3	5	82:72	0,649	42,03
52 (33222232) <sup>Ua</sup>	3	4	79:75	0,104	74,72
56 (33232232) <sup>Ua</sup>	3	6	80:72	0,421	51,64
73 <sup>Cl</sup>	1	7	87:67	2,597	10,70
81 <sup>Cl</sup>	1	9	81:73	0,416	51,91
89 <sup>Cl</sup>	1	9	89:65	3,74	5,31
31.23 <sup>Pg</sup>	8	2	45:101	21,48	0,00
31.55 <sup>Pg</sup>	2	7	84:63	3,00	8,33
63.31 <sup>Pg</sup>	1	5	85:62	3,599	5,78
63.19 <sup>Pg</sup>	4	2	98:46	18,78	0,001

<sup>Ua</sup> Raças fisiológicas de *U. appendiculatus*

<sup>Cl</sup> Raças fisiológicas de *C. lindemuthianum*

<sup>Pg</sup> Raças fisiológicas de *P. griseola*

\* Notas 1 a 3 (resistente); >3 (suscetível)

\*\* Hipótese testada: monogênica com segregação 1:1

Com relação às características morfológicas, apenas o hábito de crescimento segregou na proporção 1:1. As demais características morfológicas não segregaram de acordo com a herança monogênica (Quadro 2). Estas

características são sujeitas à epistasia e pleiotropia de modo que as mesmas não poderão ser associadas a um cromossomo específico. Essa mesma observação foi verificada no trabalho de BASSETT (1991). Este autor publicou um mapa de ligação revisado do feijoeiro-comum, que incluía genes que controlam características morfológicas e de pigmentação, tais como cor de flor e semente. Muitas destas características apresentaram herança típica de epistasia e apenas o loco da proteína faseolina da semente e os locos do RNA ribossômico foram associados a cromossomos específicos.

Quadro 2 - Análise da segregação das características morfológicas nas 154 RIL's

Características morfológicas	Fenótipo		Relação observada	$\chi^{2**}$	Prob. (%)
	ON	Rudá			
Cor do hipocótilo	Roxo	Verde	94:57	9,07	0,26
Cor da flor	Roxa	Branca	94:57	9,07	0,26
Cor do cotilédone	Arroxeadado	Verde	94:57	9,07	0,26
Cor da listra da semente	Preta	Marrom	94:57	9,07	0,26
Hábito de crescimento	IIIb	IIb	77:76	0,006	93,55
Cor do tegumento*	Preto	Creme	-	-	-
Cor do grão*	Preto	Carioca	-	-	-

\* Características com mais de duas classes fenotípicas

\*\* Hipótese testada: monogênica (1:1)

A cor do hipocótilo, a cor de flor, a cor de cotilédone e a cor da listra da semente parecem ser governadas pelos mesmos genes, os quais apresentam interações epistáticas (LEAKEY, 1988). A cor do grão apresentou um interrelacionamento com as características morfológicas de pigmentação. As RIL's com grãos cor preta e creme com listras pretas apresentaram pigmentação no hipocótilo, na flor e no cotilédone, o que não ocorreu com as plantas com grãos cor creme com listras marrons (carioca) e bege.

Com relação aos marcadores moleculares, dos 100 *primers* testados, 30 (30%) produziram pelo menos um marcador polimórfico na população segregante, totalizando 49 marcadores moleculares. A segregação dessas bandas pelo teste do  $\chi^2$  ( $P < 0,05$ ), mostrou que 7 (14,3%) dos 49 marcadores apresentaram desvio

da segregação monogênica esperada (Quadro 3). Tais desvios de segregação têm sido frequentemente relatados em diversos trabalhos.

### *3.1.2. Análise de variância, correlações e herdabilidade das características quantitativas*

Os resultados da análise de variância de cada caráter, quanto aos quadrados médios, bem como as médias dos progenitores e das RIL's e a estimativa da herdabilidade de cada característica quantitativa são apresentados no Quadro 4. Verifica-se valores F significativos a 1% de probabilidade entre as RIL's em todos os caracteres, indicando a existência de considerável variabilidade genética entre as RIL's. Esta variabilidade genética é primordial para a identificação de QTL's associados a cada uma das características quantitativas.

As estimativas dos coeficientes de correlações genotípica e fenotípica são apresentadas no Quadro 5. Os resultados mostram que houve uma concordância de sinais nas correlações fenotípicas e genotípicas. Com relação às magnitudes, de modo geral, as correlações genotípicas foram maiores que as fenotípicas. Tal superioridade não foi observada nas correlações dos caracteres MAT, VAPLA, SEPLA, SEVAG, PRVAG com a produção por planta, indicando que a expressão fenotípica da associação destes caracteres com a produção por planta é aumentada pelas influências do ambiente.

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 mais tarde. Os caracteres VAPLA e SEPLA foram os que apresentaram maiores correlações genotípicas com a produção por planta, sendo 0,641 e 0,642, respectivamente. As correlações fenotípicas destes dois caracteres com a produção por planta foram ainda maiores (0,805 e 0,825, respectivamente). Os caracteres P100, SEVAG e PRVAG, também considerados componentes primários da produção, não apresentaram altas correlações genotípicas com a produção por planta, sendo de 0,284, - 0,005 e 0,333, respectivamente.

Quadro 3 - Análise da segregação dos marcadores moleculares nas 154 RIL's

Marcadores moleculares	Origem do marcador	Frequência observada		$\chi^{2**}$	Prob. (%)
SCF10 <sub>1050</sub>	Ouro Negro	79	75	0,104	74,72
OX11 <sub>550</sub>	Ouro Negro	80	74	0,234	62,87
OX11 <sub>1000</sub>	Ouro Negro	73	81	0,415	51,92
OI16 <sub>889</sub>	Ouro Negro	81	72	0,529	46,68
OI16 <sub>774</sub>	Rudá	73	80	0,320	57,15
OI16 <sub>540</sub>	Ouro Negro	82	71	0,791	37,38
OF10 <sub>1159</sub>	Rudá	81	71	0,658	41,73
OF10 <sub>1050</sub>	Ouro Negro	80	73	0,320	57,15
OAU20 <sub>1247</sub>	Rudá	80	74	0,234	62,87
OBH01 <sub>736</sub>	Ouro Negro	77	76	0,006	93,56
OC08 <sub>1820</sub>	Rudá	69	85	1,662	19,73
OC08 <sub>1514</sub>	Ouro Negro	84	70	1,273	25,93
OY20 <sub>1790</sub>	Rudá	81	73	0,415	51,91
OY20 <sub>1673</sub>	Ouro Negro	101	53	14,96	0,011
OBE06 <sub>1611</sub>	Ouro Negro	82	71	0,791	37,38
OBE06 <sub>1357</sub>	Rudá	78	75	0,059	80,84
OBA16 <sub>669</sub>	Ouro Negro	82	72	0,649	42,03
OBA16 <sub>583</sub>	Ouro Negro	81	73	0,415	51,91
OBF16 <sub>650</sub>	Rudá	82	69	1,119	29,01
OBH06 <sub>932</sub>	Ouro Negro	84	69	1,471	22,52
OBH06 <sub>831</sub>	Rudá	10	144	116,6	0,000
OV01 <sub>1444</sub>	Rudá	62	89	4,828	2,80
OV01 <sub>1266</sub>	Rudá	61	90	5,569	1,827
OV02 <sub>2122</sub>	Ouro Negro	75	79	0,104	74,72
OV02 <sub>1611</sub>	Rudá	69	85	1,662	19,73
OH13 <sub>509</sub>	Ouro Negro	62	88	4,507	3,376
OQ4 <sub>3457</sub>	Rudá	69	85	1,662	19,73
OAZ9 <sub>692</sub>	Ouro Negro	71	77	0,243	62,19
OAD09 <sub>3210</sub>	Rudá	79	74	0,163	68,60
OAD12 <sub>921</sub>	Ouro Negro	80	73	0,320	57,14
OAF17 <sub>3290</sub>	Ouro Negro	71	82	0,791	37,38
OAF17 <sub>2466</sub>	Ouro Negro	79	74	0,663	68,60
OAJ18 <sub>934</sub>	Ouro Negro	78	76	0,026	87,20
OAJ18 <sub>509</sub>	Ouro Negro	74	80	0,234	62,87
OH18 <sub>1537</sub>	Rudá	78	75	0,059	80,84
OH18 <sub>1468</sub>	Rudá	62	91	5,497	1,905
OH18 <sub>692</sub>	Ouro Negro	75	79	0,104	74,72
OH18 <sub>664</sub>	Ouro Negro	73	81	0,416	51,91
OI19 <sub>710</sub>	Ouro Negro	86	68	2,104	14,69
OM02 <sub>1967</sub>	Ouro Negro	70	84	1,273	25,93
OM02 <sub>640</sub>	Ouro Negro	83	71	0,935	33,36
OAS06 <sub>532</sub>	Ouro Negro	84	70	1,273	25,93
OAS11 <sub>1120</sub>	Rudá	80	73	0,320	57,15
OBC14 <sub>1374</sub>	Rudá	98	48	17,12	0,004
OBC14 <sub>493</sub>	Rudá	78	67	0,834	36,10
OBE04 <sub>1357</sub>	Ouro Negro	82	72	0,649	42,03
OBG10 <sub>934</sub>	Ouro Negro	68	86	2,104	14,69
OBG10 <sub>446</sub>	Ouro Negro	73	81	0,416	51,91
SCBA8 <sub>560</sub>	Ouro Negro	77	77	0,000	100,00

\*\* Hipótese testada: monogênica (1:1)

Quadro 4 - Análise de variância, médias e herdabilidade das características quantitativas nas 154 RIL's de feijoeiro-comum

Características quantitativas	Médias			QMg	Herdabilidade (%)
	ON	Rudá	RIL's		
FLOR	40,50	45,75	42,15	12,19**	91,62
MAT	92,75	99,50	95,64	17,23**	86,39
VAPLA	14,41	18,09	16,48	28,82**	51,00
P100	20,61	18,47	19,06	13,59**	91,26
SEPLA	70,14	94,73	80,54	787,52**	49,45
SEVAG	4,85	5,22	4,90	0,35**	70,77
PRPLA	14,51	17,45	15,31	27,33**	37,25
PRVAG	1,00	0,96	0,93	0,035**	83,05

\*\* - Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F;

FLOR (número de dias até o florescimento); MAT (número de dias até a maturação); VAPLA (número médio de vagens por planta); P100 (peso de 100 sementes); SEPLA (número médio de sementes por planta); SEVAG (número médio de sementes por vagem); PRPLA (produção média por planta) e PRVAG (produção média por vagem).

Quadro 5 - Estimativas dos coeficientes de correlação genotípica e fenotípica entre oito características em 154 RIL's de feijoeiro-comum

	FLOR	MAT	VAPLA	P100	SEPLA	SEVAG	PRPLA	PRVAG
FLOR	1	0,862	0,240	-0,574	0,431	0,3939	-0,035	-0,329
MAT	0,816	1	0,355	-0,396	0,453	0,212	0,151	-0,246
VAPLA	0,164	0,342	1	-0,387	0,883	-0,204	0,6411	-0,499
P100	-0,528	-0,337	-0,209	1	-0,535	-0,305	0,284	0,800
SEPLA	0,2881	0,393	0,925	-0,306	1	0,244	0,642	-0,346
SEVAG	0,3141	0,157	-0,077	-0,244	0,265	1	-0,005	0,248
PRPLA	-0,024	0,191	0,805	0,2672	0,825	0,125	1	0,333
PRVAG	-0,2921	-0,200	-0,243	0,784	-0,094	0,323	0,365	1

Os coeficientes acima da diagonal correspondem às correlações genotípicas ( $r_g$ ) e os abaixo da diagonal às correlações fenotípicas ( $r_f$ ) entre as características quantitativas FLOR (número de dias até o florescimento); MAT (número de dias até a maturação); VAPLA (número médio de vagens por planta); P100 (peso de 100 sementes); SEPLA (número médio de sementes por planta); SEVAG (número médio de sementes por vagem); PRPLA (produção média por planta) e PRVAG (produção média por vagem).

As estimativas da herdabilidade no sentido amplo, em nível de médias, foram superiores a 70% para cinco dos oito caracteres avaliados (Quadro 4). A menor estimativa da herdabilidade foi obtida com a caráter produção por planta: 37,25%. Os caracteres VAPLA, P100 e SEVAG, considerados componentes

primários da produção, tiveram estimativas de herdabilidade relativamente altas, 51,00%, 91,26% e 70,77%, respectivamente. Estas estimativas altas de herdabilidade possibilitam maior eficiência no processo seletivo, sendo importante salientar que o material genético utilizado apresenta nível de homozigose elevado, em virtude das sete gerações de autofecundação, o que possibilita dizer que praticamente toda herdabilidade é devida à presença de genes de natureza aditiva.

### **3.2. Mapa genético de ligação**

As 10 características de resistência a doenças, o hábito de crescimento e os 42 marcadores moleculares que segregaram na proporção 1:1 a  $P > 0,05$  foram utilizados para a construção do mapa de ligação gênica apresentado na Figura 1. Adotando um valor de LOD de 4,0 e uma frequência máxima de recombinação de 0,40, 43 dos 53 locos citados acima foram mapeados em nove grupos de ligação.

A distribuição dos intervalos (cM) entre dois marcadores adjacentes variou entre 0,0 e 28,0 cM, com média de 7,3 cM. A maioria dos intervalos (82%) correspondeu a intervalos menores que 10 cM. Os 43 locos mapeados cobriram uma distância de recombinação total de 247,8 cM. Essa distância é menor que a encontrada em outros mapas genéticos já construídos por causa do pequeno número de marcadores utilizados até o momento. VALLEJOS et al. (1992), NODARI et al. (1993) e MIKLAS et al. (1998) construíram mapas de feijoeiro-comum com distância de recombinação total de 960, 827 e 924 cM, respectivamente.

Os nove grupos de ligação variaram em tamanho de 2,3 a 61,2 cM. O grupo 1 de 41,4 cM é o que apresenta maior número de marcadores, sendo o grupo onde estão concentrados todos os genes de resistência à ferrugem e à antracnose (Figura 1).

### **3.3. Identificação e mapeamento de QTL's**

Foram identificados marcadores associados às oito características quantitativas estudadas neste trabalho. O Quadro 6 apresenta os marcadores associados à FLOR, MAT, VAPLA, P100, SEPLA, SEVAG, PRPLA, PRVAG, considerando  $P < 0,05$  na regressão múltipla, bem como a proporção da variância fenotípica de cada característica quantitativa explicada pela segregação de cada

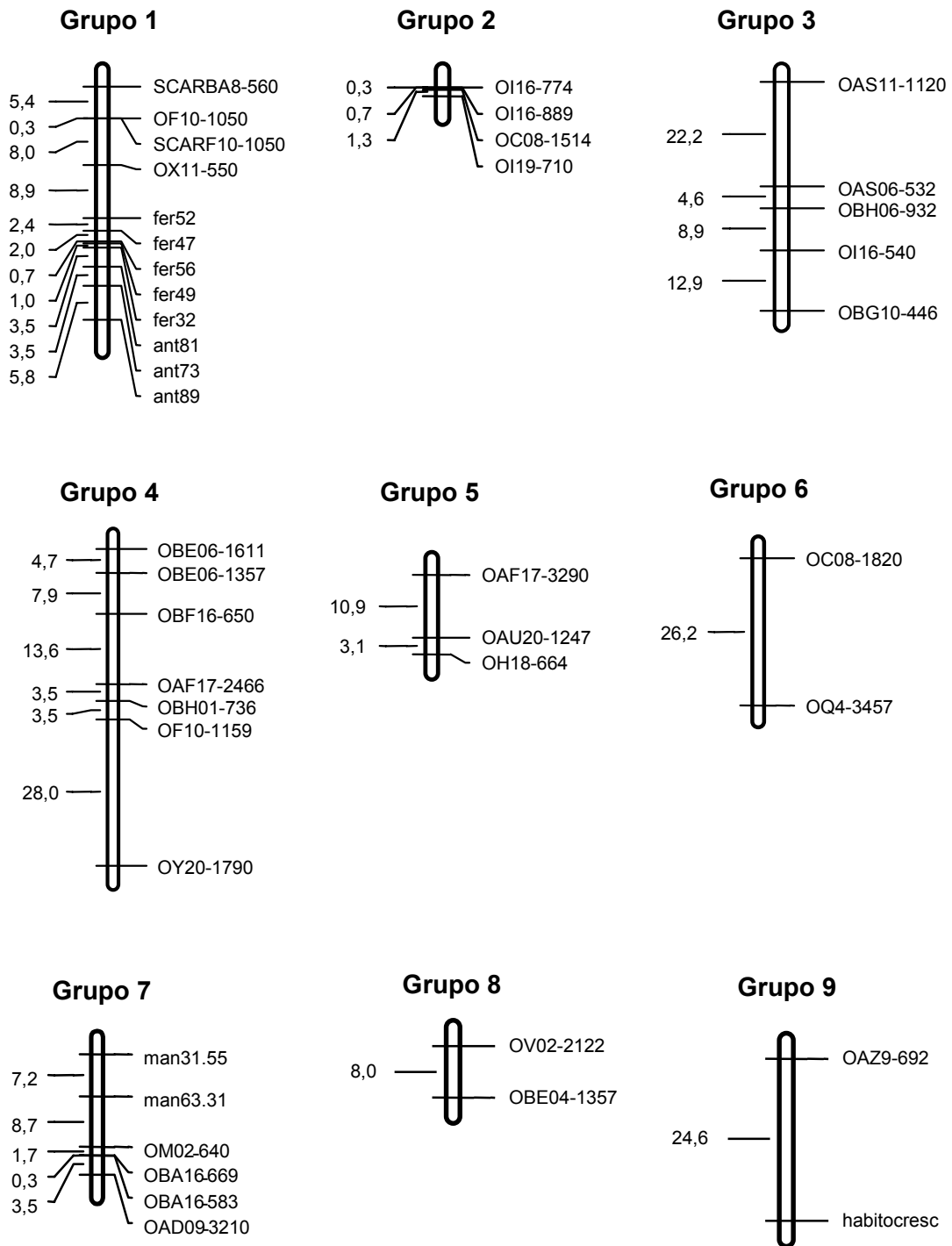


Figura 1. Mapa parcial de ligação genética do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) baseado na análise de segregação de 10 características de resistência a doenças, do hábito de crescimento e de 42 marcadores moleculares RAPD e SCARs. O mapa foi construído com LOD=4,0 e máxima freqüência de recombinação de 0,40.

marcador individualmente (regressão simples) e de todos marcadores em conjunto (regressão múltipla).

Os marcadores associados a cada característica, em conjunto, explicaram 39,79% da FLOR, 40,14% da MAT, 28,99% da VAPLA, 36,07% da P100, 14,03% da SEPLA, 23,62% da SEVAG, 19,20% da PRPLA e 17,13% da PRVAG (Quadro 6). No caso da FLOR os três marcadores advindos do progenitor Rudá apresentam um efeito positivo sobre a característica e os três marcadores advindos do Ouro Negro apresentam um efeito negativo. Nas demais características quantitativas, tal observação não foi verificada. Na verdade, a média fenotípica dos progenitores nem sempre refletem os efeitos que os marcadores terão sobre a característica. BRESSAN-SMITH (1998), por exemplo, detectou marcadores que contribuem para o aumento da média de vários caracteres agrônômicos no feijoeiro-comum, advindos do progenitor com média fenotípica inferior. A utilização de marcadores moleculares para detectar alelos favoráveis em genótipos com médias fenotípicas inferiores e, posteriormente, combinar com alelos favoráveis de genótipos superiores constitui uma estratégia interessante para acelerar e aumentar os ganhos de seleção no melhoramento de características quantitativas.

Na Figura 2 estão ilustrados os QTL's associados às diferentes características quantitativas ao longo dos nove grupos de ligação. O ponto de corte para o mapeamento de QTL's no genoma completo, obtido a partir da expressão  $LOD = \chi^2(2)\alpha/2\ln(10)$  considerando  $P < 0,01$ , foi de  $LOD = 2,0$ . Para todas características quantitativas avaliadas foram mapeados QTL's. Para a FLOR foram mapeados 5 QTL's nos grupos de ligação 2, 3, 5, 7 e 9. A característica MAT também apresentou QTL's nos grupos de ligação 2, 3 e 9. Esta coincidência de QTL's pode ser explicada pela alta correlação genotípica ( $r_g = 0,862$ ) entre estas características. PATERSON et al. (1991) relatam que algumas características correlacionadas podem demonstrar os mesmos marcadores associados a cada uma das características. Tal observação foi verificada também entre as características VAPLA e SEPLA; P100 e PRVAG.

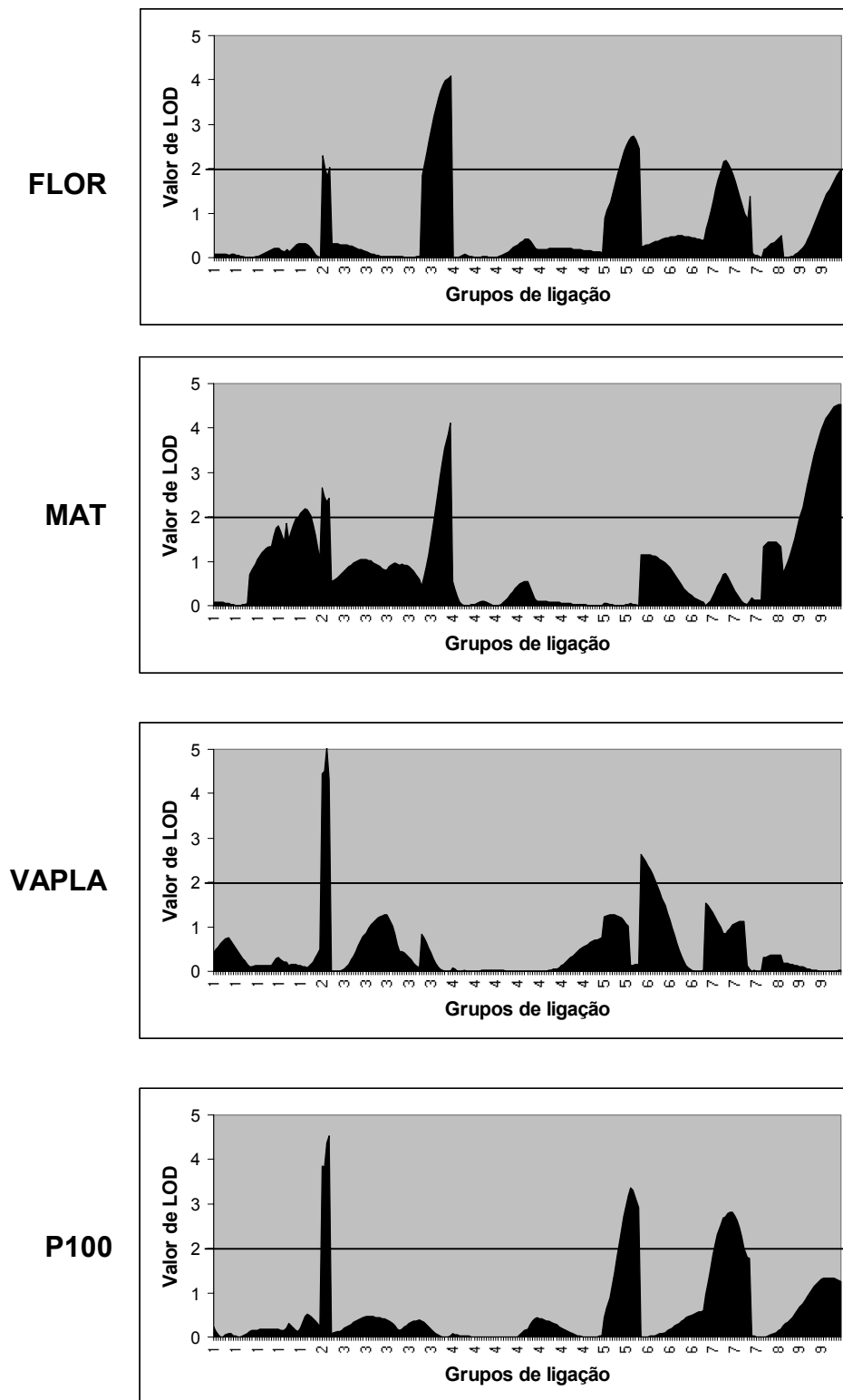
Quadro 6 - Associação entre os marcadores e as características FLOR, MAT, VAPLA, P100, SEPLA, SEVAG, PRPLA, PRVAG detectada por meio da regressão simples e da regressão múltipla, utilizando o limite de significância de  $P < 0,05$  para a regressão múltipla

Característica quantitativa	Marcadores	Grupo de ligação	F	Prob.	R <sup>2</sup> (%) simples	Efeito	R <sup>2</sup> (%) múltipla
FLOR	rOAD09 <sub>3210</sub>	7	7,078	0,0088	11,81	+	39,79
	rOAU20 <sub>1247</sub>	5	17,634	0,0001	11,57	+	
	oOAJ18 <sub>509</sub>	N	6,2	0,0142	5,82	-	
	oOAJ18 <sub>934</sub>	N	10,416	0,0016	2,29	-	
	oOBG10 <sub>446</sub>	3	13,193	0,0004	5,71	-	
	rHábito IIIa	9	12,496	0,0006	8,40	+	
MAT	oOX11 <sub>1000</sub>	N	7,662	0,0066	5,64	+	40,14
	oOF10 <sub>1050</sub>	1	5,291	0,0232	0,12	-	
	rOC08 <sub>1820</sub>	6	8,312	0,0047	1,34	+	
	oOAD12 <sub>921</sub>	N	8,314	0,0047	6,05	+	
	oOH18 <sub>692</sub>	5	12,568	0,0006	7,10	+	
	oOI19 <sub>710</sub>	2	10,946	0,0012	6,47	+	
	oOBG10 <sub>446</sub>	3	14,451	0,0002	5,49	-	
	rHábito IIIa	9	20,575	0,0000	3,61	+	
VAPLA	oOF10 <sub>1050</sub>	1	5,678	0,0188	3,70	-	28,99
	rOC08 <sub>1820</sub>	6	9,435	0,0026	5,85	+	
	oOC08 <sub>1514</sub>	2	12,492	0,0006	11,96	+	
	rOAD12 <sub>921</sub>	N	5,279	0,0233	6,39	+	
	oOM02 <sub>1967</sub>	N	3,995	0,0479	0,81	-	
	oOM02 <sub>640</sub>	7	5,292	0,0231	4,25	-	
P100	oOI16 <sub>540</sub>	3	5,609	0,0195	2,43	-	36,07
	rOAU20 <sub>1247</sub>	5	21,270	0,0000	8,48	-	
	oOAF17 <sub>3290</sub>	5	6,535	0,0118	0,03	-	
	rOH18 <sub>1537</sub>	N	4,041	0,0467	0,62	+	
	oOI19 <sub>710</sub>	2	13,342	0,0004	7,49	-	
	oOM02 <sub>640</sub>	7	6,877	0,0099	6,83	+	
	rHábito IIIa	9	6,083	0,0151	7,84	-	
SEPLA	oOC08 <sub>1514</sub>	2	12,166	0,0007	9,17	+	14,03
	oOM02 <sub>640</sub>	7	6,947	0,0095	5,52	-	
SEVAG	oOF10 <sub>1050</sub>	1	5,170	0,0247	11,10	+	23,62
	rOAU20 <sub>1247</sub>	5	12,068	0,0007	12,23	+	
	rHábito IIIa	9	6,438	0,0124	11,08	+	
PRPLA	rOC08 <sub>1820</sub>	6	12,177	0,0007	3,14	+	19,20
	rOQ04 <sub>3457</sub>	6	7,117	0,0087	3,15	-	
	oOH18 <sub>664</sub>	5	8,865	0,0035	4,95	+	
	oOAS06 <sub>532</sub>	3	6,799	0,0103	3,77	-	
PRVAG	oOI16 <sub>540</sub>	3	5,246	0,0237	3,47	-	17,13
	oOC08 <sub>1514</sub>	2	11,744	0,0008	7,03	-	
	rOQ04 <sub>3457</sub>	6	4,249	0,0414	1,51	-	
	oOM02 <sub>640</sub>	7	5,958	0,0161	3,53	+	

N - não ligado.

Os marcadores com iniciais o e r são provenientes dos progenitores Ouro Negro e Rudá, respectivamente.

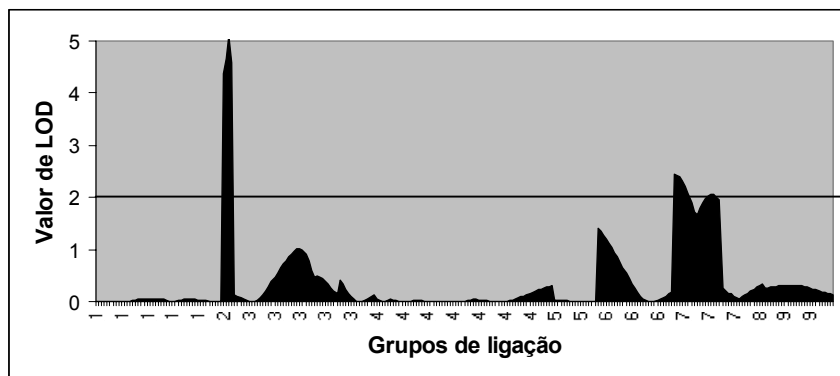
Características quantitativas: FLOR (número de dias até o florescimento); MAT (número de dias até a maturação); VAPLA (número médio de vagens por planta); P100 (peso de 100 sementes); SEPLA (número médio de sementes por planta); SEVAG (número médio de sementes por vagem); PRPLA (produção média por planta) e PRVAG (produção média por vagem).



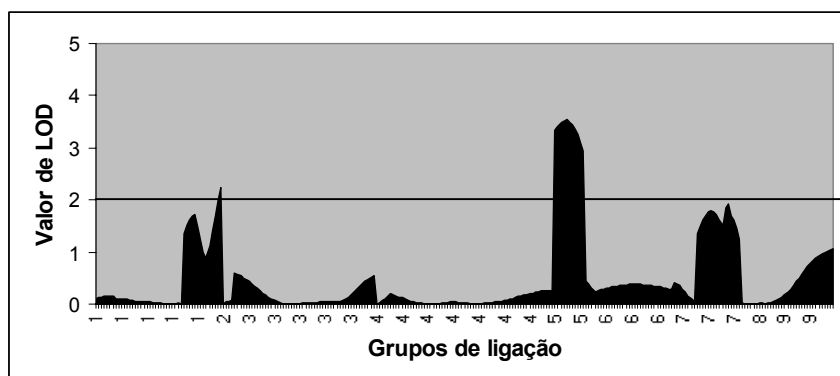
Continua...

Figura 2 - QTL's associados a FLOR (número de dias até o florescimento); MAT (número de dias até a maturação); VAPLA (número médio de vagens por planta); P100 (peso de 100 sementes); SEPLA (número médio de sementes por planta); SEVAG (número médio de sementes por vagem); PRPLA (produção média por planta) e PRVAG (produção média por vagem), identificados ao longo dos nove grupos de ligação.

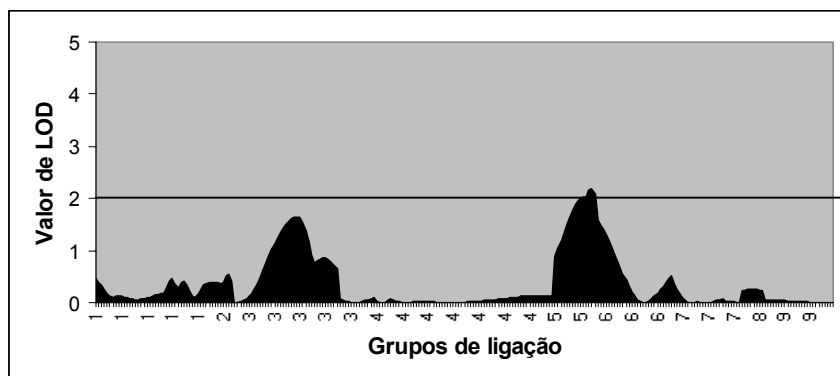
**SEPLA**



**SEVAG**



**PRPLA**



**PRVAG**

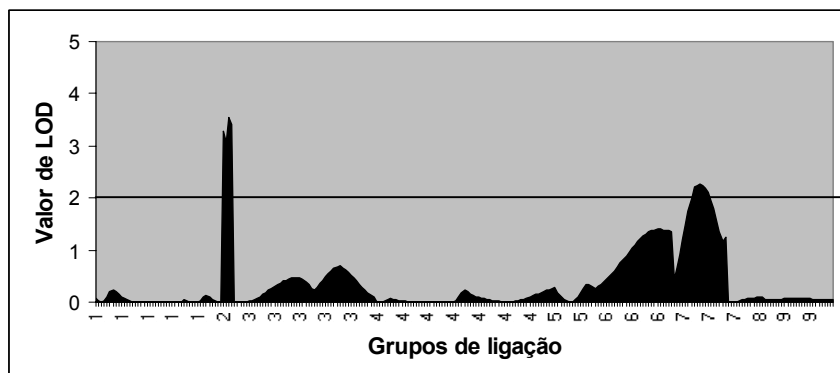


Figura 2, Cont.

Algumas características correlacionadas negativamente demonstram QTL's ligados no mesmo grupo de ligação. Por exemplo, P100 e SEPLA ( $r_g = -0,535$ ) apresentaram QTL's nos grupos de ligação 2 e 7. Contudo, os marcadores presentes nestes grupos que explicam essas duas características tem efeitos contrários sobre elas (Quadro 6). Tal observação foi verificada também entre as características P100 e VAPLA; P100 e SEVAG; VAPLA e PRVAG. Ao se analisar ao contrário, outra observação é a de que os QTL's ligados, de características altamente correlacionadas positivamente, por exemplo VAPLA e SEPLA, usualmente os marcadores do QTL comum têm a mesma direção de efeito. Resultados semelhantes quanto à direção de efeitos de marcadores em características correlacionadas foram encontrados por BRESSAN-SMITH (1998) e PEREIRA et al. (1995), trabalhando com características relacionadas com componentes de rendimento em feijão e em sorgo, respectivamente.

A característica PRPLA revelou apenas um QTL no grupo de ligação 6, estando o marcador oOC08<sub>1820</sub> associado a esse QTL. A observação de apenas um QTL significativo na PRPLA é explicada pelo fato dessa característica possuir baixa herdabilidade, o que significa baixa acurácia na medição dos valores fenotípicos dessa característica, em virtude dos efeitos ambientais. Contudo, o marcador oOC08<sub>1820</sub> tem um efeito positivo também na característica VAPLA, que é um dos componentes primários da produção. A combinação das informações deste marcador com outros marcadores ligados a outros componentes primários como o oOC08<sub>1514</sub> sobre SEPLA, rOAU20<sub>1247</sub> sobre SEVAG e oOM02<sub>640</sub> sobre P100 pode aumentar os ganhos de seleção no melhoramento visando ao aumento da produtividade do feijoeiro.

### **3.4. Divergência genética**

Os coeficientes de correlações simples entre as medidas de dissimilaridade entre as RIL's calculadas com base nos diferentes grupos de características são apresentados no Quadro 7. Pode-se observar que tais coeficientes de correlação foram muito baixos. A justificativa para tal observação é que ao analisar diferentes grupos de características, examina-se diferentes regiões do genoma. Estes dados mostram a complementariedade dos diferentes grupos de características na avaliação da diversidade genética.

Quadro 6 - Coeficientes de correlação simples entre medidas de dissimilaridade, calculadas com base em quatro grupos de características avaliadas em 154 RIL's de feijoeiro-comum

Grupos de características	Resistência	Morfológicas	Quantitativas	Moleculares
Resistência	1	0,01791	0,00499	-0,02067
Morfológicas		1	-0,00612	-0,06220
Quantitativas			1	-0,06183
Moleculares				1

A análise de distribuição de frequência das RIL's em intervalos de distâncias genéticas relativas em relação ao genitor Rudá, calculadas com base nos diferentes grupos de características, evidencia que as distâncias genéticas entre as 154 RIL's e os genitores são diferenciadas de acordo com o grupo de características avaliadas (Figura 3). As distâncias genéticas calculadas com base nos marcadores moleculares e nas características quantitativas propiciaram uma distribuição de frequência normal das RIL's, ou seja, um maior número de RIL's apresentam distâncias genéticas intermediárias entre os dois progenitores. Esta distribuição não foi verificada quando as distâncias genéticas foram calculadas com base nas características de resistência a doenças e morfológicas. A explicação para tal comportamento das RIL's é o número de genes envolvidos em cada grupo de características (FALCONER, 1987).

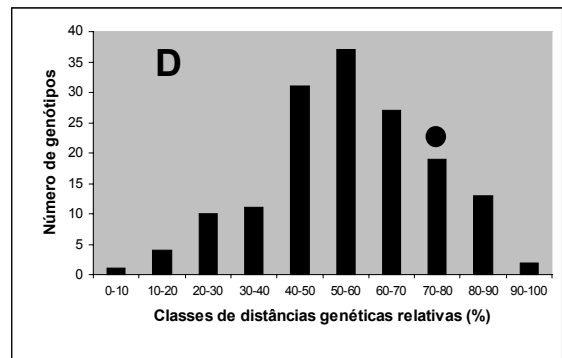
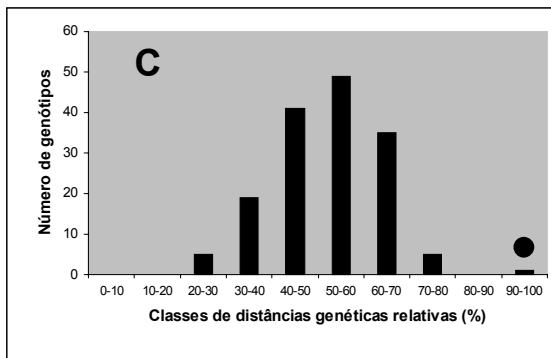
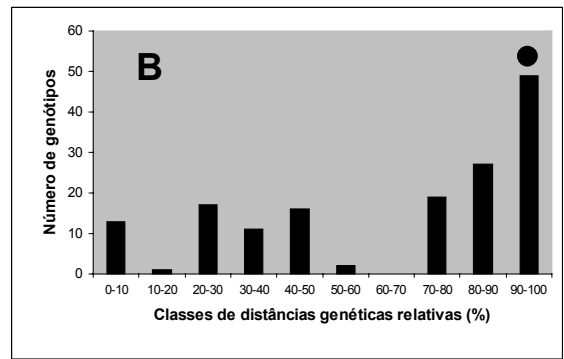
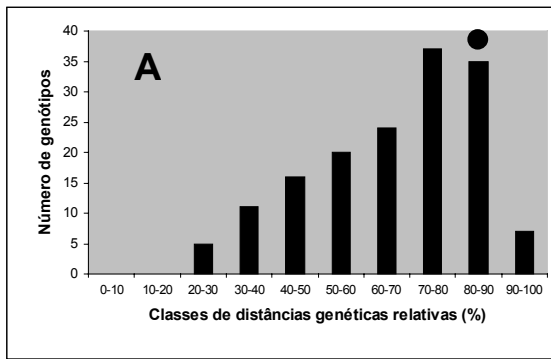


Figura 3 - Distribuição de freqüência das RIL's com base nas distâncias genéticas relativas (%) em relação ao progenitor Rudá calculadas com base em 14 características de resistência a doenças (A), 7 características morfológicas (B), 49 marcadores moleculares (C) e 8 características quantitativas (D). ● Classe onde está presente o genitor Ouro Negro.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Objetivou-se neste trabalho caracterizar 154 linhas endogâmicas recombinantes (RIL's) por meio da avaliação de características quantitativas, morfológicas, moleculares e de resistência a doenças e mapear locos de características quantitativas relacionadas ao ciclo e ao rendimento do feijoeiro-comum. Foram avaliadas 14 características de resistência a doenças, sete características morfológicas, 49 marcadores moleculares e oito características quantitativas. Dez características de resistência a doenças, hábito de crescimento e os 42 marcadores moleculares que segregaram na proporção 1:1 a  $P > 0,05$  foram utilizados para a construção do mapa de ligação gênica. Adotando um valor de LOD de 4,0 e uma frequência máxima de recombinação de 0,40, 43 marcadores foram mapeados em nove grupos de ligação. A distribuição dos intervalos (cM) entre dois marcadores adjacentes variou entre 0,0 e 28,0 cM, com média de 7,3 cM. A maioria dos intervalos (82%) correspondeu a intervalos menores que 10 cM. Os 43 marcadores mapeados cobriram uma distância de recombinação total de 247,8 cM. Os nove grupos de ligação variaram em tamanho de 2,3 a 61,2 cM. O grupo 1 de 41,4 cM é o que apresentou maior número de marcadores, sendo o grupo onde estão concentrados todos os genes de resistência à ferrugem e à antracnose. Foram identificados QTL's das oito características quantitativas estudadas. Os marcadores associados a cada característica, em conjunto, explicaram 39,79% da FLOR, 40,14% da MAT, 28,99% da VAPLA, 36,07% da P100, 14,03% da SEPLA, 23,62% da SEVAG, 19,20% da PRPLA e 17,13% da PRVAG. Os resultados encontrados neste trabalho lançaram bases para o desenvolvimento de mapas específicos saturados e de utilidade em programas de melhoramento que visem o aumento do rendimento do feijoeiro-comum.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. (1994). SCAR, RAPD and RFLP markers linked to a dominant gene (*Are*) conferring resistance to anthracnose in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, p. 865-870, 1994.
- AHN, S., TANKSLEY, S.D. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 90, p. 7980-7984, 1993.
- AKKAYA, M.S., BHAGWAT, A.A., CREGAN, P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, v. 132, p. 1131-1139, 1992.
- AL-JANAB, S.M., HONEYCUTT, R.J., McCLELLAND, M., SOBRAL, B.W.S. A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. "SES208". **Genetics**, v. 134, p. 1249-1260, 1993.
- ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1971. 381p.
- ALZATE-MARIN, A.L. **Resistência à antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.): diversidade genética de raças de *Colletotrichum lindemuthianum*, herança da resistência e identificação de marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 1996. 65p. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- ALZATE-MARIN, A.L., ARRUDA, M.C.C., MENARIM, H., CHAGAS, J.M., BARROS, E.G., 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., 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., SOUZA, K.A., CHAGAS, J.M., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Estratégias de separação e identificação dos genes *Co-4<sup>2</sup>* e *Co-5* envolvidos na resistência às raças 73 e 89 de *Colletotrichum lindemuthianum* no cultivar G2333. **Resumos da VI Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão**, p. 48-50, 1999c.
- ANDERSON, P.A., LAWRENCE, G., MORRISH, B.C., AYLIFFE, M.A., FINNEGAN, E.J., ELLIS, J.G. Inactivation of the rust resistance gene M associated with a loss of a repeated unit within the leucine-rich repeat coding region. **Plant Cell**, v. 9, p. 641-651, 1997.
- 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. EPAMIG, 1991. 2p. (Comunicado técnico, 1).
- ARENDONK, J.A.M., TIER, B., KINGHORN, B.P., Use of multiple genetic markers in prediction of breeding values. **Genetics**, v. 137, p. 319-329, 1994.
- ARUMUGANATHAM, K., EARLE, E.D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology. Report**, v. 9, p. 208-218, 1991.
- AUGUSTIN, E., COYNE, D.P., SCHUSTER, M.L. Inheritance of resistance in *Phaseolus vulgaris* to *Uromyces phaseoli typica* Brazilian rust race B11 and of plant habit. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v. 97, p. 526-529, 1972.
- AWUMA, K., BASSETT, M.J. Addition of genes for swarf seed (*ds*) and spindly branch (*sb*) to the linkage map of common bean. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v. 113, p. 464-467, 1988.
- BALLVORA, A., HESSELBACH, J., NIEWOHNER, J., LEISTER, D., SALAMINI, F., GEBHARDT, C. Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harbouring the nematode resistance gene. **Molecular and General Genetics**, v. 249, p. 82-90, 1995.
- BANNEROT, H., DEIEUX, M., FOUILLOUX, G. Mise en évidence d'un second de resistance totale a l'antracnose chez le haricot. **Ann. Amelior. Plant (Paris)**, v. 21, p. 83-85, 1971.
- BASSETT, M.J. **Linkage mapping of marker genes in common bean**. In: GEPTS, P. (Ed.). Genetic resources of *Phaseolus* beans. Dordrecht, Holland: Kluwer Academic. 1988. p. 329-353.
- BASSETT, M.J. A revised linkage map of common bean. **HortScience**, v. 26, p. 834-836, 1991.

- BASSETT, M.J., AWUMA, K. Is the *P* gene in common bean located in linkage group VII **Journal of American Society of Horticultural Science**, v. 113, p. 753-754, 1988.
- BASTEN, C.J., WEIR, B.S. e ZENG, Z.B. **Zmap-a QTL cartographer** In: . SMITH, C., GAVONA, J.S., BENKEL, B., CHESNAIS, J., FAIRFULL, W., GIBSON, J.P., KENNEDY, B.W. AND BURNSIDE, E.B. (Eds.). Proceedings of the 5<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production: computing strategies and software. Ontario, Canada: Guelph. 1994. p. 65-66.
- BASTEN, C.J., WEIR, B.S. e ZENG, Z.B. **QTL cartographer, Version 1.13**. Department of Statistics, North Carolina State University: Raleigh, NC. 1999.
- BEEBE, S., PEDRAZA, F., ROJAS, M., GUTIERREZ, J., TOHME, J. A genetic map of common bean combining RFLP, RAPD, SCAR and AFLP markers. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 41, p. 95-96, 1998.
- BECKER, J., VOS, P., KUIPER, M., SALAMINI, F., HEUN, M. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. **Molecular and General Genetics**, v. 249, p. 65-73, 1995.
- BECKMANN, J.S., SOLLER, M. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. **Biotechnology**, v. 8, p. 930-932, 1990.
- BELSLEY, D.A., KUH, E., WELCH, R.E. **Regression diagnostics: identifying data and sources of collinearity**. New York: John Wiley & Sons, 1980. 292p.
- BENNETZEN, J.L. QIN, M.M., INGELS, S., ELLINGBOE, A.H. Allele-specific and *Mutator*-associated instability at the *Rp1* disease-resistance locus of maize. **Nature**, v.332, p. 369-370, 1988.
- BENTOTILA, S., GUITTON, C., BOUVET, N., SAILLAND, A., NYKAZA, S., FREYSSINET, G. Identification of an RFLP marker tightly linked to the *Ht1* gene in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 82, p. 393-398, 1991.
- BONIERBALE, M.W., PLAISTED, R.L., TANKSLEY, S.D. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. **Genetics**, v. 120, p. 1095-1103, 1988.
- BRESSAN-SMITH, R.E. **Mapeamento de locos de características quantitativas associados com a morfologia, a fotossíntese e o rendimento do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Campos dos Goytacazes, RJ: UENF, 1998. 86p. (Tese de Doutorado). Universidade Estadual do Norte Fluminense, 1998.
- BRIM, C.A. A modified pedigree method of selection in soybeans. **Crop Science**, v. 6, p. 220, 1966.
- BURR, B., BURR, F.A., THOMPSON, K.H., ALBERTSON, M., STUBER, C.W. Gene mapping with recombinant inbreds in maize. **Genetics**, v. 118, p. 519-526, 1988.

- CÁRDENAS, F., ADAMS, M.W., ANDERSEN, A. The genetic system for reaction of field beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to infection by three physiologic races of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Euphytica**, v. 13, p. 178-186, 1964.
- CARRIJO, I.V., CHAVES, G.M., PEREIRA, A.A. Reação de vinte e cinco variedades de *Phaseolus vulgaris* a trinta e nove raças fisiológicas de *Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth., em condições de casa-de-vegetação. 245-255, 1980.
- 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, G.A., PAULA JÚNIOR, T.J., ALZATE-MARIN, A.L., NIETSCHKE, S., BARROS, E.G., 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, 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. (Mimeografado).
- CASTOLDI, F.L. **Análises das interrelações entre rendimento e diversas características agrônômicas do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Viçosa, MG: UFV, 1991. 73p. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 1991.
- CHAPARRO, J.X., WERNER, D.J., D'MALLEY, D., SEDEROFF, R.R. Targeted mapping and linkage analysis of morphological, isozyme, and RAPD markers in peach **Theoretical and Applied Genetics**, v. 87, p. 805-815, 1994.
- CHASE, C.D., ORTEGA, V.M., VALLEJOS, C.E. DNA restriction fragment length polymorphisms correlate with isozyme diversity in *Phaseolus vulgaris* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 81, p. 806-811, 1991.
- COE, E.H., HOISINGTON, D.A., NEUFFER, M.G. **Linkage map of corn (maize) (*Zea mays* L.) (2n=20)**. In: O'BRIEN, S.J. (Ed.) Genetic maps. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 1990. p. 639-667.
- CORRÊA, R.X. **Mapeamento genético da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) utilizando marcadores RAPD**. Viçosa, MG: UFV, 1995. 97p. (Dissertação Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- CORRÊA, R.X. **Genes de resistência a doenças do feijoeiro-comum: Identificação de marcadores moleculares, organização e identificação de análogos**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 115p. (Tese de Doutorado). 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. Marcador SCAR ligado a gene de resistência do feijoeiro à ferrugem. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, p. 237, 1998. (Resumo).
- COWEN, N.M. The use of replicated progenies in marker-based mapping of QTL's. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 75, p. 857-862, 1988.
- COYNE, D.P., SHUSTER, M.L. Genetic and breeding strategy for resistance to rust (*Uromyces phaseoli* (Reben) Wint.) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, v. 24, p. 795-803, 1975.
- CREGAN, P.B., JARVIK, T., BUSH, A.L., SHOEMAKER, R.C., LARK, K.G., KAHLER, A.L., KAYA, N., VAN-TOAI, T.T., LOHNES, D.G., CHUNG, J., SPECHT, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, v.39, p. 1464-1490, 1999.
- CRURCHILL, G.A., DOERGE, R.W. **Mapping quantitative trait loci in experimental populations**. In: PATERSON, A.H. (ed.) Molecular dissection of complex trait. New York: CRC Press, 1998, p. 31-41.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 1997. 442p.
- CRUZ, C.D., REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2<sup>a</sup>.ed. Viçosa: UFV, 1997. 390p.
- DANNA, K., NATHANS, D. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonucleases of *Hemophilus influenzae*. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 68, p. 2913-2917, 1971.
- DAVIS, D.W., ENGELKES, C.A., GROTH, J.V. Erosion of resistance to common leaf rust in exotic-derived maize during selection for other traits. **Phytopathology**, v.80, p. 339-342, 1990.
- 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.
- DEVEY, M.E., DELFINOMIX, A., KINLOCH, B.B., NEALE, D.B. Random amplified polymorphic DNA markers tightly linked to a gene for resistance to white pine blister rust in sugar pine. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 92, p. 2066-2070, 1995.
- DIERS, B.W. MANSUR, L., IMSANDE, J., SHOEMAKER, R.C. Mapping *Phytophthora* resistance loci in soybean with restriction fragment length polymorphism markers. **Crop Science**, v. 32, p. 377-383, 1992.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

- DRAPER, N.R. e SMITH, H. **Applied regression analysis**. New York, London: John Wiley and Sons. 1966.
- DURANTE, M., CIONINI, P.G., AVANZI, S., CREMONINI, R., D'AMATO, F. Cytological localization of the genes for the four classes of ribosomal RNA (25S, 18S, 5.8S, and 5S) in polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus*. **Chromosoma**, v. 60, p. 269-282, 1977.
- EDWARDS, M.D., STUBER, C.S., WENDEL, J.F. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative-trait loci in maize. I - Numbers, genomic distribution and types of gene action. **Genetics**, v. 130, p. 113-125, 1987.
- ELLIS, J.G., LAWRENCE, G.J., PEACOCK, W.J., PRYOR, A.J. Approaches to cloning plant genes conferring resistance to fungal pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.26, p. 245-263, 1988.
- FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1987. 279p.
- FALEIRO, F.G. **Identificação de raças, diversidade genética de *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* e herança da resistência no feijoeiro**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 65p. (Dissertação Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- FALEIRO, F.G., PAULA JR., T.J., BARROS, E.G., 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., MESQUITA, A.G.G., CARVALHO, G.A., PAULA JÚNIOR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Obtenção de uma variedade de feijão "tipo carioca" resistente à ferrugem e à antracnose por meio de retrocruzamentos assistidos por marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22 (suplemento), p.260, 1997.
- FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A, MESQUITA, A.G.G., VINHADELLI, W.S., PAULA JÚNIOR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Diversidade genética de isolados de *Uromyces appendiculatus* utilizando marcadores moleculares RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p.386-390, 1998.
- FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., PAULA JR., T.J., MOREIRA, E.G., BARROS, E.G. Resistência de variedades de feijoeiro-comum a quatro raças de *Uromyces appendiculatus*. **Revista Ceres**, v.46, p. 19-27, 1999a.
- FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., ZAMBOLIM, L., PAULA JR., T.J., MOREIRA, E.G., BARROS, E.G. Identificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus* no Estado de Minas Gerais, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 166-169, 1999b.
- FALEIRO, F.G., ZAMBOLIM, L., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., PAULA JR., T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Sistema simplificado para

nomenclatura e classificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 540-545, 1999c.

FALEIRO, F.G., VINHADELLI, W.S., RAGAGNIN, V.A., CORRÊA, R.X., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. RAPD markers linked to a block of genes conferring rust resistance to the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p.399-402, 2000a.

FERREIRA, M.E. **Linkage mapping of molecular markers and loci associated with flower induction and disease resistance in *Brassica napus***. Madison, WI, USA: University of Wisconsin, 1993. (Tese Ph.D.). University of Wisconsin, 1993.

FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília:EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p.

FERREIRA, M.E., WILLIAMS, P.H., OSBORN, T.C. RFLP mapping of *Brassica napus* using doubled-haploid lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, p. 615-621, 1994.

FERREIRA, M.E., RIMMER, S.R., WILLIAMS, P.H., OSBORN, R.C. Mapping of loci controlling *Brassica napus* resistance to *Leptosphaeria maculans* under different screening conditions. **Phytopathology**, v. 85, p. 213-217, 1995a.

FERREIRA, M.E., WILLIAMS, P.H., OSBORN, R.C. Molecular mapping of a locus controlling resistance to *Albugo candida* in *Brassica napus*. **Phytopathology**, v. 85, p. 218-220, 1995b.

FERREIRA, C.F., BORÉM, A., NIETSCHKE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Marcador RAPD associado ao gene de resistência à mancha-angular do feijoeiro. **Resumos da VI Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão**, p. 60-61, 1999.

FISHER, R.A. A model for the generation of self-sterility alleles. **Journal of Theoretical Biology**, v. 1, p. 411-414, 1961.

FLOR, H.H., COMSTOCK, V.E. Development of flax cultivars with multiple rust resistance conditioning genes. **Crop Science**, v.11, p. 64-66, 1971.

FLOR, H.H. Host-parasite interactions in flax rust-its genetics and other implications. **Phytopathology**, v. 45, p. 680-685, 1955.

FLOR, H.H. Tests for allelism of rust resistance genes in flax. **Crop Science**, v.5, p. 415-418, 1965.

GALE, M.D., CHAO, S., SHARP, P.J. **RFLP mapping in wheat - progress and problems**. In: GUSTAFSON J.P. (Ed.). Gene manipulation in plant improvement. Vol 2. New York: Plenum Press. 1990. p. 353-364.

GEBHARDT, C., RITTER, E., DEBENER, T., SCHACHTSCHABEL, V., WADEMEIER, B., UHRIG, H., SALAMINI, F. RFLP analysis and linkage

- mapping in *Solanum tuberosum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 78, p. 65-75, 1989.
- GEPTS, P. Provisional linkage map of common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 31, p. 20-25, 1988.
- GIESE, H. Powdery mildew resistance genes in the *Ml-a* and *Ml-k* regions on barley chromosome 5. **Hereditas**, v.95, p. 51-62, 1981.
- GIESE, H., JORGENSEN, J., JENSEN, J.P., JENSEN, J. Linkage relationships of ten powdery mildew resistance genes on barley chromosome 5. **Hereditas**, v.95, p. 43-50, 1981.
- GILMELFARB, A., LANDE, R. Simulation of marker assisted selection for non-additive traits. **Genetic Research Camb.**, v. 64, p. 127-136, 1994.
- GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 11<sup>a</sup>.ed. Piracicaba: Livraria Nobel S.A., 1985. 466p.
- GRADINER, J.M., COE, E.H., MELIA-HANCOCK, S., HOISINGTON, D.A., CHAO, S. Development of a core RFLP map in maize using an immortalized F<sub>2</sub> population. **Genetics**, v. 134, p. 917-930, 1993.
- GRAFTON, K.F., WEISER, G.C., LITTLEFIELD, L.J., STAVELY, J.R. Inheritance of resistance to two races of leaf rust in dry edible bean. **Crop Science**, v. 25, p. 537-539, 1985.
- GRATTAPAGLIA, D., SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, v. 137, p. 1121-1137, 1994.
- GRODZICKER, T., WILLIAMS, J., SHARP, P., SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biology**, v. 39, p. 439-436, 1974.
- 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.
- 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.
- HALL, R., NASSER, L.C.B. Practice and precept in cultural management of bean diseases. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 18, p. 176-185, 1996.
- HAMMOND-KOSACK, K.E., JONES, J.D.G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1773-1791, 1996.
- HAYWARD, M.D., McADAM, N.J., JONES, J.G., EVANS, C., EVANS, G.M., FORSTER, J.W., USTIN, A., HOSSAIN, K.G., QUADER, B., STAMMERS, M.,

- WILL, J.K. Genetic markers and the selection of quantitative traits in forage grasses. **Euphytica**, v. 77, p. 269-275, 1994.
- HELENTJARIS, T., SLOCUM, M., WRIGHT, S., SCHAEFER, A., NIENHUIS, J. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 72, p. 761-769, 1986.
- HEUN, M., KENNEDY, A.E., ANDERSON, J.A., LAPITAN, N.L.V., SORRELLS, M.E., TANKSLEY, S.D. Construction of a restriction fragment length polymorphisms map for barley (*Hordeum vulgare*). **Genome**, v. 34, p. 437-447, 1991.
- HOOKE, A.L. **Corn and sorghum rusts**. In: ROELFS, A.P., BUSHNELL, W.R. (eds.). The cereal rusts vol2. Diseases, distribution, epidemiology, and control. Academic Press: Orlando. 1985. p.207-233.
- HUCL, P., SCOLES, G.J. Interspecific hybridizations in the common bean: a review. **HortScience**, v. 20, p. 352-357, 1985.
- HULBERT, S.H. Structure and evolution of the *rp1* complex conferring rust resistance in maize. **Annual Review Phytopathology**, v. 35, p. 293-310, 1997.
- HULBERT, S.H., BENNETZEN, J.L. Recombination at the *Rp-1* locus of maize. **Molecular and General Genetics**, v.226, p. 377-382, 1991.
- IBGE. **Pesquisa de orçamentos familiares**. Rio de Janeiro, 1994. 336p.
- ISLAM, M.R., SHEPHERD, K.W., MAYO, G.M.E. Screening for spontaneous mutations to susceptibility of genes conferring resistance to rust in flax. **Journal of Genetics and Breeding**, v.43, p. 87-90, 1989.
- JANSEN, R.C. Maximum likelihood in a generalized linear finite mixture model by using the EM algorithm. **Biometrics**, v.49, p. 227-231, 1993.
- JENA, K.K., KHUSH, G.S., KOCHERT, G. Comparative RFLP mapping of a wild rice, *Oryza officinalis*, and cultivate rice, *O. sativa*. **Genome**, v. 37, p. 382-389, 1994.
- JOHANNSEN, W. **Ueber Erbllichkeit in Populationen und in Reinen leinen**. Jena: Gustav Fischer, 1903.
- JOHANNSEN, W. **Elementen der Exakten Erblchkeitslehre**. Jena: Gustav Fischer, 1926.
- JOHNSON, E., MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., MARTINEZ-CRUZADO, J.C. Coupling and repulsion phase RAPDs for marker-assisted selection of the PI 181996 rust resistance in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 90, p. 659-664. 1995.
- JONES, D.A., THOMAS, C.M., HAMMOND-KOSACK, K.E., BALINT-KURTI, P.J., JONES, J.D.G. Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to

- Cladosporium fulvum* by transposon tagging. **Science**, v. 266, p. 789-792, 1994.
- JUNG, G., COYNE, D.P., SKROCH, P.W., NIENHUIS, J., ARNAUD-SANTANA, E., BOKOSI, J., KAEPLER, M., STEADMAN, J.R. Construction of a genetic linkage map and locations of common blight, rust resistance and pubescence loci in *Phaseolus vulgaris* L. using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 37, p. 37-38, 1994.
- 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. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v. 106, p. 601-604, 1981. v. 121, p. 794-803, 1996.
- KANASIN, V., MAREK, L. F., SHOEMAKER, R. C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 93, p. 11746-11750, 1996.
- 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, 1998.
- 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 of the Bean Improvement Cooperative**, v. 37, p. 15-16, 1994.
- KEMPTHORNE, O. **An introduction to the genetic statistics**. New York: John Wiley, 1966. 545p.
- KESSELY, R.V., PARAN, I., MICHELMORE, R.W. **Genetic linkage map of lettuce (*Lactuca sativa*, 2n=18)**. In: O'BRIEN, S.J. (Ed.) Genetic maps. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 1990. p. 6100-6102.
- KIANIAN, S.F., QUIROS, C.F. Generation of a *Brassica oleracea* composite RFLP map: linkage arrangements among various populations and evolutionary implications **Theoretical and Applied Genetics**, v. 84, p. 544-554, 1992.
- KIJAS, J.M.H., FOWLER, J.C.S., THOMAS, M.R. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. **Genome**, v. 38, p. 349-355, 1995.
- KISS, G.B., CSANÁDI, G., KÁLMÁN, K., KALÓ, P. OKRÉSZ, L. Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers **Molecular and General Genetics**, v. 238, p. 129-137, 1993.
- KLEINHOF, A., KILIAN, A., SAGHAI MAROOF, M.A., BIYASHEV, R.M., HAYES, D., CHEN, F.Q., LAPITAN, N., FENWICK, A., BLAKE, T.K., KANASIN, V., ANANIEV, E., DAHLEEN, L. KUDRNA, D. BOLLINGER, J., KNAPP, S.J., LIU, B., SORRELLS, M., HEUN, M., FRANCKOWIAK, J.D.,

- HOFFIMAN, D. SKADSEN, R., STEFFENSON, B.J. A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 86, p. 705-712, 1993.
- KLEIN-LANKHORST, R.M., RIETVELD, P., VERKERK, R., WEIDE, R., GEBHARDT, C., KOORNNEEF, M., ZABEL, P. RFLP markers linked to root knot nematode resistance gene *Mi* in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 81, p. 661-667, 1991a.
- KLEIN-LANKHORST, R.M., VERMUNT, A., WEIDE, R., LIHARSKA, TL, ZABEL, P. Isolation of molecular markers for tomato (*Lycopersicon esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 83, p. 108-114, 1991b.
- KOENIG, R., GEPTS, P. Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centers of diversity. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 78, p. 809-817, 1989.
- KOSAMBI, D. D. The estimation of map distances from recombination values. **Annual Eugenic**, v. 12, p. 172-175, 1994.
- KYLE, M.M., DICKSON, M.H., PROVVIDENTI, R. Linkage analysis of hypersensitive resistance to four viruses in *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 29, p. 80-81, 1986.
- LAMPRECHT, H. Weitere Kopplungsstudien an *Phaseolus vulgaris* Mit Einer Übersicht Über Die Koppelungsgruppen. **Agr. Horticultural Genetics**, v. 19, p. 319-332, 1961a.
- LAMPRECHT, H. Die Vererbung Eines *Phaseolus* - Typs Mit Drei Kotyledon Sowie Über Die Wirkung von Drei Neuen Genen. **Agr. Horticultural Genetics**, v. 19, p. 333-343, 1961b.
- LANDER, E., GREEN, P., ABRAHAMSON, J., BARLON, A., DALEY, M., LINCOLN, S., NEWBURG, L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkages maps of experimental and natural populations. **Genomics**, v. 1, p. 174-181, 1987.
- LANDRY, B.S., HUBERT, N., ETOH, T., HARADA, J.J., LINCOLN, S.E. A genetic map for *Brassica oleracea* based on RFLP markers detected with expressed DNA sequences and mapping of resistance genes to race 2 of *Plasmodiophora brassicae* (Woronin). **Genome**, v. 35, p. 409-420, 1992.
- LANZA, M.A., PAULA JR., T.J., VINHADELLI, W.S., MORANDI, M.A.B., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Resistência à antracnose em cultivares de feijoeiro-comum recomendadas para Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 560-562, 1997.
- LAWRENCE, G.L., FINNEGAN, E.J., AYLIFFE, M.A., ELLIS, J.G. The L6 gene for flax rust resistance is related to the Arabidopsis bacterial resistance gene RPS2 and the tobacco viral resistance gene N. **Plant Cell**, v. 7, p. 1195-1206, 1995.

- LEAKEY, C.L.A. **Genotypic and phenotypic markers in common bean.** In: GEPTS, P. (Ed.). Genetic resources of *Phaseolus* beans. Dordrecht, Holland: Kluwer Academic. 1988. p. 245-327.
- LI, C.C. **Path analysis - a primer.** Boxwood: Pacific Grove, 1975. 346p.
- LINCOLN, S., DALY, M., LANDER, E. **Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP 3.0.** 3 ed. s.l., Whitehead Institute, Technical Report, 1992.
- LINDGREN, D.T., ESCRIDGE, K.M., STEADMAN, J.R., SCHAAF, D.M. A model for dry bean yield loss due to rust. **Hort Technology**, v. 5, p. 35-37, 1995.
- LITT, M., LUTH, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal Human Genetic**, v. 44, p. 398-401, 1989.
- MARTIN, G.B., WILLIAMS, J.G.K., TANKSLEY, S.D. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 88, p. 2336-2340, 1991.
- MASTENBROCK, C. A breeding programme for resistance in dry shell haricot beans based on a new gene. **Euphytica**, v. 9, p. 177-185, 1960.
- MAYO, G.M.E., SHEPHERD, K.W. Studies of genes controlling specific host-parasite interactions in flax and its rust. I fine structure analysis of the *M* group in the host. **Heredity**, v.44, p. 211-227, 1980.
- MCCLEAN, P., EWING, J., LINCE, M., GRAFTON, K. Development of a RAPD map of *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 37, p. 79-80, 1994.
- MEINERS, J.P. Genetics of disease resistance in edible legumes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 19, p. 189-209, 1981.
- MEKSEM, K., LEISTER, D., PELEMAN, J., ZABEAU, M., SALAMINI, F., GEBHARDT, C. A high-resolution map of the vicinity of the R1 locus on chromosome V potato based on RFLP and AFLP markers. **Molecular and General Genetics**, v. 249, p. 74-81, 1995.
- MELCHINGER, A.E. Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. **Plant Breeding**, v. 104, p. 1-19, 1990.
- MENDEL, G. **Experiments on plant hybrids.** In: STERN, C., SHERWOOD, E.R. (Eds.). The origin of genetics. San Francisco: W.F. Freeman. 1865. p.1-48.
- MICHELMORE, R.W., PARAN, I., KESSELLI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 88, p. 9828-9832, 1991.

- MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., KELLY, J.D. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, p. 745-749, 1993.
- MIKLAS, P.N., DELORME, R., STONE, V., URREA, C.A., BEAVER, J.S., STEADMAN, J.R. A RAPD map of disease resistance traits in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 41, p. 93-94, 1998.
- MONTGOMERY, D.C., PECK, E.A. **Introduction to linear regression analysis**. New York: John Wiley & Sons, 1981. 504p.
- MORGANTE, M., OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v. 3, p. 175-182, 1993.
- MUEHLBAUER, G.J., STASWICK, P.E., SPECHT, J.E., GRAEF, G.L., SHOEMAKER, R.C., KEIM, P. RFLP mapping using near-isogenic lines in the soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 81, p. 189-198, 1991.
- MUHALET, C.S., ADAMS, M.W., SAETTLER, A.W., GHADERI, G. Genetic system for the reaction of field beans to Beta, Gamma and Delta races of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v. 106, p. 601-604, 1981.
- MULLIS, K., FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 55, p. 335-350, 1987.
- NAGATA, R.T., BASSETT, M.J. Linkage relationship of nine induced mutants in common bean. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v. 109, p. 517-519, 1984.
- NIENHUIS, J., HELENTJARIS, T., SLOCUM, M., RUGGERO, B., SCHAEFER, A. Restriction fragment length polymorphism analysis of loci associated with insect resistance in tomato. **Crop Science**, v. 27, p. 797-803, 1987.
- NIETSCHKE, S. **Identificação de raças de *Phaeoisariopsis griseola* e determinação de fontes de resistência em *Phaseolus vulgaris***. Viçosa, MG: UFV, 1997. 47p. (Dissertação Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- NODARI, R.O., TSAI, S.M., GILBERTSON, R.L., GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean. 2. Development of an RFLP-based linkage map **Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, p. 513-520, 1993.
- OSBORN, T.C., ALEXANDER, D.C., WILLIAMS, B. Identification of restriction fragment length polymorphism linked to genes controlling soluble solids content in tomato fruit. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 73, p. 350-356, 1987.
- PACHICO, D. **Trends in world common bean production**. In: SCHWARTZ, H.F., PASTOR-CORRALES, M.A. (Eds.). *Bean production problems in the tropics*. Cali, Colômbia: CIAT. 1989. p. 1-8.

- PARAN, I., KESSELI, R., MICHELMORE, R. Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. **Genome**, v. 34, p. 1021-1027, 1991.
- PARK, S.J., TU, J.C. Association between BCMV resistant *I* gene and eye color of cv. Steuben. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 29, p. 4-5, 1986.
- PARK, S.O., COYNE, D.P., STEADMAN, J.R. (1999). Molecular markers to the *Ur-7* gene conferring specific resistance to rust in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 42, p. 31-32, 1999.
- 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, Colombia: CIAT. 1992. p. 240-250. (Doc. de trabajo nº 113).
- PASTOR-CORRALES, M., ERAZO, O. Inheritance of anthracnose resistance in common bean accession G2333. **Plant Disease**, v. 78, p. 959-962, 1994.
- PATERSON, A.H. **Genome mapping in plants**. San Diego: Academic Press, 1996. 330p.
- PATERSON, A.H., DAMN, S., JAD, J.D., ZAMIR, D., RABINOWITZ, H.D., LINCOHN, S.E., LANDER, E. e TANKSLEY, S.D. Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments. **Genetics**, v. 127, p. 181-197, 1991.
- 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: Editora UFV. 1998. p. 375-433.
- PELOSO, M.J., CARDOSO, A., VIEIRA, C., SARAIVA, L.S., ZIMMERMAN, M.J.O. Genetic system for the reaction of *Phaseolus vulgaris* to the BA-2 (alpha) race of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Revista Brasileira de Genética**, v. 12, p. 313-318, 1989.
- PELTIER, D., FARCY, E., DULIEU, H., BERVILLÉ, A. Origin, distribution and mapping of RAPD markers from wild *Petunia* species in *Petunia hybrida* hort lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, p. 637-645, 1994.
- PEREIRA, M.G., LEE, M., BRAMEL, COX, P., WOODMAN, W., DOEBLEY, J., WHITKUS, R. Construction of an RFLP map in sorghum and comparative mapping in maize. **Genome**, v. 37, p. 236-243, 1994.
- PEREIRA, M.G., AHNERT, D., LEE, M. e KLIER, K. Genetic mapping of quantitative trait loci for panicle characteristics and seed weight in sorghum. **Revista Brasileira de Genética**, v. 18, p. 249-257, 1995.
- 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.
- PRAKKEN, R. Inheritance of colour in *Phaseolus vulgaris* L. II. Critical review. **Meded. Landbouwhogeschool Wageningen**, v. 70, p. 1-38, 1970.
- PRAKKEN, R. Inheritance of colour in *Phaseolus vulgaris* L. III. On genes for red seed coat colour and a general synthesis. **Meded. Landbouwhogeschool Wageningen**, v. 72, p. 1-82, 1972.
- PRAKKEN, R. Inheritance of colour in *Phaseolus vulgaris* L. IV. Recombination within the 'complex locus C'. **Meded. Landbouwhogeschool Wageningen**, v. 74, p. 1-36, 1974.
- PRINCE, J.P., POCHARD, E., TANKSLEY, S.D. Construction of a molecular linkage map of pepper and a comparison of synteny with tomato. **Genome**, v. 36, p. 404-417, 1993.
- PRYOR, T. The origin and structure of fungal disease resistance genes in plants. **Trends in Genetics**, v.3, p. 157-161, 1987.
- PRYOR, T., ELLIS, J. The genetic complexity of fungal resistance genes in plants. **Advances in Plant Pathology**, v. 10, p. 281-305, 1993.
- RAMALHO, M.A.P., ABREU, A.F.B. **Cultivares**. In: VIEIRA, C, PAULA JR., T.J.; BORÉM, A. (eds.). Feijão - Aspectos gerais e cultura no estado de minas. Viçosa, UFV, 1998. p. 435-449.
- 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.
- REITER, R.S., WILLIAMS, J.G.K., FELDMANN, K.A., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V., SCOLNIK, P.A. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 89, p. 1477-1481, 1992.
- RODER, M.S., PLASCHKE, J., KONIG, S.U., BORNER, A., SORRELLS, M.A., TANKSLEY, S.D., GANAL, M.W. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. **Molecular and General Genetics**, v. 246, p. 327-333, 1995.
- RONGWEN, J., AKKAYA, M.S., BHAGWAT, A.A., LAVI, U., CREGAN, P.B. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 90, p. 43-48, 1995.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOEFFEL, S., SHCARF, S.J., HIGUCHI, G., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

- SANTOS, M.X. **Estudo do potencial genético de duas raças brasileiras de milho (*Zea mays* L.), para fins de melhoramento.** Piracicaba: USP/ESALQ, 1985. 185p. (Tese de Doutorado). USP/ESALQ, 1985.
- 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.
- SARFATTI, M., KATAN, J., FLUHR, R., ZAMIR, D. An RFLP marker in tomato linked to the *Fusarium oxysporum* resistance gene *I2*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 78, p. 755-759, 1989.
- SARTORATO, A., NIETSCHE, S., BARROS, E.G., 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, 1999a.
- SARTORATO, A., NIETSCHE, S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. SCAR marker linked to angular leaf spot resistance gene in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 42, p. 23-24, 1999b.
- SAXENA, K.M.S., HOOKER, A.L. On the structure of a gene for disease resistance in maize. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.61, p. 1300-1305, 1968.
- SAYLER, R.J., EWING, J.D., MCCLEAN, P.E. Monogenic and epistatic resistance to bean rust infection in common bean. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 47, p. 173-184, 1995.
- SCHUMANN, K., BAUMANN, A., NÄGL, W. Localization of phaseolin genes in the polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus* (Leguminosae). **Genetica**, v. 83, p. 73-76, 1990.
- SHEPHERD, K.W., MAYO, G.M.E. Genes conferring specific plant disease resistance. **Science**, v.175, p. 375-380, 1972.
- SHOEMAKER, R.C. **RFLP map of soybean.** In: PHILLIPS, R.L., VASIL, I.K. (Eds.). DNA - based markers in plants. Kluwer Academic Publishers. 1994. p.2990-3009.
- SINGH, S.P. Patterns of variation in cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Econ. Bot.**, v. 43, p. 39-57, 1989.
- SINGH, S.P., GUTIÉRREZ, J.A., MOLINA, A., URREA, C., GEPTS, P. Genetic diversity in cultivated common bean. II. Marker-based analysis of morphological and agronomic traits. **Crop Science**, v. 31, p. 23-29, 1991a.
- SINGH, S.P., NODARI, R., GEPTS, P. Genetic diversity in cultivated common bean. I. Allozymes. **Crop Science**, v. 31, p. 19-23, 1991b.

- SLOCUM, M.K., FIGDORE, S.S., KENNARD, E.C., SUZUKI, J.Y., OSBORN, T.C. Linkage arrangement of restriction fragment length polymorphism loci in *Brassica oleracea*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 80, p. 57-64, 1990.
- SMITH, D.N., DEVEY, M.E. Occurrence and inheritance of microsatellites in *Pinus radiata*. **Genome**, v. 37, p. 977-983, 1994.
- SNEATH, P.H.A. e SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy**. San Francisco: Freeman. 1973.
- STASKAWICZ, B.J., AUSUBEL, F.M., BAKER, B.J. et al. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, v. 268, p. 661-667, 1995.
- STAVELY, J.R. Genetic relationships of resistance in two broadly rust resistant beans. **Phytopathology**, v. 74, p. 834, 1984a. (Abstract).
- 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., PASTOR-CORRALES, M.A. **Roya**. In: PASTOR-CORRALES, M.A., SCHWARTZ, H.F. (Eds.) Problemas de producción del frijol en los tropicos. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1994. p. 185-225.
- STAVELY, J.R., FREYTAG, G.F., STEADMAN, J.R., SCHWARTZ, H.F. (1983). The 1983 Bean Rust Workshop. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 26, p. iv-vi, 1983.
- STAVELY, J.R., STEINKE, J., McMILLAN, R.T., GRAFTON, K.F., STEADMAN, J.R., KELLY, J.D., COYNE, D.P., LINDGREN, D.T., SILBERNAGEL, M.J. Rust resistant bean germplasm releases. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 35, p.228-229, 1992.
- 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.
- STAVELY, J.R., KELLY, J.D., GRAFTON, K.F., MULLINS, C.A., STRAW, A., McMILLAN, R.T., BEAVER, J.S., MIKLAS, P.N., STEINKE, J., STEADMAN, J.R., COYNE, D.P., LINDGREN, D.T., SILBERNAGEL, M.J. Rust resistant bean germplasm releases 1994-1996. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 40, p.120-121, 1997.
- STROMBERG, L.D., DUDLEY, J.W., RUFENER, G.K. Comparing conventional early generation selection with molecular marker assisted selection in maize. **Crop Science**, v. 34, p. 1221-1225, 1994.
- SUDUPAK, M.A., BENNETZEN, J.L., HULBERT, S.H. Unequal exchange and meiotic instability of disease resistance genes in the Rp1 region of maize. **Genetics**, v. 133, p. 119-125, 1993.

- TANKSLEY, S.D., NELSON, J.C. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTL's from unadapted germplasm into elite breeding lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, p. 191-203, 1996.
- TANKSLEY, S.D., MEDINA-FILHO, H., RICK, C.M. Use of naturally occurring enzyme variation to detect and map genes controlling quantitative traits in an interspecific backcross of tomato. **Heredity**, v. 49, p. 11-25, 1982.
- TANKSLEY, S.D., BERNATZKY, R., LAPITAN, N.L., PRINCE, J.P. Conservation of gene repertoire but not gene order in pepper and tomato. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 85, p. 6419-6423, 1988.
- TANKSLEY, S.D., YOUNG, N.D., PATERSON, A.H., BONIERBLE, M.W. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Bio/Technology**, v. 7, p. 257-264, 1989.
- TANKSLEY, S.D., GANAL, M.W., PRINCE, J.P., VICENTE, M.C., BONIERBALE, M.W., BROUN, P., FULTON, T.M., GIOVANNONI, J.J., GRANDILLO, S., MARTIN, G.B., MESSEGUER, R., MILLER, J.C., MILLER, L., PATERSON, A.H., PINEDA, O., RODER, M.S., WING, R.A., WU, W., YOUNG, N.D. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics**, v. 132, p. 1141-1160, 1992.
- TEMPLE, S.R., MORALES, F.J. Linkage of dominant hypersensitive resistance to bean common mosaic virus to seed color in *Phaseolus vulgaris* L. **Euphytica**, v. 35, p. 331-333, 1986.
- TORRES, A.M., WEEDEN, N.F., MARTÍN, A. Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, p. 937-945, 1993.
- VALLEJOS, C.E., CHASE, C.D. Linkage between isozyme markers and a locus affecting seed size in *Phaseolus vulgaris* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 81, p. 413-419, 1991a.
- VALLEJOS, C.E., CHASE, C.D. Extended linkage map for the phaseolin linkage group of *Phaseolus vulgaris* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 82, p. 353-357, 1991b.
- VALLEJOS, C.E., SAKIYAMA, N.S., CHASE, C.D. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. **Genetics**, v. 131, p. 733-740, 1992.
- VAN DER PLANK, J.E. **Plant diseases: Epidemics and control**. Academic Press: New York. 1963. 349p.
- VAN SCHOONHOVEN, A., PASTOR-CORRALES, M.A. (Comps.). **Standard system for evaluation of bean germplasm**. Cali, Colombia: CIAT, 1987. 54p.
- VASCONCELOS, M.J., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A., VIEIRA, C. Genetic diversity of the common bean *Phaseolus vulgaris* L. Determined by DNA-based molecular markers. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, p. 447-451, 1996.

- VENCOVSKY, R, BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**.  
Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 496p.
- VIDIGAL, C.G. **Herança da resistência às raças Alfa, Delta e Capa de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib. no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Viçosa, MG: UFV, 1994. 52p. (Tese de Doutorado).  
Universidade Federal de Viçosa, 1994.
- VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa, U.F.V: Imprensa  
Universitária. 1983. p. 71-82.
- VIEIRA, C., ARAÚJO, G.A.A., CRUZ, C.D. **Comportamento de cultivares de feijão no plantio de outono/inverno**. In: VIEIRA, R.F. (Ed.). Projeto Feijão -  
Relatório 88/92. Viçosa: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas  
Gerais - EPAMIG. 1992. p. 71-76.
- VIEIRA, C. , PAULA Jr, T.J., BORÉM, A (eds.). **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas Gerais**. Viçosa: Editora UFV. 1998. 596p.
- VIEIRA, C, BORÉM, A., RAMALHO, M.A.P. **Melhoramento do feijão**. In:  
BORÉM, A. (Ed.). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: Editora  
UFV. 1999. p. 273-349.
- VINHADELLI, W.S., FALEIRO, F.G., MESQUITA, A.G.G., PAULA JR., T.J.,  
CARVALHO, G.A. BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. (1997). Inoculação  
simultânea dos fungos causadores da ferrugem e da antracnose do  
feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 319-320, 1997. Supplement.
- VOS, P. HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., LEE, T.V., HORNES, M.,  
FRITERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M., ZABEAU, M. AFLP: a new  
technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407-  
4414, 1995.
- WEEDEN, N.F., LIANG, C.Y. Detection of a linkage between white flower color  
and *EST-2* in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement  
Cooperative**, v. 28, p. 87-88, 1985.
- WEEDEN, N.F., MUEHLBAUER, F.J., LADIZINSKY, G. Extensive conservation  
of linkage relationships between pea and lentil genetic maps. **Journal of  
Heredity**, v. 83, p. 123-129, 1992.
- WILLIAMS, The avaluation of a selection index. **Biometrics**, v. 18, p. 375-393,  
1962.
- WILLIAMS, J.G., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V.  
DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic  
markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- WHITKUS, R., DOEBLEY, J., LEE, M. Comparative genome mapping of  
*Sorghum* and Maize. **Genetics**, v. 132, p. 1119-1130, 1992.

- WHITHAM, S., DINESH-KUMAR, S.P., CHOI, D., HEHL, R., CORR, C., BAKER, B. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to Toll and the interleukin-1 receptor. **Cell**, v. 78, p. 1101-1115, 1994.
- WORDRAGEN, M.F., WEIDE, R.L., COPPOOLSE, E., KOORNNEEF, M., ZABEL, P. Tomato chromosome 6: a high resolution map of the long arm and construction of a composite integrated marker-order map. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, p. 1065-1072, 1996.
- WRIGHT, S. Correlation and causation. **Journal of Agricultural Research**, v.20, p.557-585, 1921.
- YOUNG, R.A., KELLY, J.D. RAPD markers flanking the *Are* gene for anthracnose resistance in common bean. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v. 121, p. 37-41, 1996.
- YOUNG, N.D., ZAMIR, D., GANAL, M.W., TANKSLEY, S.D. Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the *Tm-2a* gene in tomato. **Genetics**, v. 120, p. 579-585, 1988.
- 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.
- YOUNG, R.A., MELOTTO, M., NODARI, R.O., KELLY, J.D. Marker assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in common bean cultivar, G2333. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96, p. 87-94, 1998.
- YU, K., PAULS, K.P. Segregation of random amplified polymorphic DNA markers and strategies for molecular mapping in tetraploid alfalfa. **Genome**, v. 36, p. 844-851, 1993.
- YU, Z.H., MACKILL, D.J., BONMAN, J.M., TANKSLEY, S.D. Tagging genes for blast resistance in rice via linkage to RFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 81, p. 471-476, 1991.
- YU, Y.G., BUSS, G.R., MAROOF, M.A.S. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. **Proceedure of National Academy of Science USA**, v. 93, p. 11751-11756, 1996.
- ZABEAU, M. **Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting**. European Patent Application N<sup>o</sup> 0534858 A1. 1993.
- 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.

ZENG, Z.B. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 90, p. 10972-10976, 1993.

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

ZHAO, X.P., KOCHERT, G. Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC)<sub>n</sub> microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Molecular Biology**, v. 21, p. 607-614, 1993.

## APÊNDICE

Quadro 1A - Caracterização das 154 RIL's e dos progenitores Ouro Negro (ON) e Rudá com base em diferentes características morfológicas

RIL's e Progenitores	Cor do hipocótilo	Cor da flor	Cor do cotilédone	Cor da lista da semente	Hábito de crescimento	Cor do tegumento	Tipo de grão
1	2	2	2	2	2	3	4
2	2	2	2	2	1	2	3
3	2	2	2	2	2	3	4
4	1	1	1	1	1	3	2
5	1	1	1	1	1	3	2
6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	2,5	3,2
7	1	1	1	1	1	1	1
8	2	2	2	2	2	3	4
9	2	2	2	2	2	3	4
10	1	1	1	1	2	3	2
11	1	1	1	1	1	3	2
12	2	2	2	2	2	2	3
13	1	1	1	1	1	3	2
14	2	2	2	2	1	3	4
15	2	2	2	2	2	3	4
16	2	2	2	2	1	3	4
17	1	1	1	1	2	1	1
18	2	2	2	2	2	2	3
19	1	1	1	1	2	1	1
20	1	1	1	1	1	1	1
21	1	1	1	1	1	3	2
22	1	1	1	1	1	3	2
23	1	1	1	1	1	3	2
24	1	1	1	1	2	3	2
25	1	1	1	1	1	1	1
26	1	1	1	1	1	3	2
27	1	1	1	1	1	1	1
28	2	2	2	2	1	2	3
29	1	1	1	1	2	1	1
30	1	1	1	1	2	3	2
31	2	2	2	2	1	3	4
32	1	1	1	1	1	3	2
33	1	1	1	1	2	3	2
34	1	1	1	1	2	3	2
35	1	1	1	1	1	1	1
36	2	2	2	2	1	2	3
37	1	1	1	1	1	3	2
38	1	1	1	1	2	1	1
39	1	1	1	1	1	1	1
40	2	2	2	2	2	2	3
41	2	2	2	2	1	2	3
42	1	1	1	1	1	1	1
43	1	1	1	1	2	1	1
44	2	2	2	2	1	2	3
45	2	2	2	2	1	2	3
46	1	1	1	1	1	3	2
47	2	2	2	2	1	3	4
48	2	2	2	2	2	2	3
49	1	1	1	1	2	2,5	1,5
50	2	2	2	2	2	2	3
51	1	1	1	1	1	1	1
52	1	1	1	1	1	1	1
53	2	2	2	2	2	2	3
54	1	1	1	1	1	3	2
55	1	1	1	1	2	1	1
56	1,5	1,5	1,5	1,5	2	1,5	2,5
57	1	1	1	1	2	1	1
58	2	2	2	2	2	3	4
59	2	2	2	2	2	3	4
60	1	1	1	1	1	3	2
61	1	1	1	1	1	3	2
62	1	1	1	1	1	1	1
63	1	1	1	1	1	3	2
64	1	1	1	1	2	1	1

Continua...

Quadro 1 A - Cont.

RIL's e Progenitores	Cor do hipocótilo	Cor da flor	Cor do cotilédone	Cor da lista da semente	Hábito de crescimento	Cor do tegumento	Tipo de grão
66	1	1	1	1	2	3	2
65	2	2	2	2	2	2	3
67	2	2	2	2	1	2	3
68	2	2	2	2	1	2	3
69	1	1	1	1	2	1	1
70	1	1	1	1	1	1	1
71	1	1	1	1	1	3	2
72	1,5	1,5	1,5	1,5	1	3	3,2
73	2	2	2	2	1	2	3
74	1	1	1	1	1	1	1
75	1	1	1	1	2	3	2
76	1	1	1	1	2	3	2
77	1	1	1	1	1	3	2
78	1	1	1	1	2	1	1
79	2	2	2	2	2	2,5	3,5
80	1	1	1	1	2	1	1
81	2	2	2	2	1	2,5	3,5
82	1	1	1	1	1	3	2
83	1	1	1	1	2	3	2
84	1	1	1	1	1	1	1
85	2	2	2	2	1	2,5	3,5
86	1	1	1	1	1	1	1
87	1	1	1	1	1	3	2
88	1	1	1	1	2	2,5	1,5
89	1	1	1	1	1	3	2
90	1	1	1	1	2	3	2
91	2	2	2	2	2	2	3
92	1	1	1	1	1	1	1
93	2	2	2	2	1	3	4
94	2	2	2	2	1	2	3
95	1	1	1	1	1	1	1
96	1	1	1	1	1	1	1
97	2	2	2	2	1	2,5	3,5
98	1	1	1	1	2	3	2
99	2	2	2	2	2	3	4
100	2	2	2	2	2	3	4
101	2	2	2	2	2	2	3
102	2	2	2	2	1	2	3
103	1	1	1	1	2	3	2
104	2	2	2	2	2	3	4
105	1	1	1	1	1	1	1
106	2	2	2	2	1	2	3
107	1	1	1	1	1	1	1
108	2	2	2	2	1	3	4
109	1	1	1	1	1	1	1
110	2	2	2	2	2	2	3
111	1	1	1	1	2	3	2
112	2	2	2	2	2	3	4
113	2	2	2	2	2	2	3
114	1	1	1	1	1	1	1
115	1	1	1	1	1	1	1
116	1	1	1	1	2	1	1
117	1	1	1	1	2	1	1
118	1	1	1	1	2	3	2
119	2	2	2	2	2	2	3
120	2	2	2	2	2	3	4
121	1	1	1	1	2	3	2
122	1	1	1	1	2	3	2
123	2	2	2	2	1	2	3
124	1	1	1	1	1	1	1
125	2	2	2	2	1	2	3
126	1	1	1	1	2	1	1
127	1	1	1	1	2	3	2
128	1	1	1	1	2	1	1

Continua...

Quadro 1 A - Cont.

RIL's e Progenitores	Cor do hipocótilo	Cor da flor	Cor do cotilédone	Cor da lista da semente	Hábito de crescimento	Cor do tegumento	Tipo de grão
129	1	1	1	1	2	1	1
130	1	1	1	1	2	3	2
131	2	2	2	2	2	2	3
132	1	1	1	1	1	3	2
133	1	1	1	1	1	1	1
134	1	1	1	1	1	1	1
135	2	2	2	2	2	2	3
136	1	1	1	1	1	3	2
137	2	2	2	2	1	2	3
138	1	1	1	1	2	1	1
139	1	1	1	1	2	1	1
140	1	1	1	1	2	3	2
141	1	1	1	1	2	1	1
142	1	1	1	1	2	2,5	1,5
143	2	2	2	2	1	3	4
144	2	2	2	2	2	3	4
145	1	1	1	1	1	3	2
146	1	1	1	1	2	1	1
147	1	1	1	1	1	3	2
148	1	1	1	1	2	1	1
149	2	2	2	2	2	2	3
150	1	1	1	1	1	1	1
151	1	1	1	1	2	1	1
152	2	2	2	2	2	2	3
153	2	2	2	2	2	2	3
154	2	2	2	2	1	3	4
Ouro Negro	1	1	1	1	1	1	1
Rudá	2	2	2	2	2	3	4

CÓDIGOS:

Cor do hipocótilo (1-roxo; 2-verde; 1,5-segregante)

Cor da flor (1-roxa; 2-branca; 1,5-segregante)

Cor do cotilédone (1-Arroxeadado; 2-verde; 1,5-segregante)

Cor da lista da semente (1-preta; 2-marrom; 1,5-segregante)

Hábito de crescimento (1- IIIb; 2-IIIa; 1,5-segregante)

Cor do tegumento (1-preto; 1,5-marrom/preto; 2-marrom; 2,5-creme/preto; 3-creme)

Tipo de grão (1-preto; 1,5-carioca preto/preto; 2-carioca preto; 2,5-mulatinho/preto; 3-mulatinho; 3,2-carioca/carioca preto; 3,5-carioca/mulatinho; 4-carioca)

Quadro 2A - Caracterização das 154 RIL's e dos progenitores Ouro Negro (ON) e Rudá com base em diferentes características quantitativas

RIL's e Progenitores	FLOR	MAT	VAPLA	P100	SEPLA	SEVAG	PRPLA	PRVAG
1	40,75	92,25	18,23	17,71	90,8	4,95	16,512	0,879
2	41	93	16,52	21,27	82,67	4,989	17,659	1,063
3	40,5	93,75	12,26	19,32	57,29	4,657	11,11	0,901
4	40,25	95,25	12,37	23,91	60,5	4,854	14,387	1,159
5	40	94,75	17,81	21,3	91,07	5,111	19,303	1,09
6	40,5	94	14,7	19,55	67,87	4,623	13,31	0,903
7	41	93,5	16,34	18,93	79,05	4,854	14,971	0,919
8	40	93	15,03	21,69	53,9	5,417	11,741	0,783
9	42,5	96,25	12,89	21	65,06	5,069	13,639	1,065
10	41	94,25	23,12	15,61	115,93	5,023	18,123	0,784
11	40,75	96	19,83	18,87	89,23	4,471	16,863	0,844
12	42	96	14,58	16,58	77,95	5,316	12,949	0,882
13	43,25	94,5	15,58	19,09	76,06	4,891	14,514	0,933
14	40,5	93	16,1	20,29	70,82	4,381	14,542	0,89
15	42	94,75	18,11	17,85	96,62	5,327	17,13	0,951
16	41,75	92,75	18,63	20,09	91,13	4,729	18,907	0,954
17	46,5	99,75	16,12	16,55	75,86	4,702	12,565	0,778
18	40,5	95,75	18,3	19,37	81,58	4,467	15,837	0,865
19	46,5	96,75	16,88	15,47	85,76	5,063	13,159	0,783
20	43,75	96,75	13,67	19,25	64,95	4,79	12,543	0,921
21	42,25	96	17,21	18,97	88,27	5,128	16,755	0,975
22	41	93,75	14,03	21,54	67,59	4,803	14,682	1,036
23	41,5	95,25	16,71	18,37	83,98	5,04	15,307	0,925
24	42,5	96,5	12,94	19,36	63,94	5,033	12,362	0,975
25	41	94,75	17,81	20,85	88,98	4,981	18,662	1,039
26	41,5	92,25	12,63	18,39	62,7	4,987	11,518	0,918
27	41,25	96	14,38	20,73	71,19	4,963	14,741	1,03
28	40,25	95,25	16,67	17,8	82,06	4,946	14,571	0,883
29	42,25	95,75	16,16	16,92	80,24	4,952	13,587	0,838
30	44,5	97	15,51	18,88	77,12	4,963	14,542	0,936
31	43,5	97,25	17,71	18,94	80,64	4,551	15,278	0,863
32	44	97	12,09	18,88	60,13	4,947	11,292	0,932
33	41,25	94,75	16,12	19,5	84,56	5,23	16,419	1,017
34	41,75	96,75	13,61	20,1	66,97	4,919	13,382	0,986
35	41,75	95,5	16,61	19,04	79,78	4,801	15,172	0,916
36	44,5	99	19,51	17,46	104,68	5,37	18,319	0,937
37	40	92,75	16,85	20,53	69,25	4,203	14,27	0,862
38	40	92,25	18,1	21,49	87,39	4,843	18,826	1,041
39	42	95,75	11,26	22,59	55,63	4,933	12,471	1,114
40	45,75	100,25	17,97	17,53	86,6	4,831	15,154	0,846
41	45,25	99,5	17,4	19,2	82,61	4,751	15,743	0,911
42	40,25	96	18,64	19,97	87,35	4,696	17,315	0,938
43	41	96,25	15,41	22,3	73,17	4,783	16,236	1,066
44	41,25	95,75	18,56	19,5	91,95	4,96	17,961	0,967
45	41,75	95,75	19,47	19,04	95,27	4,895	18,345	0,931
46	40,75	92,75	15,11	17,59	76,77	5,072	13,569	0,893
47	42	97,5	14,48	22,66	63,82	4,363	14,528	0,992
48	41,25	95,25	18	19,32	86,11	4,787	16,641	0,925
49	44	98	17,26	18,49	81,67	4,734	14,996	0,876
50	42	95,25	17,72	16,83	72,71	4,101	12,171	0,69
51	41	92,75	12,59	18,27	61,25	4,878	11,267	0,892
52	41,5	98,25	22,79	21,6	106,87	4,764	23,119	1,028
53	43,25	98,5	20,15	18,7	93,41	4,673	17,423	0,874
54	41,25	94,5	17,51	18,59	84,8	4,875	15,834	0,906
55	42,5	95	17,35	16,75	89,65	5,17	15,045	0,865
56	43,75	96,5	17,33	19,36	88,89	5,136	17,214	0,994
57	40,25	93	16,94	19,61	96,1	5,649	18,906	1,108
58	40,5	95,25	14,58	22,04	69,11	4,75	15,203	1,046
59	41,25	96,75	13,31	18,73	66,64	5,01	12,496	0,938
60	41,25	96,25	16,18	21,67	77,7	4,803	16,874	1,041
61	40,25	93,25	13,38	17,39	63,83	4,761	11,042	0,827
62	43,25	98,25	21,18	17,77	106,31	5,013	19,003	0,891
63	40,5	92	9,86	20,28	47,42	4,718	9,63	0,957
64	44,5	97,25	17,54	17,83	91,5	5,215	16,36	0,93

Continua...

Quadro 2 A - Cont.

RIL's e Progenitores	FLOR	MAT	VAPLA	P100	SEPLA	SEVAG	PRPLA	PRVAG
65	44,25	96,25	14,3	14,28	77,68	5,399	11,19	0,772
66	44,25	96,5	19,79	17,69	102,73	5,216	18,1	0,923
67	40,75	96,25	18,69	17,94	86,43	4,597	15,648	0,825
68	40,75	95,75	19,41	19,1	93,91	4,836	17,924	0,921
69	45,75	98,5	22,56	16,66	109,92	4,886	18,329	0,813
70	45	96,25	13,92	17,85	71,3	5,017	12,687	0,895
71	43	96	17,3	21,05	85,74	4,962	18,072	1,045
72	42,75	96	19,17	16,86	93,48	4,862	15,839	0,82
73	39,75	91,75	15,37	18,43	78,41	5,11	14,627	0,942
74	42	95,5	20,44	17,88	92,63	4,533	16,527	0,811
75	42,75	96,25	19,8	17,54	106,07	5,259	19,402	0,924
76	42,5	95,75	16,45	16,87	78,78	4,789	13,289	0,807
77	41,75	96,25	14,97	18,28	70,05	4,645	12,682	0,849
78	43	96,75	23,44	18,97	127,46	5,397	24,761	1,022
79	42	95,25	15,25	21,93	77,18	5,063	16,906	1,109
80	40,75	92	11,3	18,67	65,48	5,793	12,153	1,081
81	41,5	95,75	19,77	21,3	89,87	4,539	18,957	0,967
82	40,25	93,75	21,64	22,09	97,82	4,411	21,723	0,975
83	42,75	97	18,02	16,35	89,26	4,956	14,503	0,81
84	43,75	97,75	17,37	15,23	80,41	4,632	12,2	0,705
85	43,25	95,25	14,24	18,62	64,37	4,531	11,941	0,844
86	46	99,5	27,83	13,81	147,4	5,283	20,361	0,73
87	41,75	95	15,64	23,09	83,75	5,281	19,413	1,22
88	40,75	92,5	17,06	18,75	81,12	4,768	15,205	0,894
89	42	94,25	14,05	20,32	73,97	5,233	15,059	1,063
90	44	96,25	15,95	18,07	83	5,197	15,033	0,94
91	44,25	97,5	15,78	16,03	82,46	5,222	13,359	0,839
92	44	99	18,62	18,64	90,09	4,882	16,753	0,911
93	41,25	95,75	16,28	21,77	72,65	4,462	15,725	0,971
94	41,75	94,75	15,03	17,8	74,19	4,936	13,193	0,879
95	40,75	95	17,53	19,44	91,2	5,221	17,682	1,016
96	41,25	95	20,42	18,07	87,55	4,292	15,907	0,776
97	44	97,75	13,16	18,62	65,56	4,985	12,22	0,93
98	45	99	15,24	19,55	78,8	5,165	15,595	1,011
99	41,25	92,5	12,2	18,55	59,65	4,878	11,161	0,907
100	41,5	94,25	13,23	21,53	63,99	4,816	13,834	1,037
101	42,25	96,5	17,71	18,6	77,63	4,387	14,466	0,816
102	41,75	96,25	19,41	20,71	88,01	4,533	18,248	0,94
103	44,75	96,75	14,1	18,8	70,83	5,027	13,333	0,946
104	43,75	98	18,31	18,79	98,91	5,366	18,992	1,01
105	39,5	93	15,56	20,8	74,09	4,769	15,383	0,993
106	46	100	15,65	17,13	78,81	5,046	13,51	0,866
107	40,25	94,75	17,16	20,04	82,95	4,813	16,749	0,966
108	42,5	95	14,16	20,68	70,29	4,961	14,523	1,026
109	40	92	12,43	18,01	60,09	4,822	10,855	0,87
110	42,25	97,75	21,37	19,66	97,64	4,559	19,16	0,896
111	40,25	92,75	10,66	19,83	50,53	4,751	10,045	0,942
112	43,75	96	15,2	17,11	78,73	5,14	13,681	0,881
113	44,5	98,25	17,51	16,93	92,34	5,287	15,595	0,895
114	42,25	95,5	18,07	17,85	88,79	4,913	15,843	0,877
115	40	94,25	16,61	21,11	82,07	4,944	17,4	1,044
116	41,25	97	16,83	17,08	73,52	4,39	12,577	0,749
117	40	95,25	17,35	19,36	87,29	5,052	16,81	0,98
118	44,5	98,75	15,23	17,54	91,12	5,932	16,093	1,038
119	43,25	96	14,63	17,67	76,39	5,205	13,553	0,919
120	41,5	95,75	15,8	22,19	81,13	5,135	18,076	1,144
121	45,25	98,5	13,81	18,43	72,44	5,216	13,405	0,961
122	40	93,25	16,59	18,94	78,91	4,732	15,032	0,898
123	40,5	95,75	17,68	21,46	83,76	4,73	18,011	1,016
124	41,5	95,25	14,01	21,42	66,01	4,678	14,278	1,007
125	40,25	94	20,52	21,52	90,86	4,428	19,543	0,954
126	44,5	97,75	13,13	17,19	65,26	4,869	11,472	0,845
127	42,5	95,75	15,61	20,09	80,7	5,182	16,21	1,042
128	40,75	92	16,25	18,33	78,1	4,805	14,333	0,881
129	42,25	97,25	19,1	19,62	95,6	4,943	19,292	0,972

Continua...

Quadro 2 A - Cont.

RIL's e Progenitores	FLOR	MAT	VAPLA	P100	SEPLA	SEVAG	PRPLA	PRVAG
130	42	94,5	14,36	19,34	71,01	4,962	13,779	0,959
131	44,75	99,25	17,59	19,71	86,56	4,949	17,011	0,974
132	42,25	94,5	16,84	19,82	86,78	5,118	17,044	1,012
133	40	92,5	12,9	18,13	62,59	4,855	11,344	0,88
134	40	92,75	14,53	20,07	68,84	4,747	13,795	0,953
135	45,25	98,5	16,5	18,21	85,93	5,236	15,874	0,952
136	39,5	93	16,53	22,79	70,92	4,317	16,143	0,981
137	40,5	92,75	13,93	18,5	68,14	4,893	12,518	0,905
138	44,5	99,25	18,7	18,19	84,88	4,524	15,442	0,823
139	43,5	96,25	15,78	15,22	75,68	4,805	11,518	0,731
140	42,5	95	14,71	18,62	77,51	5,259	14,43	0,979
141	41,25	95,25	18,25	18,68	88,86	4,872	16,645	0,91
142	40,5	92,75	15,39	21,14	75,09	4,907	15,89	1,037
143	41,75	94,5	15,61	20,88	64,91	4,165	13,581	0,872
144	45	99,5	19,03	18,17	99,31	5,218	18,059	0,948
145	40,25	91,75	13,97	20,75	61,97	4,407	12,987	0,917
146	40,5	94	14,13	20,28	66,19	4,706	13,324	0,953
147	39,75	94,25	16,32	22,5	76,1	4,656	17,231	1,054
148	41,75	98	15,53	18,3	75,85	4,877	13,782	0,892
149	41,5	95,25	16,59	17,77	78,08	4,668	13,916	0,83
150	44,5	98,75	18,31	17,57	89,58	4,892	15,767	0,86
151	42,5	96,25	16,1	17,45	77,78	4,817	13,588	0,84
152	40,5	94,5	16,54	18,75	80,94	4,899	15,185	0,922
153	47	101,25	16,82	15,58	84,87	5,056	13,247	0,787
154	43,75	97,5	17,12	19,42	86,95	5,059	16,764	0,982
Ouro Negro	40,5	92,75	14,4	20,61	70,14	4,849	14,502	1
Rudá	45,75	99,5	18,09	18,47	94,73	5,22	17,451	0,9628

Médias fenotípicas de FLOR (número de dias até o florescimento); MAT (número de dias até a maturação); VAPLA (número médio de vagens por planta); P100 (peso de 100 sementes em grammas); SEPLA (número médio de sementes por planta); SEVAG (número médio de sementes por vagem); PRPLA (produção média por planta em grammas) e PRVAG (produção média por vagem em grammas).

Quadro 3A - Caracterização das 154 RIL's e dos progenitores Ouro Negro (ON) e Rudá com base em características de resistência a diferentes raças fisiológicas de *U. appendiculatus* (F), *C. lindemuthianum* (A), *P. griseola* (M).

RIL's e Progenitores	F 56	F 52	F 49	F 45	F 46	F 47	F 32	A 73	A 81	A 89	M 31.23	M 31.55	M 63.31	M 63.19
1	1	3	3	3	1	5	3	1	1	1	3	5	-	2
2	5	5	6	3	4	5	5	9	9	9	3	6	1	2
3	3	3	3	1	1	3	3	1	2	1	4	1	1	2
4	3	3	3	1	1	1	3	1	1	1	7	1	1	3
5	6	6	6	5	5	5	5	5	9	4	6	6	6	4
6	3	3	3	1	1	1	3	1	1	1	2	6	6	6
7	6	5	6	2	2	5	6	9	9	9	4	6	6	3
8	1	3	3	1	1	1	3	1	1	1	2	5	6	-
9	6	5	6	4	3	6	6	9	9	1	2	6	6	-
10	6	4	6	3	3	6	6	7	9	9	2	5	1	2
11	6	6	6	6	6	6	6	9	7	9	6	1	1	3
12	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	2	6	6	4
13	6	5	6	3,5	3,5	5	5	8	4	8	2	6	6	4
14	6	4,5	3	2	1	3	3	1	1	9	2	1	1	-
15	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	3	6	6	3
16	6	6	6	6	6	5	6	6	5	9	6	1	1	3
17	6	5	6	6	6	6	6	8	9	2	4	6	6	5
18	6	3,5	4	3	6	6	3	1	1	1	8	2	1	2
19	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	6	6	6	5
20	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	2	1	1	2
21	6	6	6	6	6	6	6	9	9	9	6	-	6	2
22	3	3	3	3	1	3	3	1	1	1	4	1	1	3
23	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	7	1	1	3
24	6	4	6	2,5	2,5	5	4	4	4	2	4	6	6	4
25	6	6	6	2	2	6	5	8	4	4	7	1	1	3
26	3	3	3	3	1	3	3	1	1	1	3	1	1	2
27	6	5	6	2	2	5	6	3	4	1	3	5	1	5
28	6	4	6	2	2	5	6	7	9	9	4	6	6	5
29	6	4	6	2,5	2,5	5	6	1	9	5	6	5	6	3
30	6	5	6	6	6	6	6	4	5	1	7	1	1	3
31	6	5	6	2,5	2,5	5	6	4	4	4	8	1	1	4
32	6	4	6	6	6	5	6	5	4	3	8	1	1	2
33	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	-	1	1	2
34	6	5	6	3,5	3,5	5	5	4	4	8	-	6	6	2
35	3	3	3	1	1	3	3	9	5	5	6	6	6	3
36	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	3	1	1	3
37	6	5	6	3,5	3,5	5	6	3	6	1	8	1	1	2
38	3	3	3	3	1	3	3	1	1	1	3	1	1	2
39	6	6	6	6	6	5	6	5	4	6	6	1	-	2
40	6	4	6	3	3	6	5	1	7	9	2	1	-	2
41	6	5	6	6	6	6	6	9	9	4	4	5	-	3
42	6	5	6	6	6	6	5	8	7	9	7	-	1	2
43	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	8	6	6	5
44	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	7	1	-	2
45	6	5	6	2	2	6	6	9	9	9	7	1	1	2
46	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	8	1	-	3
47	6	5	6	2,5	3	6	5	6	4	9	6	1	1	2
48	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	8	1	1	4
49	6	6	6	3,5	3	6	5	6	7	9	6	4	6	2
50	6	5	6	3,5	3	6	6	8	9	5	5	6	6	3
51	3	4	3	1	1	3	3	1	1	2	4	1	1	3
52	6	6	6	6	3	6	6	5	9	4	6	2	1	4
53	3	3	6	3,5	3	3,5	5	9	9	9	7	6	6	4
54	3	3	3	1	3	3	3	1	1	1	5	1	1	4
55	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	3	6	6	3
56	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	8	1	1	4
57	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	3	6	6	4
58	3	3	3	3	1	3	3	1	1	1	8	1	1	4
59	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	5	6	6	4
60	6	5	6	3	6	3,5	5	5	1	5	4	5	1	2
61	6	5	6	3,5	3,5	5	4	9	6	6	2	6	6	2

Continua...

Quadro 3 A - Cont.

RIL's e Progenitores	F 56	F 52	F 49	F 45	F 46	F 47	F 32	A 73	A 81	A 89	M 31.23	M 31.55	M 63.31	M 63.19
62	5	3,5	3,5	6	6	4	3	8	7	6	5	1	1	4
63	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	6	1	1	2
64	3	3	3	3	3	3,5	3	1	1	1	8	6	6	5
65	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	2	6	6	4
66	3	4	3	2	1	3	3	1	1	1	8	1	6	4
67	6	5	6	2	2	6	6	2	8	4	8	1	1	2
68	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	8	1	1	5
69	6	4	6	2	2	5	5	9	5	4	8	6	6	3
70	6	5	6	2,5	3	6	5	5	7	1	2	6	4	4
71	3	3	3	3	1	3	3	9	9	9	2	5	6	5
72	6	4	6	3	3	6	5	8	9	9	3	6	6	4
73	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	3	6	1	2
74	6	4	6	2,5	2	6	6	1	4	4	6	1	1	-
75	6	5	6	3,5	2,5	6	5	4	6	3	-	1	1	2
76	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	5	2	6	3
77	3	3	3	3	1	3	3	2	1	1	4	1	6	2
78	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	3	6	4	3
79	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	3	5	1	3
80	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	6	1	1	2
81	3	3	1	1	1	1	3	1	1	1	8	1	1	-
82	6	5	6	6	6	6	6	9	9	9	3	6	6	-
83	6	5	6	2,5	2	6	5	9	9	9	8	-	1	-
84	6	5	4	3	3	6	5	8	9	9	-	1	5	2
85	3	3	3	1	-	1	3	9	9	9	4	5	6	3
86	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	3	4	6	3
87	6	5	5	6	6	6	6	5	4	5	5	1	1	3
88	3	3	3	1	1	1	3	1	1	1	4	6	6	3
89	6	5	5	6	6	5	6	5	6	4	6	4	1	2
90	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	4	6	6	3
91	-	3	3	1	2	3	3	1	1	1	3	-	1	5
92	6	5	6	3,5	4	5	5	9	9	9	8	6	6	2
93	6	6	6	6	6	6	6	7	9	9	8	1	1	2
94	3	3	3	6	1	3	3	1	1	1	8	1	1	3
95	-	3	3	1	1	1	3	1	1	1	7	-	1	3
96	3	3	3	3	3	1	3	1	1	1	8	1	1	4
97	6	5	5	3,5	4	6	3	8	9	3	6	1	1	4
98	3	3	3	1	1	1	3	1	1	1	8	1	1	2
99	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	4	1	1	2
100	6	6	6	6	6	6	6	6	9	9	4	1	1	3
101	3	3	3	1	3	3	3	1	1	1	4	1	1	2
102	6	5	6	-	2	6	5	8	9	9	-	4	1	2
103	3	-	3	1	1	-	3	1	1	-	2	4	6	4
104	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	2	6	1	2
105	6	5	6	3,5	2,5	6	4	8	9	4	8	-	1	6
106	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	8	1	1	4
107	6	5	6	6	6	6	6	9	8	5	7	1	1	3
108	6	4	6	3	3	3	5	3	9	2	4	1	1	3
109	6	4	6	2,5	2	6	5	3	1	1	8	1	1	2
110	3	3	3	1	1	1	3	1	1	1	6	1	4	2
111	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	7	1	1	2
112	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	3	1	1	2
113	3	3	3	1	3	3	3	1	1	1	3	1	1	3
114	6	5	6	3,5	3,5	6	5	9	9	9	3	8	6	3
115	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	8	1	1	4
116	6	5	3,5	6	6	6	6	9	9	8	8	1	1	4
117	3	3	3	2,5	2,5	3	3	9	4	4	2	6	5	3
118	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	2	1	4	2
119	3	3	1	1	1	3	3	1	1	1	3	1	1	2
120	6	4	6	2,5	2,5	5	4	6	3	2	6	1	-	2
121	3	3	1	1	1	1	3	1	2	1	2	2	4	4
122	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	6	5	4	2
123	6	5	6	6	6	6	6	9	9	9	7	2	1	1
124	1	3	3	3	1	3	3	1	1	1	7	1	1	3
125	3	3	3	3	1	3	3	1	1	1	-	-	1	3
126	3	3	3	3	1	3	3	1	1	1	7	1	-	2

Continua...

Quadro 3 A - Cont.

RIL's e Progenitores	F 56	F 52	F 49	F 45	F 46	F 47	F 32	A 73	A 81	A 89	M 31.23	M 31.55	M 63.31	M 63.19
127	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	3	6	5	5
128	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	8	1	1	2
129	3	3	3	1	1	3	3	1	1	2	8	6	5	4
130	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	2	6	6	-
131	3	3	3	3	1	1	3	1	1	1	8	1	1	6
132	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	8	1	1	2
133	6	4	6	2	2	6	5	9	9	8	-	1	1	3
134	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	8	1	1	2
135	6	5	6	3,5	3,5	6	5	9	9	9	2	6	6	5
136	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	8	1	1	3
137	3	3	3	3	1	3	3	1	1	1	8	1	1	6
138	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	8	6	6	5
139	3	3	3	3	3	3	3	1	2	1	7	6	6	5
140	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1	8	8	6	-
141	6	4	6	3	3,5	6	4	9	9	8	7	1	6	2
142	6	4	6	3,5	3,5	6	5	7	9	6	8	6	6	2
143	6	5	6	2,5	2,5	6	5	9	9	9	-	1	1	2
144	6	6	6	3,5	3,5	5	5	6	9	9	2	6	6	2
145	3	3	3	3	3	3	3	6	9	9	2	1	1	2
146	6	5	6	3,5	3,5	5	5	8	5	8	8	1	1	2
147	6	4	6	2	2	5	6	3	4	6	8	1	1	2
148	6	5	6	3,5	3,5	5	4	8	9	9	8	6	6	3
149	6	5	5	3,5	3,5	5	4	6	7	5	2	1	1	2
150	6	4	6	3,5	3,5	6	5	9	9	9	7	6	6	2
151	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	3	6	6	4
152	6	5	6	2	2	6	6	9	9	9	7	2	1	-
153	6	5	6	6	6	6	6	9	9	9	-	2	1	4
154	6	5	6	2,5	2,5	6	6	9	9	9	7	2	1	5
Ouro Negro	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	8	2	1	4
Rudá	6	4	5	3,5	4	5	5	7	9	9	2	7	5	2

\* RIL's com notas até 3 foram consideradas resistentes.

Quadro 4A - Caracterização das 154 RIL's e dos progenitores Ouro Negro (ON) e Rudá com base em 49 marcadores moleculares

RIL's e Progenitores	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
2	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	.	.	0	0
3	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1
5	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0
6	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
7	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0
8	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1
9	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
10	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1
11	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
12	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
13	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1
14	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
15	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1
16	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0
17	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
18	1	1	0	1	0	1	.	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0
19	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1
20	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1
21	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0
22	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
23	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
24	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0
25	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
26	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
27	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
28	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1
29	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1
30	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0
31	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
32	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	.	0	0	0	0	0
33	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1
34	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0
35	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1

Continua...

Quadro 4 A - Cont.

RIL's e Progenitores	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
36	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1
37	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
38	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0
39	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
40	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
41	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
42	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1
43	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1
44	1	1	1	.	.	.	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0
45	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1
46	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
47	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0
48	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
49	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1
50	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
51	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1
52	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
53	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0
54	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1
55	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1
56	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1
57	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0
58	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
59	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
60	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0
61	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0
62	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1
63	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1
64	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
65	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
66	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
67	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1
68	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
69	0	0	0	1	0	0	.	.	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1
70	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
71	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
72	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0

Continua...

Quadro 4 A - Cont.

RIL's e Progenitores	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
73	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1			0	1	0	1	0	0	1	0	0
74	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1
75	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
76	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1
77	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
78	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0
79	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
80	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
81	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0
82	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
83	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0
84	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
85	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1		1	0	0	0
86	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
87	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
88	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
89	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
90	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0
91	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1
92	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0
93	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
94	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
95	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1
96	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0		1	0	1
97	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1
98	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1		0	1
99	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1
100	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1
101	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1
102	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
103	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0
104	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0
105	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
106	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
107	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1
108	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1
109	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1

Continua...

Quadro 4 A - Cont.

RIL's e Progenitores	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
110	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
111	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1
112	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0
113	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1
114	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
115	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1
116	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0
117	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
118	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1
119	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1
120	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1
121	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
122	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
123	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1
124	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
125	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
126	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1
127	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0
128	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
129	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0
130	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
131	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
132	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
133	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
134	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1
135	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1
136	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1
137	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
138	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1
139	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0
140	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1
141	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
142	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
143	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
144	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0
145	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
146	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0

Continua...

Quadro 4 A - Cont.

RIL's e Progenitores	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
147	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
148	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0
149	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
150	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0
151	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0
152	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0
153	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0
154	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1
Ouro Negro	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
Rudá	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1

Quadro 4 A - Cont.

RIL's e Progenitores	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0
2	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
3	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1
4	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1
5	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0
6	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0
7	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
8	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0
10	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
11	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0
12	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1
13	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
14	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0
15	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
16	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
17	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1
18	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1
19	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1
20	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
21	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0

Continua...

Quadro 4 A - Cont.

RIL's e Progenitores	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	
22	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	
23	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	
24	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	
25	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	
26	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	
27	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	
28	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
29	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
30	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1
31	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0
32	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	.	.	0	1	1	0	0
33	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
34	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
35	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
36	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
37	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
38	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1
39	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
40	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
41	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0
42	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
43	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
44	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1
45	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
46	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
47	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0
48	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1
49	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0
50	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0
51	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0
52	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0
53	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
54	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
55	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1
56	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1
57	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1
58	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1

Continua...

Quadro 4 A - Cont.

RIL's e Progenitores	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
59	-	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1
60	-	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
61	0	1	-	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0
62	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1
63	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
64	-	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0
65	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
66	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
67	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
68	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1
69	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0
70	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0
71	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0
72	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1
73	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1
74	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0
75	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
76	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0
77	-	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0
78	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
79	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1
80	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
81	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	.	.	1	1	0	0
82	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
83	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0
84	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1
85	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1
86	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
87	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
88	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1
89	0	0	1	0	0	0	0	1	0	.	.	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
90	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1
91	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1
92	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
93	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
94	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
95	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0

Continua...

Quadro 4 A - Cont.

RIL's e Progenitores	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
96	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
97	1	0	1	0	0	.	.	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0
98	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1
99	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
100	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0
101	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1
102	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0
103	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1
104	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1
105	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1
106	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1
107	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0
108	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1
109	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0
110	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1
111	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
112	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1
113	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1
114	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
115	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1
116	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1
117	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0
118	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1
119	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0
120	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0
121	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	.	.	0	0	0	1
122	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	.	0	1	1	1
123	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0
124	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	.	.	1	1	0	0
125	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0
126	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	.	0	0	0	0	0	1
127	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
128	0	0	0	.	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	.	.	0	0	1	0
129	1	0	-	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1
130	1	0	-	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1
131	1	1	-	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0
132	0	1	-	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1

Continua...

Quadro 4 A - Cont.

RIL's e Progenitores	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
133	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0
134	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1
135	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
136	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1
137	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
138	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
139	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1
140	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1
141	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1
142	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1
143	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0
144	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
145	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1
146	1	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1
147	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0
148	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0
149	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
150	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0
151	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1
152	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	.	1	1	1	1
153	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	.	0	1	0	0	0
154	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
Ouro Negro	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
Rudá	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0

CÓDIGOS: 1-presença; 0-ausência

MARCADORES: 1- SCARF10-1050; 2-OX11-550; 3-OX11-1000; 4-OI16-889; 5-OI16-774; 6-OI16-540; 7-OF10-1159; 8-OF10-1050; 9-OAU20-1247; 10-OBH01-736; 11- OC08-1820; 12-OC08-1514; 13-OY20-1790; 14-OY20-1673; 15-OBE06-1611; 16-OBE06-1357; 17-OBA16-669; 18-OBA16-351; 19-OBF16-650; 20-OBH06-932; 21-OBH06-831; 22-OV01-1444; 23-OV01-1266; 24-OV02-2122 e 25-OV02-1611; 26-OH13-509; 27-OQ4-3457; 28-OZ9-692; 29-OAD09-3210; 30-OAD12-921; 31-OAF17-3290; 32-OAF17-2466; 33-OAJ18-934; 34-OAJ18-509; 35-OH18-1537; 36-OH18-1468; 37-OH18-692; 38-OH18-664; 39-OI19-710; 40-OM02-1967; 41-OM02-640; 42-OAS06-532; 43-OAS11-1120; 44-OBC14-1374; 45-OBC14-493; 46-OBE04-1357; 47-OBG10-934; 48-OBG10-446; 49-SCARBA8-560