

**CARACTERES AGRONÔMICOS E
MARCADORES RAPD ASSOCIADOS AO
GENE DE REAÇÃO AO AGENTE CAUSAL
DO OÍDIO NO FEIJOEIRO**

VIVIANE FERREIRA REZENDE

2000

VIVIANE FERREIRA REZENDE

**CARACTERES AGRONÔMICOS E MARCADORES RAPD
ASSOCIADOS AO GENE DE REAÇÃO AO AGENTE CAUSAL DO
OÍDIO NO FEIJOEIRO**

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

Orientador

Prof. João Bosco dos Santos

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2000

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

Rezende, Viviane Ferreira

Caracteres agronômicos e marcadores RAPD associados ao gene de reação ao agente causal do oídio no feijoeiro / Viviane Ferreira Rezende. – Lavras : UFLA, 2000.

60 p. : il.

Orientador: João Bosco dos Santos.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Feijão - *Phaseolus vulgaris*. 2. *Erysiphe polygoni*. 3. RAPD. 4. Ligação gênica. 5. Herdabilidade. 6. Melhoramento genético. 7. Retrocruzamento. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.6523

VIVIANE FERREIRA REZENDE

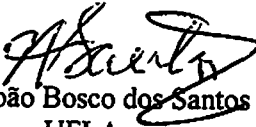
**CARACTERES AGRONÔMICOS E MARCADORES RAPD
ASSOCIADOS AO GENE DE REAÇÃO AO AGENTE CAUSAL DO
OÍDIO NO FEIJOERIO**

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

APROVADA em 01 de fevereiro de 2000

Prof. Magno Antonio Patto Ramalho UFLA

Prof. Daniel Furtado Ferreira UFLA


Prof. João Bosco dos Santos
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, José Lessa e Maria Conceição;

Aos meus avós, Francisco (*in memoriam*) e Gíva;

Aos meus tios, primos e amigos;

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, proteção e por ter permitido mais essa vitória.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, pela oportunidade de realização deste curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

Ao professor João Bosco dos Santos, pela orientação, disponibilidade, apoio, paciência e ensinamentos transmitidos durante todo o curso e na realização deste trabalho.

Ao professor Magno Antonio Patto Ramalho, pelo incentivo, disponibilidade e pelas contribuições durante a realização deste trabalho.

Ao professor Eduardo Bearzoti, pela disponibilidade, auxílio nas análises de distâncias genéticas e sugestões.

Ao professor Daniel Furtado Ferreira, pelas sugestões e críticas, que contribuíram para a melhoria da qualidade deste trabalho.

À pesquisadora Ângela de Fátima Barbosa Abreu e aos demais professores do Departamento de Biologia, pela amizade e ensinamentos transmitidos.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, em especial ao Lamartini, do Laboratório de Genética Molecular.

Aos funcionários da Biblioteca da UFLA, pelo atendimento e atenção dispensada.

Aos colegas do curso de Genética e Melhoramento de Plantas, pelo convívio e amizade.

Ao Leandro, pelo apoio, carinho e compreensão.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 Oídio ou mildio pulverulento (<i>Erysiphe polygoni</i> D.C.).....	03
2.2 Controle genético da resistência do feijoeiro ao oídio.....	05
2.3 Melhoramento visando à resistência ao oídio.....	06
2.4 Marcadores moleculares.....	10
2.5 Marcadores RAPD na identificação de alelos de resistência a fitopatógenos.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Genitores e obtenção dos cruzamentos.....	16
3.2 Experimentos de campo.....	16
3.2.1 Local.....	16
3.2.2 Avaliação da reação ao oídio nas famílias F _{1:2} RC ₁	17
3.2.3 Avaliação das famílias F _{1:3} RC ₁ na ausência de oídio.....	22
3.3 Identificação de marcadores RAPD ligados ao alelo de resistência ao oídio.....	26
3.3.1 Local.....	26
3.3.2 Extração de DNA.....	26
3.3.3 Obtenção dos <i>bulks</i> segregantes de DNA e análise de RAPD.....	27
3.3.4 Análise de distâncias genéticas.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Controle genético da resistência ao oídio.....	31

4.2 Associação do alelo de resistência ao oídio com caracteres agronômicos....	34
4.3 Marcadores RAPD ligados ao alelo de resistência ao oídio.....	38
5 CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
ANEXOS.....	57

RESUMO

REZENDE, V.F. **Caracteres agronômicos e marcadores RAPD associados ao gene de reação ao agente causal do oídio no feijoeiro.** Lavras: UFLA, 2000. 60p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)*

Visando a aumentar a eficiência de programas de melhoramento para obtenção de feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) tipo Jalo resistentes ao *Erysiphe polygoni*, foi realizado o presente estudo com os objetivos de verificar se o alelo de resistência ao oídio está associado a caracteres agronômicos indesejáveis e identificar marcadores RAPD ligados ao alelo de resistência da linhagem ESAL 686 ao *E. polygoni*. Foram utilizados como genitores a cultivar Jalo EEP, suscetível ao patógeno, e a linhagem ESAL 686, resistente. Os trabalhos foram realizados no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, no Sul de Minas Gerais. Para investigar a associação do alelo de resistência ao oídio com fenótipos indesejáveis, foram conduzidos dois experimentos. Inicialmente foi avaliada a reação de 64 famílias $F_{1:2}$ do retrocruzamento (Jalo x ESAL 686) x Jalo, sendo identificadas 35 famílias segregantes e 29 suscetíveis, portanto, homocigóticas para o alelo de suscetibilidade. Na geração $F_{1:3}RC_1$, foram avaliados os seguintes caracteres, na ausência de oídio: produtividade de grãos (g/parcela), peso de 100 sementes (g), número de dias para o florescimento e aspecto do grão. Foi observada associação do alelo de resistência ao oídio apenas com o aspecto do grão. Entretanto, essa associação não deverá impedir a seleção de linhagens resistentes e com grãos semelhantes à 'Jalo'. Com o objetivo de identificar marcadores RAPD ligados ao alelo de resistência ao *E. polygoni*, foram utilizadas para a extração de DNA plantas provenientes da primeira geração do retrocruzamento com o genitor suscetível. Após identificação das plantas portadoras do alelo de resistência e das plantas suscetíveis por meio da avaliação da reação das famílias $F_{1:2}RC_1$ ao patógeno, foram construídos dois bulks de DNA: o bulk resistente e o bulk suscetível. Foram identificados quatro marcadores RAPD amplificados pelos primers OPAC-15, OPC-14, OPC-18 e OPL-16, os quais estão intimamente ligados entre si e relativamente distantes do alelo de resistência. Portanto, os mesmos têm pouca utilidade para a seleção indireta de plantas com o alelo de resistência.

* Comitê Orientador: João Bosco dos Santos - UFLA (Orientador), Magno Antonio Patto Ramalho - UFLA e Daniel Furtado Ferreira - UFLA.

ABSTRACT

REZENDE, V.F. **Agronomic characters and RAPD markers associated with the reaction gene to the oidium causal agent in common bean.** Lavras: UFLA, 2000. 60p. (Dissertation - Master in Genetics and Plant Breeding)*

Aiming to increase the efficiency of breeding program for obtaining common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Jalo type, resistant to *Erysiphe polygoni*, the present study was performed with the purposes of verifying whether the oidium resistance allele is associated with undesirable agronomic characters and identifying RAPD markers linked to the resistance allele of the line ESAL 686 to *E. polygoni*. As parents were utilized the cultivar Jalo EEP, susceptible to the pathogen and the line ESAL 686, resistant. The works were accomplished at the Biology Department of the Universidade Federal de Lavras, in the South of Minas Gerais State. Two experiments were conducted to investigate the association of the oidium resistance allele with undesirable phenotypes. At first, the reaction of 64 F_{1:2} families of the (Jalo x ESAL 686) x Jalo backcross, 35 segregating and 29 susceptible families being identified, therefore, homozygous for the susceptibility allele. In the generation F_{1:3}RC₁ the following characters were evaluated in the absence of oidium: grain yield (g/plot), weight of 100 seeds (g), number of days to flowering and grain aspect. Association of the oidium resistance allele only with the grain aspect was observed. However, that association is not to avoid the selection of resistant lines with grains similar to Jalo. With the objective of identifying RAPD markers linked to the resistance allele to *E. polygoni*, plants coming from the first generation of the backcross with the susceptible parent were utilized for extraction of DNA. After identification of the plants carrying the resistance allele and the susceptible plants through the evaluation of the reaction of the F_{1:2}RC₁ families to the pathogen, two bulks of DNA, the resistant bulk and the susceptible bulk were built. Four RAPD markers amplified by primers OPAC-15, OPC-14, OPC-18 and OPL-16 are closely linked among them and relatively far from the resistance allele. Therefore, they have little usefulness to the indirect selection of plants with the resistance allele.

* Guidance Committee: João Bosco dos Santos - UFLA (Adviser), Magno Antonio Patto Ramalho - UFLA e Daniel Furtado Ferreira - UFLA.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, os feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) do tipo Jalo, com grãos amarelos e grandes, têm grande aceitação comercial em algumas regiões e geralmente possuem um maior preço de mercado. Contudo, esses feijões têm alguns problemas que dificultam o seu cultivo, como a suscetibilidade às pragas e a alguns patógenos, especialmente o *Erysiphe polygoni*, agente causal do oídio.

O oídio é uma importante doença do feijoeiro nas semeaduras realizadas nas épocas da "seca" e do outono-inverno, quando as condições ambientais favorecem a ocorrência desse patógeno. As perdas na produtividade de grãos atribuídas ao oídio podem atingir até 69%, dependendo da cultivar e da condição ambiental (Schwartz, Katherman e Thung, 1981). Em trabalho realizado no Sul de Minas Gerais, foram constatadas reduções na produtividade de 50% na cultivar Eriparza e 40% na 'Rio Vermelho' (Arriel, Santos e Ramalho, 1991).

Embora existam alternativas eficientes de controle da doença com produtos químicos, o uso de cultivares resistentes é a medida de controle mais recomendada por não aumentar os custos de produção nem causar desequilíbrio e poluição do meio ambiente (Rava e Sartorato, 1993). São conhecidas várias cultivares com elevada resistência ao patógeno, entretanto, a maioria das cultivares resistentes pertence ao grupo Mesoamericano, com grãos de tamanho médio a pequeno e hábito de crescimento indeterminado (Schwartz, Katherman e Thung, 1981; Sartorato, Rava e Costa, 1993). Uma das poucas referências de linhagem com grãos médios, hábito determinado e resistente é a ESAL 686 (Rezende, Ramalho e Abreu, 1996).

Como a cultivar Jalo apresenta incompatibilidade no cruzamento com a maioria das cultivares do grupo Mesoamericano (Singh e Gutierrez, 1984; Vieira, Ramalho e Santos, 1989), a introdução do alelo de resistência ao *E.*

polygona nessa cultivar é dificultada. Com a identificação da resistência ao patógeno na linhagem ESAL 686, que é compatível com cultivares de grãos grandes, surgiu a possibilidade de introdução do alelo de resistência na cultivar Jalo.

Na condução de um programa de melhoramento, a obtenção de informações sobre o controle genético e associação entre os caracteres auxiliam os melhoristas na tomada de decisões. Um outro aspecto a ser considerado é que, embora a avaliação visual da incidência desse patógeno seja relativamente fácil, a sua ocorrência não é freqüente durante todo o ano, o que pode atrasar o programa de seleção. Uma alternativa é a seleção de genótipos resistentes por meio indireto, quando se dispõe de marcadores ligados ao alelo de resistência (Ferreira e Grattapaglia, 1995; Kelly, 1994). Entre os marcadores, o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) é um dos mais utilizados. Nesse contexto, os objetivos do presente trabalho foram verificar se o alelo de resistência ao oídio está associado a caracteres agronômicos indesejáveis e identificar marcadores RAPD ligados ao alelo de resistência da linhagem ESAL 686 ao *Erysiphe polygona*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Oídio ou míldio pulverulento (*Erysiphe polygoni* DC.)

O oídio do feijoeiro é uma doença que apresenta distribuição mundial, sendo considerada, no entanto, de importância secundária (Sartorato e Rava, 1994). A expansão do cultivo no outono-inverno e a grande facilidade de dispersão dos esporos do fungo têm aumentado a sua importância.

A doença ocorre com maior frequência durante e após o período de floração da cultura, sendo mais severa nas cultivares de hábito determinado (Sartorato e Rava, 1994) e grãos grandes (Vieira, 1983).

A doença pode atingir toda a parte aérea da planta. Manifesta-se inicialmente nas folhas e delas passa para o caule e vagens. Os primeiros sintomas são manchas verde-escuras na parte superior da folha, que se desenvolvem em pequenas massas branco-acinzentadas de aspecto pulverulento, que podem coalescer e tomar toda a superfície foliar. Essas massas são constituídas de micélio e inúmeros esporos do fungo. O desfolhamento pode ocorrer quando a infecção é severa. As vagens atacadas apresentam-se atrofiadas, mal formadas e podem cair (Vieira, 1983). Nas vagens severamente infectadas, as sementes podem não se desenvolver ou apresentar um menor desenvolvimento, diminuindo, com isso, o rendimento (Sartorato e Rava, 1994).

O agente causal do oídio do feijoeiro, *Erysiphe polygoni*, é um fungo da classe dos Ascomicetos, família Erysiphaceae. A fase imperfeita desse fungo, que corresponde ao gênero *Oidium*, é a principal responsável pela ocorrência da doença nas condições brasileiras. A fase perfeita raramente é constatada em condições de campo. Esse fato é atribuído à ausência de temperaturas

suficientemente baixas que permitam o desenvolvimento da fase perfeita ou sexuada do patógeno (Bedendo, 1995).

Na fase imperfeita, o fungo produz hifas claras e septadas, que formam um micélio branco ou cinza claro. As hifas dão origem a conidióforos curtos, eretos e não ramificados, a partir dos quais se desenvolvem os conídios, arranjados em cadeia. Os conídios são hialinos, unicelulares, de forma ligeiramente retangular a ovalada ou oblonga. As hifas formam também os haustórios, que são estruturas especializadas na retirada de nutrientes diretamente das células do hospedeiro (Bedendo, 1995).

No estágio perfeito, o micélio forma corpos de frutificação do tipo cleistotécio, claros no início, escuros posteriormente, de modo a tornarem-se bem visíveis, em contraste com o micélio branco. No interior dos cleistotécios desenvolvem-se os ascos, que dão origem a ascósporos unicelulares, hialinos e ovalados, semelhantes aos conídios do patógeno (Bedendo, 1995).

Embora as sementes possam transportar externamente o patógeno, são um agente disseminador de pouca importância. Os conídios são facilmente destacados dos conidióforos e transportados pelo vento, chuva e insetos (Sartorato e Rava, 1994).

As temperaturas moderadas (20 a 25°C) e a baixa umidade relativa do ar ou do solo constituem-se em condições favoráveis à doença (Vale e Zambolim, 1997).

A luminosidade, que é máxima até a metade do dia, favorece a formação dos conídios, bem como a germinação, que diminui com a falta de luz. Ao contrário, o crescimento das hifas independe da presença de luz (Sartorato e Rava, 1994).

A ocorrência de chuvas ou irrigação por aspersão são fatores desfavoráveis a esse patógeno, já que ele desenvolve-se externamente ao tecido hospedeiro (Paula Júnior, Silva e Vieira, 1994).

As principais medidas de controle praticamente estão restritas ao emprego de cultivares resistentes e à aplicação de produtos químicos (Sartorato e Rava, 1994).

2.2 Controle genético da resistência do feijoeiro ao oídio

O primeiro trabalho visando a elucidar o controle genético da resistência do *P. vulgaris* ao *E. polygoni* foi realizado por Dundas (1936). Nesse estudo, ele verificou que a cultivar Pinto (resistente), quando cruzada com 'Robust' (suscetível) e 'Long Roman' (semi-resistente), possui um alelo de resistência à raça de oídio utilizada. Em outro experimento, Dundas (1942) observou que determinadas cultivares de feijoeiro carregam um alelo dominante que lhes confere resistência a 12 das 14 raças estudadas do patógeno. Constatou também a presença de um alelo dominante que governa a semi-resistência, e outro, a suscetibilidade, num período de cinco a sete dias após a emergência.

Bett e Michaels (1995) relatam a ocorrência de dois genes, sendo que num deles a resistência é devida ao alelo dominante, e no outro, ao recessivo, e ambos os alelos devem estar presentes para a resistência se expressar.

Rezende, Ramalho e Corte (1999) avaliaram plantas F_2 e famílias $F_{2:3}$ provenientes do cruzamento da cultivar Jalo com a linhagem ESAL 686. Numa escala de notas de 1 a 9, foram consideradas resistentes as plantas ou famílias que receberam nota igual ou inferior a quatro. Considerando a nota média de incidência de oídio na parcela, a segregação observada ajustou-se à razão de 9 resistentes: 7 suscetíveis, indicando a existência de epistasia recessiva dupla no controle do caráter.

Como pode-se verificar, não existe um consenso quanto ao controle genético desse caráter, sendo necessárias maiores investigações para a sua elucidação. Vale ressaltar que as diferentes conclusões observadas nos trabalhos

podem ser devidas aos diferentes genótipos de feijão utilizados, às diferentes raças de oídio, às condições ambientais em que foram realizados os estudos ou aos métodos de avaliação empregados.

2.3 Melhoramento visando à resistência ao oídio

O feijão comum é uma espécie com ampla variabilidade de caracteres agronômicos, como hábito de crescimento, ciclo, tamanho e cor de grãos. Este fato se deve à grande diversidade de ambientes onde o feijão comum é cultivado. Por essa razão, uma classificação que considere um conjunto de caracteres morfológicos, adaptativos, evolucionários e marcadores moleculares é de grande utilidade para orientar os cruzamentos das diferentes cultivares. Dessa forma, genótipos de feijão dos principais centros de domesticação foram agrupados em seis raças ou doze grupos gênicos (Singh, 1993).

Na maioria dos programas de melhoramento, realizam-se cruzamentos entre linhas e cultivares provenientes do mesmo grupo gênico, isto é, do grupo que possui as cultivares com as características agronômicas e culinárias mais aceitas na região. A consequência desse procedimento é a exploração de menos de 5% da variabilidade existente na espécie, além de dificilmente se conseguirem ganhos genéticos significativos, principalmente na produção de grãos (Singh, 1993). Por essa razão é que vem sendo preconizada a utilização dos diferentes grupos gênicos nos programas de melhoramento, considerando as principais características de cada um, visando a maiores ganhos em produtividade, associados a outros caracteres de interesse (Santos e Gavilanes, 1998).

No Brasil, a maioria das cultivares utilizadas é de origem mesoamericana, possuindo elevada resistência ao oídio, grãos de tamanho médio a pequeno e hábito de crescimento indeterminado. Entretanto, a 'Jalo', como a

maioria das cultivares do grupo Manteiga (sementes grandes) em cultivo no Brasil, é altamente suscetível ao oídio (Vieira 1983; Rezende, Ramalho e Abreu, 1996). Uma dificuldade que ocorre é a obtenção de cultivares do grupo Manteiga e com resistência ao patógeno, porque nem sempre é viável o cruzamento entre cultivares pertencentes aos grupos gênicos mesoamericanos (sementes pequenas a médias) e os provenientes dos grupos gênicos andinos (sementes médias a grandes) como a 'Jalo' (Vieira, Ramalho e Santos, 1989). Essa incompatibilidade deve-se à interação de dois genes. A maioria das cultivares mesoamericanas possui o genótipo $DL_1DL_1dl_2dl_2$, e as cultivares andinas, $dl_1dl_1DL_2DL_2$. Quando cultivares dessas duas origens são cruzadas, são produzidos descendentes em que os alelos DL_1 e DL_2 passam a ocorrer juntos, e sua interação é responsável pela produção de plantas pouco desenvolvidas, cloróticas e que chegam a morrer até mesmo antes da produção de sementes (Gepts e Bliss, 1985; Vieira, Ramalho e Santos, 1989). Entretanto, a linhagem ESAL 686, uma das poucas referências de material com grãos médios, hábito determinado e resistente, é compatível tanto com cultivares de grãos grandes quanto com cultivares de grãos pequenos (Rezende, Ramalho e Abreu, 1996). Desse modo, a resistência conferida por esta linhagem poderá facilitar os trabalhos de melhoramento visando à obtenção de cultivares de grãos grandes e resistentes ao oídio. A linhagem ESAL 686 também poderá ser utilizada em cruzamentos ponte.

No centro de pesquisa de arroz e feijão da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), entre 498 genótipos testados foram considerados resistentes as linhagens 9021704, 9021705, 9022171, 9115880, CB 9021928, AN 9022253, FE 732880, BZ 1977-6, além da cultivar Pampa (Sartorato, Rava e Costa, 1993). Na Colômbia, foram identificados como altamente resistentes os seguintes genótipos: Aeté-2, A 40, BAT 799, BAT 838, BAT 871, BAT 1113 e 'Porrilo Sintético' (Schwartz, Katherman e Thung, 1981).

Como mencionado anteriormente, a cultivar Jalo bem como a maioria das cultivares de grãos grandes são altamente suscetíveis ao oídio. Esse fato sugere uma possível associação por meio de ligação e/ou pleiotropia das características de grão com o gene de reação ao oídio. O efeito pleiotrópico do gene a ser transferido do pai doador, ou a ligação genética próxima entre esse gene e genes com efeitos desfavoráveis em qualquer caráter quantitativo, pode comprometer o sucesso de programas de retrocruzamento (Fujimaki, 1978).

Os retrocruzamentos são utilizados como metodologia complementar a outros métodos clássicos de melhoramento, sendo freqüentemente empregado em cruzamentos divergentes visando a elevar a freqüência de alelos favoráveis na população. Este método tem sido também aplicado na adaptação de germoplasma exótico, reduzindo a sua contribuição genética na formação das populações segregantes (Borém, 1998). Portanto, o propósito do retrocruzamento é alterar um atributo específico como, por exemplo, resistência à doença ou qualidade de grão de uma cultivar superior sem mudar nenhum outro aspecto dessa cultivar.

Quando genes diferentes encontram-se ligados e há o interesse em transferir apenas o alelo de um deles, a tendência é de ambos os alelos permanecerem juntos. Vale salientar que o emprego de retrocruzamento para se proceder à transferência de alelos é o meio que mais favorece a separação de genes ligados. Evidentemente, a chance de separação depende da distância entre eles (Allard, 1971 e Fehr, 1987). Assim, quando dois genes situam-se muito próximos, há necessidade de se utilizar populações segregantes muito grandes para se conseguir recuperar o genótipo recombinante. Por outro lado, no caso de pleiotropia, ou seja, quando o alelo de interesse também controla características indesejáveis, a transferência do mesmo pode não ser vantajosa.

Fujimack (1978) verificou, em arroz, a ligação do alelo de resistência a bruzone com florescimento tardio mesmo quando se utilizaram diferentes fontes

de resistência. Em função de problemas como esse, Fujimack e Comstock (1977) propuseram um procedimento de avaliação para auxiliar o melhorista na decisão sobre a viabilidade de transferência do alelo de interesse em programa de retrocruzamento, mesmo que ele se encontre ligado ou seja pleiotrópico, condicionando outros fenótipos desfavoráveis.

Foram observadas associações entre caracteres do tricoma e caracteres agronômicos em híbridos de batata (*Solanum tuberosum* X *S. berthaultii*). Suspeitou-se dessas associações devido à dificuldade em selecionar plantas híbridas com resistência a insetos e características agronômicas aceitáveis. Especula-se que essa associação seja devida à ligação ou diferenciação genômica estrutural entre os genomas das espécies envolvidas nas populações estudadas (Kalazich e Plaisted, 1991).

Cox et al. (1997) estudaram o efeito do alelo de resistência *Lr41* à ferrugem-da-folha na produção de grãos e qualidade do pão de linhas de trigo, em experimentos com e sem aplicação de fungicidas. Observaram que o *Lr41* aumentou a produção de grãos e qualidade de moagem sob infecção pesada de ferrugem da folha, sem reduzir a produção ou caracteres de qualidade na ausência da doença. A redução no tempo de assadura e a redução na absorção de água, na ausência de doença, requerem estudos adicionais para determinar se são causadas por genes proximamente ligados ao *Lr41* e se são de magnitude suficiente para afetar a qualidade do pão.

Em cevada, o fenótipo espigas com seis fileiras está associado com baixo peso de semente e tombamento severo (Jui et al., 1997).

A ligação genética entre o alelo alvo e alelos afetando qualquer caráter agronômico indesejável limita o sucesso do programa de melhoramento. É preferível detectar e avaliar a ligação indesejável nas gerações iniciais para poder tomar medidas apropriadas visando a dissipar a ligação indesejável em torno do alelo alvo, ou até não insistir na transferência do mesmo.

Durante o processo de transferência de alelos de resistência em cruzamentos, é necessário proceder às inoculações nas populações segregantes para a seleção dos genótipos resistentes. Entretanto, nem sempre é viável realizar as inoculações como, por exemplo, em condições ambientais desfavoráveis para o desenvolvimento da doença e inviabilidade de produção de inóculo em meios artificiais. Uma alternativa consiste na seleção indireta dos genótipos resistentes por meio de marcadores ligados ao alelo de resistência.

2.4 Marcadores moleculares

Marcadores genéticos são quaisquer características, processos bioquímicos ou fragmentos de DNA que permitam a distinção de indivíduos geneticamente diferentes. Quatro tipos de marcadores genéticos têm sido utilizados em plantas: morfológicos, citológicos, bioquímicos e moleculares (Borém, 1998).

Os primeiros marcadores utilizados foram caracteres morfológicos controlados por genes com segregação mendeliana, em geral fenótipos de fácil identificação visual, como nanismo, deficiência clorotica, cor de pétala ou morfologia foliar (Ferreira e Grattapaglia, 1995). Esses marcadores existem em número limitado e o processo de avaliação pode ser demorado, pois eles podem depender do desenvolvimento da planta e sua expressão gênica pode estar sujeita às variações do ambiente (Borém, 1998).

Os marcadores citológicos são de difícil monitoramento. Mais recentemente, os marcadores bioquímicos, principalmente as isoenzimas e proteínas de reserva, têm sido utilizados na caracterização de germoplasma e, de forma mais limitada, na seleção indireta. À semelhança dos marcadores morfológicos e citológicos, os marcadores bioquímicos também existem em número limitado e com baixo nível de polimorfismo (Borém, 1998).

Com o advento das técnicas da biologia molecular que permitiram detectar polimorfismos genéticos no DNA, o número de marcadores disponíveis para análise genética passou a ser virtualmente ilimitado, e sua utilização pôde ser estendida a espécies menos estudadas (Ferreira e Grattapaglia, 1995). Os marcadores moleculares comportam-se como características qualitativas de herança mendeliana simples. São de grande interesse para o melhoramento de plantas, como uma fonte de informação genética na seleção indireta de fenótipos de interesse agrônômico (Kelly e Miklas, 1998).

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

Os distintos tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade no DNA. Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização, estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e Minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Já aqueles revelados por amplificação, incluem os marcadores do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), Microsatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). As tecnologias de marcadores moleculares estão evoluindo rapidamente e várias modificações já existem para algumas técnicas mencionadas. Contudo, os tipos de marcadores citados são ainda os

mais utilizados em estudos genéticos e em programas de melhoramento, especialmente o RAPD, por sua simplicidade e viabilidade de uso por qualquer melhorista (Milach, 1998).

2.5 Marcadores RAPD na identificação de alelos de resistência a fitopatógenos

A classe de marcadores identificados por amplificação de DNA está baseada na reação da polimerase ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A técnica de PCR consiste na amplificação *in vitro* de fragmentos de DNA, usando-se *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) de seqüência definida que hibridizam com as fitas simples, sendo as cópias facilmente detectadas pela eletroforese em gel (Komminoth e Long, 1993).

Cada ciclo de amplificação na técnica de PCR compreende três etapas: (1) desnaturação da molécula de DNA, (2) pareamento dos *primers* com as regiões complementares do DNA e (3) síntese do fragmento pela DNA polimerase. O ciclo é repetido várias vezes gerando uma amplificação do DNA-alvo em progressão geométrica (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Williams et al. (1990); Welsh e McClelland (1990) propuseram, independentemente, o uso de *primers* (em torno de 10 nucleotídeos) de seqüência conhecida, porém, arbitrária, eliminando a necessidade do conhecimento prévio da seqüência a ser amplificada. Esta técnica, conhecida como RAPD, está entre as mais utilizadas devido à sua facilidade de uso, rapidez e baixo custo.

Para realização de uma reação de RAPD, um único *primer* é misturado com o DNA genômico, na presença da enzima termoestável DNA polimerase, de um tampão adequado e, em seguida, submetido a vários ciclos de amplificação, como em uma reação de PCR. Em condições ideais de

temperatura, ocorre a ligação entre o *primer* e o DNA genômico em dois sítios, em fitas opostas do DNA-molde. Caso estes sítios estejam separados por uma distância entre 200 e 2.000 pares de bases, o produto da amplificação será formado (Williams et al. 1990).

A reação de RAPD é realizada em máquinas denominadas termocicladores, as quais são programadas para a realização dos ciclos da reação em que a temperatura é sucessivamente alterada para a produção das fases de desnaturação (em torno de 94°C), anelamento do *primer* (em torno de 36°C) e extensão do DNA (em torno de 72°C). O termociclador tem a função não só de realizar as mudanças na temperatura, como também de mantê-la na faixa desejada pelo tempo mínimo necessário a cada fase da reação. O tempo de duração da reação varia conforme o termociclador e o número de ciclos utilizados. Ao término da reação, as amostras devem ser mantidas a 4°C até o momento de sua aplicação no gel (Milach, 1998).

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

A técnica de RAPD permite detectar polimorfismos ocasionados por mutações de ponto ou deleções nos sítios de pareamento do *primer*, ou inserções entre os sítios de pareamento, deixando-os a uma distância tal que impossibilita a amplificação (Williams et al., 1990; Williams et al., 1993).

Análises de polimorfismo de DNA com marcadores do tipo RAPD são muito úteis, não somente para a caracterização de recursos biológicos (Fairbanks et al., 1993) e estudos de similaridade genética (Duarte, Santos e Melo, 1999a; Duarte, Santos e Melo, 1999b), mas também no mapeamento de genes de resistência a doenças de herança simples (Melchinger, 1989 e Kelly, 1994) e na

identificação e seleção mais eficiente dos genótipos carregando combinações específicas de genes de resistência (Haley, Afanador e Kelly, 1994a).

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

Os problemas de reprodutibilidade do RAPD podem ser superados pela padronização da técnica (Ferreira e Grattapaglia, 1995). Atualmente é possível aumentar a utilidade e a reprodutibilidade de um marcador RAPD de interesse, convertendo-o em um marcador mais específico e reprodutível denominado SCAR (Melotto, Afanador e Kelly, 1996).

Embora exista a limitação da herança dominante, cerca de 3 a 5% dos marcadores RAPD comportam-se como codominantes (Ferreira e Grattapaglia, 1995). Arruda (1998) cita uma metodologia para detectar heterozigotos com marcadores RAPD classificados como dominantes. Segundo ela, a presença de heteroduplex no híbrido e a diferença de intensidade de bandas podem ser usadas para identificar heterozigotos.

A eficiência da seleção assistida por marcadores pode ser aumentada pelo uso de marcadores ligados ao alelo de suscetibilidade. Haley, Afanador e Kelly (1994b) demonstraram que a seleção contra marcadores RAPD em repulsão

produz uma proporção de genótipos resistentes homozigotos maior do que quando se realiza seleção para marcadores RAPD em acoplamento.

Métodos como linhas quase isogênicas e análise de *bulk segregante* (BSA) têm sido utilizados para identificar marcadores RAPD ligados a alelos de resistência a doenças importantes em feijão (Kelly e Miklas, 1998). Para a obtenção de linhas quase isogênicas, são necessárias várias gerações de retrocruzamento, o que demanda muito tempo. Além disso, há indicações de que as linhas quase isogênicas possuem grandes blocos de DNA em comum e, portanto, podem identificar marcadores distantes dos alelos de interesse (Martin, Williams e Tanksley, 1991). Um inconveniente adicional é que por meio delas não se consegue estimar a distância genética entre o marcador e o alelo de interesse. Para sanar esse problema, Michelmore, Paran e Kesseli (1991) propuseram a metodologia BSA - *Bulked Segregant Analysis*, que é capaz de identificar marcadores ligados a genes a partir de uma população segregante e possibilita estimar a distância entre eles.

Marcadores RAPD ligados a genes de reação a doenças do feijoeiro têm sido identificados, estando disponíveis para a utilização no desenvolvimento de cultivares resistentes a algumas raças de antracnose (Adam-Blondon et al., 1994; Young e Kelly, 1997 e Alzate-Marin et al., 1997; Castanheira et al., 1999), ferrugem (Haley et al., 1993; Park et al., 1997), mancha-angular (Carvalho et al., 1997), podridão-cinzenta-do-caule ou macrofomina (Olaya, Abawi e Weeden, 1996; Miklas et al., 1998), crestamento-bacteriano (Miklas et al., 1996), vírus-do-mosaico-comum (Haley, Afanador e Kelly, 1994a; Johnson et al., 1997) e vírus-do-mosaico-dourado (Urrea et al., 1996; Miklas et al., 1996).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Genitores e obtenção dos cruzamentos

Um dos genitores utilizados foi a cultivar Jalo EEP obtida na estação experimental de Patos de Minas na década de sessenta, daí a denominação EEP, a qual não será mais mencionada nesse trabalho, optando-se simplesmente pela denominação 'Jalo'. Essa cultivar possui grãos grandes e amarelos, hábito de crescimento indeterminado do tipo III e é muito suscetível ao oídio; porém, seu tipo de grão é bem aceito pelos consumidores. O outro genitor foi a linhagem ESAL 686 obtida na Universidade Federal de Lavras, com grãos de tamanho médio e coloração amarelo-escura, hábito de crescimento determinado do tipo I e resistente ao oídio.

O cruzamento entre os genitores foi realizado utilizando metodologia semelhante à apresentada por Ramalho, Santos e Zimmermann (1993). Posteriormente, a geração F_1 foi retrocruzada com o genitor suscetível. As sementes F_1RC_1 foram semeadas no campo. Cada planta F_1RC_1 foi utilizada para a extração de DNA e obtenção de famílias $F_{1,2}RC_1$.

3.2 Experimentos de campo

3.2.1 Local

Os experimentos foram conduzidos em Lavras, na área experimental do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, localizada na região Sul de Minas Gerais (21°58' S, 45°22' W, 910 m de altitude), latossolo

vermelho-escuro e clima CWb, de acordo com a classificação climática de Köppen.

3.2.2 Avaliação da reação ao oídio nas famílias $F_{1:2}RC_1$

Foram avaliadas 64 famílias na geração F_2 , oriundas de plantas da primeira geração do retrocruzamento com o genitor suscetível ($F_{1:2}RC_1$), visando a identificar aquelas segregantes quanto à reação ao oídio e também aquelas totalmente suscetíveis. Foi utilizado um látice simples 8 x 8, sendo a parcela constituída por uma linha de um metro com 15 sementes. Vinte dias antes da instalação do experimento, no inverno de 1998, foram semeadas duas linhas com o Jalo em torno do experimento, as quais serviram como bordadura e fonte de inóculo.

Vinte dias após a semeadura do experimento, foi feita uma inoculação com o patógeno através do contato de pedaços de folhas infectadas com as folhas saudáveis, além da inoculação natural feita pelo vento.

A primeira avaliação da incidência de oídio foi realizada dois meses após a semeadura, utilizando-se uma escala de notas de 1 a 9 (Tabela 1). Após seis dias, foi realizada uma segunda avaliação.

Durante a avaliação de cada parcela, foi anotado se as plantas eram uniformemente suscetíveis ou se ocorria segregação, isto é, algumas plantas suscetíveis e outras resistentes.

TABELA 1. Escala de notas utilizadas na avaliação da reação das famílias F_{1,2}RC₁ do cruzamento (Jalo x ESAL 686) x Jalo ao *Erysiphe polygoni*.

Notas	Área foliar infectada (%)
1	0
2	1
3	1 a 5
4	5 a 10
5	10 a 20
6	20 a 40
7	40 a 60
8	60 a 80
9	80 a 100

Fonte: Rezende, Ramalho e Corte (1999).

Utilizou-se a nota média de dois avaliadores nas duas épocas de avaliação para a análise de variância (Tabela 2), obedecendo-se ao modelo estatístico a seguir:

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

em que:

Y_{ijk} : valor observado na parcela que recebeu o tratamento i , no bloco k , dentro da repetição j ;

m : média geral;

t_i : efeito do tratamento i , sendo $i = 1, 2, \dots, 64$;

r_j : efeito da repetição j , sendo $j = 1, 2$;

$b_{k(j)}$: efeito do bloco incompleto k dentro da repetição j , sendo $k = 1, 2, \dots, 8$;

e_{ijk} : erro experimental associado a observação Y_{ijk} .

TABELA 2. Esquema da análise de variância e respectivas esperanças dos quadrados médios.

Fontes de variação	GL	QM	E(QM)
Famílias	gl_1	Q_1	$\sigma_e^2 + r\sigma_p^2$
Famílias suscetíveis (grupo 1)	gl_2	Q_2	$\sigma_e^2 + r\sigma_{PIB_1}^2$
Famílias segregantes (grupo 2)	gl_3	Q_3	$\sigma_e^2 + r\sigma_{PIB_2}^2$
Entre grupos	gl_4	Q_4	$\sigma_e^2 + r\phi_g$
Erro efetivo	gl_5	Q_5	σ_e^2

r : número de repetições; σ_p^2 : variância genética entre famílias; $\sigma_{PIB_1}^2$: variância genética entre famílias suscetíveis; $\sigma_{PIB_2}^2$: variância genética entre famílias segregantes; ϕ_g : componente genético quadrático entre grupos; σ_e^2 : variância do erro.

A partir das esperanças dos quadrados médios, foram obtidas as estimativas dos componentes de variância fenotípica e genética.

a) Variância genética entre famílias ($\hat{\sigma}_p^2$):

$$\hat{\sigma}_p^2 = \frac{Q_1 - Q_s}{r}$$

b) Variância fenotípica entre as médias das famílias ($\hat{\sigma}_F^2$):

$$\hat{\sigma}_F^2 = \frac{Q_1}{r}$$

Posteriormente foi estimada a herdabilidade entre médias de famílias, no sentido amplo, utilizando a metodologia apresentada por Vencovsky e Barriga (1992):

$$h^2 = \frac{\hat{\sigma}_p^2}{\hat{\sigma}_F^2} \times 100$$

Também foram obtidos os limites inferior (LI) e superior (LS) da estimativa de h^2 , os quais foram calculados pelas expressões apresentadas por Knapp, Stroup e Ross (1985), com confiança de 95% ($1 - \alpha = 0,95$), ou seja:

$$LI = \left\{ 1 - \left[\left(\frac{Q_1}{Q_s} \right) F_{1-\alpha/2; g^1, g^1} \right]^{-1} \right\}$$

em que:

$F_{1-\alpha/2; g'_s, g'_l}$: valor da distribuição de F para os graus de liberdade g'_s e g'_l , tal que a probabilidade de exceder este valor é $1-\alpha/2$.

$$LS = \left\{ 1 - \left[\left(\frac{Q_1}{Q_s} \right) F_{\alpha/2; g'_s, g'_l} \right]^{-1} \right\}$$

em que:

$F_{\alpha/2; g'_s, g'_l}$: valor da distribuição de F para os graus de liberdade g'_s e g'_l , tal que a probabilidade de exceder este valor é $\alpha/2$.

Também foi possível estimar o coeficiente de variação genético (CV_g) e o coeficiente b, pelas expressões (Vencovsky e Barriga, 1992):

$$CV_g = \frac{100\sqrt{\hat{\sigma}_p^2}}{m}$$

$$b = \frac{CV_g}{CV_c}$$

O número de famílias segregantes e de famílias suscetíveis observado foi comparado com o esperado, considerando a segregação monogênica, pelo teste de qui-quadrado (Steel e Torrie, 1980).

3.2.3 Avaliação das famílias F_{1,3}RC₁ na ausência de oídio

As mesmas 64 famílias foram avaliadas na geração F_{1,3}RC₁, na época das águas de 1998/1999, num látice triplo 8 x 8. Cada parcela foi constituída de duas linhas de dois metros, espaçadas de 0,5 metro. Nessa geração foi feito um controle semanal do oídio no experimento utilizando-se um fungicida à base de enxofre. O objetivo desse controle foi verificar o efeito do alelo de resistência, na ausência de doença, nos seguintes caracteres: número de dias para o florescimento, produção de grãos (g/parcela), peso de 100 sementes (g) e aspecto do grão. Esse último caráter foi avaliado utilizando-se uma escala de notas de 1 a 5, na qual: 1 - grãos de aspecto riniforme e amarelos, semelhantes ao Jalo; 2 - grãos semelhantes ao Jalo em formato e diferindo na coloração; 3 - grãos de tamanho menor, um pouco arredondados e escuros; 4 - grãos arredondados e escuros; e 5 - grãos completamente diferentes do Jalo.

As análises de variância foram realizadas para cada caráter avaliado, utilizando o modelo estatístico apresentado no item 3.2.2.

Na tabela 3 é apresentado o esquema da análise de variância, com decomposição da fonte de variação tratamentos e as respectivas esperanças dos quadrados médios (Fujimaki, 1978).

TABELA 3. Esquema da análise de variância e respectivas esperanças do quadrado médio.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	E(QM)
Famílias	gl ₁	Q ₁	$\sigma_c^2 + r\sigma_p^2$
Entre grupos	gl ₂	Q ₂	$\sigma_c^2 + r\phi_g$
Famílias d. grupos	gl ₃	Q ₃	$\sigma_c^2 + r\sigma_{p1g}^2$
Erro	gl ₄	Q ₄	σ_c^2

A partir das esperanças dos quadrados médios, foram obtidas as estimativas dos componentes de variância de alguns parâmetros genéticos e fenotípicos.

a) Variância genética entre famílias ($\hat{\sigma}_p^2$):

$$\hat{\sigma}_p^2 = \frac{Q_1 - Q_4}{r}$$

b) Variância genética entre famílias dentro de grupos ($\hat{\sigma}_{p/g}^2$):

$$\hat{\sigma}_{p/g}^2 = \frac{Q_3 - Q_4}{r}$$

c) Variância fenotípica entre as médias das famílias ($\hat{\sigma}_F^2$):

$$\hat{\sigma}_F^2 = \frac{Q_1}{r}$$

Posteriormente foram estimados dois coeficientes de herdabilidade, um incluindo a variação genética total (h^2) e outro desconsiderando a variação entre grupos (H), e também seus respectivos intervalos de confiança a 95% ($1-\alpha = 0,95$):

$$h^2 = \frac{\hat{\sigma}_p^2}{\hat{\sigma}_F^2} \times 100$$

$$LI = \left\{ 1 - \left[\left(\frac{Q_1}{Q_4} \right) F_{1-\alpha/2; g_4, g_1} \right]^{-1} \right\}$$

em que:

$F_{1-\alpha/2; g_4, g_1}$: valor da distribuição de F para os graus de liberdade g_4 e g_1 , tal que a probabilidade de exceder este valor é $1-\alpha/2$.

$$LS = \left\{ 1 - \left[\left(\frac{Q_1}{Q_4} \right) F_{\alpha/2; g_4, g_1} \right]^{-1} \right\}$$

em que:

$F_{\alpha/2; g_4, g_1}$: valor da distribuição de F para os graus de liberdade g_4 e g_1 , tal que a probabilidade de exceder este valor é $\alpha/2$.

$$H = \frac{\hat{\sigma}_{P/g}^2}{\hat{\sigma}_{\bar{F}}^2} \times 100$$

$$LI = \left\{ 1 - \left[\left(\frac{Q_3}{Q_4} \right) F_{1-\alpha/2; g_4, g_3} \right]^{-1} \right\}$$

em que:

$F_{1-\alpha/2;g_4,g_3}$: valor da distribuição de F para os graus de liberdade g_4 e g_3 , tal que a probabilidade de exceder este valor é $1-\alpha/2$.

$$LS = \left\{ 1 - \left[\left(\frac{Q_3}{Q_4} \right) F_{\alpha/2;g_4,g_3} \right]^{-1} \right\}$$

em que:

$F_{\alpha/2;g_4,g_3}$: valor da distribuição de F para os graus de liberdade g_4 e g_3 , tal que a probabilidade de exceder este valor é $\alpha/2$.

Utilizando as médias das famílias $F_{1:2}RC_1$ e $F_{1:3}RC_1$ foram estimadas as correlações genéticas pela expressão:

$$r_G = \frac{C\hat{O}V_{Pxy}}{\sqrt{\hat{\sigma}_{P_x}^2 \cdot \hat{\sigma}_{P_y}^2}}$$

em que:

r_G : correlação genética entre as médias das famílias $F_{1:2}RC_1$ e $F_{1:3}RC_1$;

$C\hat{O}V_{Pxy}$: covariância genética entre as médias das famílias $F_{1:2}RC_1$ e $F_{1:3}RC_1$;

$\hat{\sigma}_{P_x}^2$: variância genética entre famílias $F_{1:2}RC_1$;

$\hat{\sigma}_{P_y}^2$: variância genética entre famílias $F_{1:3}RC_1$.

O teste t para verificar a significância da r_G , sob a hipótese de que a verdadeira correlação é nula, foi realizado conforme sugerido por Vencovsky e Barriga (1992).

3.3 Identificação de marcadores RAPD ligados ao alelo de resistência ao oídio

3.3.1 Local

O estudo foi realizado em Lavras, no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, localizada no Sul de Minas Gerais.

2.3.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi feita a partir de plantas F_1 do cruzamento (Jalo x ESAL 686) x Jalo, semelhante ao procedimento utilizado por Nienhuis et al. (1995). Foram colhidos aproximadamente dois gramas de folhas jovens de cada planta, as quais foram trituradas em 10 ml de tampão de extração a 65°C e 20 μ l de β -mercaptoetanol em um almofariz. O tampão de extração contém 2% de CTAB, 100 mM de TRIS (pH 8.0), 20 mM de EDTA (pH 8.0), 1.4 M de NaCl e 1% de PVP (polivinilpirrolidona). O material triturado foi colocado em tubos de centrífuga e incubado por 30 minutos em banho-maria a 65°C. Após o banho-maria, foi realizada a primeira extração de DNA com 10 ml da mistura clorofórmio : álcool isoamil (24:1).

Durante essa extração, as fases orgânica e aquosa foram separadas por centrifugação e foi coletado o sobrenadante. Após a adição de 30 ml da mistura álcool 95% : acetato de amônio 7,5 M (6:1), os ácidos nucleicos foram

precipitados. Essa mistura foi colocada no freezer por pelo menos uma hora. Em seguida, os ácidos nucleicos precipitados foram transferidos para tubos de microcentrífuga e reidratados em tampão TE (1 mM de TRIS e 0,1 mM de EDTA). Foi realizada uma segunda extração com clorofórmio-álcool isoamil e o sobrenadante foi precipitado pela adição de pelo menos três volumes de uma mistura de acetato de sódio 3 M: etanol 95% (1:20). Após a precipitação, o DNA foi reidratado em tampão TE e quantificado, utilizando-se um fluorímetro (Hoffer Scientific, San Francisco, CA, USA). As amostras de DNA foram diluídas em TE para uma concentração de 10 ng/μl.

3.3.3 Obtenção dos *bulks* segregantes de DNA e análise de RAPD

Foram construídos dois *bulks* a partir de amostras de DNA extraídas de folhas de plantas F₁RC₁ previamente identificadas quanto à reação ao *Erysiphe polygoni*. Um dos *bulks* continha quantidades equimolares de DNA extraído de dezessete plantas F₁RC₁ resistentes e o outro *bulk*, de dezessete plantas F₁RC₁ suscetíveis.

O DNA dos *bulks* foi amplificado com 700 *primers* decâmeros (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA) para identificar polimorfismos entre os *bulks*.

As reações de RAPD foram preparadas em volume de 10 μl, de forma semelhante ao procedimento usado por Nienhuis et al. (1995). As reações foram realizadas em tubos capilares de vidro em um termociclador refrigerado a ar (Idaho Technology, Idaho Falls, ID, USA). O termociclador foi programado para 40 ciclos, com as seguintes condições: nos dois primeiros ciclos, 60 segundos para desnaturação a 91°C, 7 segundos para anelamento do *primer* a 42°C e 70 segundos para alongação a 72°C; os 38 ciclos subsequentes diferiram dos dois primeiros apenas em relação ao tempo de desnaturação, reduzindo-se para 1

segundo. Após a amplificação, os produtos da reação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados.

3.3.4 Análise de distâncias genéticas

Os potenciais marcadores RAPD detectados nos *bulks* segregantes foram primeiramente testados nos indivíduos constituintes de cada bulk. A co-segregação entre esses marcadores e o fenótipo resistência/suscetibilidade foi determinada em 64 plantas F₁RC₁ do cruzamento (Jalo x ESAL 686) x Jalo. Testes de qui-quadrado (χ^2) foram utilizados para comparar as razões fenotípicas e genotípicas observadas e esperadas.

Para determinar as posições dos marcadores identificados em relação ao alelo de resistência da linhagem ESAL 686, foi usado o programa MAPMAKER (Lander et al., 1987), versão 3.0, com LOD *score* mínimo de 0,83. A função-mapa de Haldane (1919) foi empregada para calcular as distâncias genéticas em centimorgans (cM).

As freqüências de recombinação (*r*) entre os marcadores e o alelo de resistência e entre os marcadores dois a dois foram ainda estimadas utilizando-se um processo iterativo, através do procedimento dos mínimos quadrados não lineares, seguindo o modelo genético:

$$Y = \sum_{i=1}^4 x_i f_i$$

em que x_i , para $i = 1, 2, 3, 4$, representa uma variável indicadora (*dummy*), assumindo valores 0 ou 1. Se um determinado indivíduo pertence à

classe fenotípica i , o valor de x_i corresponde a 1; caso contrário, o valor de x_i será 0;

f_i , para $i = 1, 2, 3, 4$, representa a frequência esperada na geração utilizada.

Para as frequências de recombinação entre cada marcador e o alelo de resistência, as classes fenotípicas são: 1- resistente com banda; 2- resistente sem banda; 3- suscetível com banda e 4- suscetível sem banda.

Para as frequências de recombinação entre os marcadores dois a dois, as classes fenotípicas são: 1- banda nos dois marcadores; 2- banda no primeiro marcador e ausência no segundo; 3- banda no segundo marcador e ausência no primeiro e 4- ausência de banda nos dois marcadores.

Para a geração F_1 do cruzamento (Jalo x ESAL 686) x Jalo, o modelo genético foi:

$$Y = x_1(1-r)/2 + x_2(1-r)/2 + x_3r/2 + x_4r/2$$

A solução do modelo genético não linear foi realizada pelo método Gauss-Newton modificado (Gallant, 1987), e para implementá-lo, foi necessária a obtenção da primeira derivada parcial em relação ao parâmetro r , resultando na seguinte equação:

$$\frac{dy}{dr} = x_1(-1/2) + x_2(-1/2) + x_3(1/2) + x_4(1/2)$$

Utilizando o procedimento PROC NLIN (SAS[®], 1990), foi obtida a estimativa da frequência de recombinação entre o alelo e os marcadores e entre os marcadores dois a dois.

O ajuste do modelo foi avaliado pelo coeficiente de determinação (R^2), fornecido pela seguinte expressão:

$$R^2 = 1 - \frac{SQ_{residuo}}{SQ_{totalcorrigido}}$$

em que, $SQ_{residuo}$ e SQ_{total} corrigido foram obtidos da ANAVA de regressão para modelos não lineares (SAS[®], 1990).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Controle genético da resistência ao oídio

O resumo da análise de variância das notas de incidência de oídio é apresentado na Tabela 4. Inicialmente vale salientar que praticamente não se constatou eficiência do látice, o que sugere que a distribuição do inóculo foi uniforme. Corroborando com essa observação, verifica-se que a precisão experimental, avaliada pelo CV (%), foi superior às relatadas para a cultura do feijoeiro com outros caracteres (Abreu et al., 1994; Estefanel, Pignataro e Storck, 1987) e também às relatadas por Marques Júnior (1997), utilizando notas na avaliação de doenças.

Constatou-se que as famílias avaliadas diferiram com relação à incidência do patógeno ($P \leq 0,01$). Quando procedeu-se à separação das famílias em dois grupos (segregante e suscetível), não foi detectada diferença significativa entre as suscetíveis. O contrário ocorreu no caso das famílias segregantes. Como era esperado, foi detectada diferença significativa ($P \leq 0,01$) entre grupos, evidenciando que a maior incidência de doença ocorreu entre as famílias suscetíveis.

A não-significância das famílias suscetíveis se deve ao fato de essas famílias serem provenientes da autofecundação de plantas homozigóticas para o alelo de suscetibilidade. Já as famílias segregantes são provenientes da autofecundação de plantas heterozigóticas para o gene de reação ao oídio, tendo, portanto, variação genética possível de ser explorada para esse caráter.

O número de famílias segregantes foi de 35 e o de famílias suscetíveis foi de 29, ou seja, muito próximo da relação 1:1, como esperado no retrocruzamento, considerando-se que está envolvido um único gene. A

comprovação dessa segregação é constatada pela não-significância do teste de χ^2 (Tabela 5).

Em trabalho anterior envolvendo o mesmo cruzamento, porém, com outras gerações segregantes, foi testada a hipótese de que estariam envolvidos dois genes, com interação do tipo epistasia recessiva dupla (Rezende, Ramalho e Corte, 1999). Contudo, a segregação observada nessa nova oportunidade mostra que, em realidade, está envolvido apenas um gene. Na literatura, há outros trabalhos que também deixam dúvidas sobre o número de genes envolvidos e o tipo de ação gênica (Dundas, 1936; Dundas, 1942; Bett e Michaels, 1995). É provável que essa diferença ocorra em função do critério de notas utilizadas em cada caso e, mais ainda, a nota a partir da qual uma planta ou família deve ser considerada resistente ou suscetível. Além do mais, na avaliação da reação das famílias por Rezende, Ramalho e Corte (1999), foi dada uma nota média e não foi considerado se havia segregação ou não dentro das famílias, como foi o caso deste trabalho.

As altas estimativa de herdabilidade no sentido amplo e do coeficiente b (Tabela 4) são um indício de que o controle genético da reação ao oídio seja devido a um ou poucos genes (Rezende, Ramalho e Corte, 1999). Esses valores mostram a existência de variabilidade entre famílias e a reduzida variação ambiental, o que permite antever o sucesso com a seleção de plantas e/ou famílias resistentes nas populações segregantes.

TABELA 4. Resumo da análise de variância das notas de incidência de oídio em famílias F_{1,2} do cruzamento (Jalo x ESAL 686) x Jalo de feijão no inverno de 1998. Lavras-MG.

Fontes de Variação	GL	QM	Probabilidade
Repetição	1	8,508	
Famílias	63	6,515	0,000
Famílias suscetíveis	28	0,264	0,954
Famílias segregantes	34	1,104	0,004
Entre grupos	1	365,485	0,000
Erro efetivo	49	0,481	
Eficiência do látice		100,53	
Média		6,281	
CV (%)		11,047	
\hat{h}^2 (%)		92,617	
		(87,299; 93,827) ^a	
b		2,503	

^a Limites inferior e superior, respectivamente.

TABELA 5. Frequências observadas e esperadas das famílias segregantes e suscetíveis na geração F₁ do cruzamento (Jalo x ESAL 686) x Jalo para a reação ao oídio e resultado do teste de qui-quadrado (χ^2).

Número de famílias	Segregantes	Suscetíveis	χ^2	Probabilidade
Observado	35	29		
Esperado ^a	32	32	0,5625	0,4533

^a Considerando herança monogênica.

4.2 Associação do alelo de resistência ao oídio com caracteres agronômicos

O resumo das análises de variância das famílias $F_{1:3}$ com base em caracteres agronômicos é apresentado na Tabela 6. Verifica-se que o delineamento látice apresentou pequena eficiência em relação aos blocos casualizados, especialmente para o peso de 100 sementes e dias para o florescimento.

O coeficiente de variação (CV%) foi menor para o número de dias para o florescimento (3,430%) e maior para o aspecto do grão (18,851%). Mesmo o valor de 18,851% para o CV é de magnitude semelhante ou inferior ao normalmente relatado em experimentos com a cultura do feijoeiro (Marques Júnior, 1997; Abreu et al., 1994; Estefanel, Pignataro e Storck, 1987), evidenciando que as famílias foram comparadas com boa precisão.

Observaram-se diferenças genéticas entre as famílias, considerando ou não a classificação em grupos, para todos os caracteres avaliados ($P \leq 0,01$). Constatou-se ainda que a parcela da variação genética total devida a grupos foi significativa apenas para o peso de 100 sementes ($P \leq 0,05$) e para o aspecto do grão ($P \leq 0,01$), indicando que esses caracteres podem estar associados ao alelo de resistência ao oídio. Essa associação pode ser devida à ligação gênica ou pleiotropia (Fujimaki e Comstock, 1977; Fujimaki, 1978). No caso de ligação, o alelo de resistência deve estar situado num loco próximo a outros que afetam caracteres agronômicos. Caso ocorra pleiotropia, o alelo de resistência deve afetar também a expressão de outros caracteres agronômicos.

As estimativas de herdabilidade, incluindo a variação genética total (h^2) e desconsiderando a variação entre grupos (H), foram um pouco distintas apenas para o aspecto do grão, indicando um efeito mais pronunciado do alelo de resistência para a formação de grãos indesejáveis. Entretanto, há uma sobreposição entre as duas estimativas quando se considera os intervalos de

confiança de cada uma delas, o que sugere que o efeito desfavorável no aspecto do grão não deverá impedir a seleção de linhagens resistentes e com grãos semelhantes ao Jalo. Além disso, tal semelhança ocorreu provavelmente devido à recombinação do alelo de resistência em relação a um ou mais alelos que afetam o aspecto do grão, pelo fato de terem sido detectadas oito famílias com aspecto do grão próximo ao ideal e portadoras do alelo de resistência (Tabela 1A). Nota-se, na Tabela 2A, que o número de famílias com aspecto do grão semelhante ao Jalo nas famílias suscetíveis foi relativamente superior ao número observado nas famílias segregantes. Portanto, a associação do alelo de resistência ao oídio com aqueles que condicionam o aspecto indesejável do grão pode ser devida à ligação gênica.

A diferença entre os pesos médios de 100 sementes dos dois grupos não pode ser interpretada, com segurança, como devida à ligação gênica ou pleiotropia (Tabela 6). Isso porque a média das famílias com o alelo de resistência foi ligeiramente superior à média das famílias suscetíveis (Tabelas 1A e 2A), um resultado inverso ao peso médio de 100 sementes dos dois genitores. A linhagem ESAL 686, resistente, possui sementes menores e a 'Jalo', suscetível, possui sementes maiores. Assim, há possibilidade que a diferença entre grupos tenha ocorrido simplesmente por acaso (erro tipo I). Portanto, não se espera nenhuma dificuldade na seleção de famílias resistentes e de sementes grandes, como a 'Jalo'.

As estimativas das correlações genéticas entre a nota atribuída à incidência do patógeno com os demais caracteres avaliados foram de pequena magnitude; entretanto, quando envolveu o aspecto dos grãos ela foi um pouco superior (Tabela 7). Como a nota de ocorrência do patógeno foi dada em uma condição ambiental diferente daquela em que foram obtidos os outros caracteres, a covariância estimada é genética, o mesmo ocorrendo com a correlação. A correlação genética é uma medida de associação genética entre os caracteres e

pode ser devida à ligação dos genes ou pleiotropia (Falconer, 1987). Assim, pode-se inferir que há associação do gene de reação ao oídio com aqueles responsáveis pelo aspecto dos grãos. Esse resultado confirma o que foi anteriormente relatado com a análise de variância, mostrando que a metodologia proposta por Fujimaki (1978) é eficiente para detectar a associação dos caracteres.

Resultados semelhantes ao efeito do alelo de resistência sobre o aspecto do grão foram obtidos em trigo. Verificou-se que, apesar da associação do alelo *Lr41*, que confere resistência à ferrugem com caracteres de qualidade do pão, não deve haver sérios impedimentos na utilização desse alelo em programas de melhoramento (Cox et al., 1997). Da mesma forma, no caso do arroz, embora haja uma forte associação do alelo que confere resistência a bruzone com florescimento tardio, foram observados recombinantes promissores, com florescimento precoce e resistentes (Fujimack, 1978). Em batata, foi observada uma forte associação da resistência a insetos com a baixa produção, maturação tardia, folhagem e aparência do tubérculo mais pobre, em gerações de retrocruzamentos. Entretanto, não se encontraram associações nos intercruzamentos, indicando também que houve recombinação da resistência com fenótipos agronômicos (Kalazich e Plaisted, 1991).

Adicionalmente, nos presentes resultados, as altas estimativas de herdabilidade em todos os caracteres avaliados permitem antever o sucesso com a seleção de plantas/famílias resistentes ao oídio, precoces, produtivas, com grãos grandes e semelhantes à 'Jalo'.

TABELA 6. Resumo das análises de variância do número de dias para o florescimento, produção de grãos (g/parcela), peso de 100 sementes (g) e aspecto do grão das famílias F_{1:3} do cruzamento (Jalo x ESAL 686) x Jalo, na época das águas de 1998/1999. Lavras-MG.

Fontes de Variação	G.L.	Quadrados Médios			
		Dias p/ o florescimento	Produção (g/parcela)	Peso de 100 sementes (g)	Aspecto do grão
Repetições	2	0,563	4089,583	9,180	1,595
Famílias	(63)	15,997**	3856,544**	14,076**	1,016**
Entre grupos	1	3,266 ^{ns}	1326,385 ^{ns}	12,616*	4,965**
Famílias d. grupos	62	16,202**	3897,348**	14,100**	0,952**
Erro efetivo	105	1,969	1277,054	3,016	0,261
Eficiência do látice		100,31	102,47	100,07	107,01
Média		40,906	282,708	36,513	2,708
CV (%)		3,430	12,641	4,756	18,851
\hat{h}^2 (%)		87,691	66,886	78,574	74,321
L.I.		81,029	48,961	66,975	60,405
L.S.		92,211	79,046	86,441	83,744
H		88,973	67,944	78,745	68,002
L.I.		81,237	49,410	66,975	57,672
L.S.		92,331	79,323	88,502	82,700

* e **: significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste de F;

^{ns}: não significativo.

TABELA 7. Correlações genéticas (r_G) envolvendo a nota de incidência de oídio nas famílias $F_{1;2}$, o número de dias para o florescimento, a produção de grãos (g/parcela), o peso de 100 sementes (g) e o aspecto do grão das famílias $F_{1;3}$ do cruzamento (Jalo x ESAL 686) x Jalo.

Pares de caracteres	r_G	Prob. > t
Nota oídio, nº de dias para florescimento	-0,0456	0,4735
Nota oídio, produção de grãos	-0,1991	0,0987
Nota oídio, peso de 100 sementes	-0,2159	0,0167
Nota oídio, aspecto do grão	-0,3902	0,0002

4.3 Marcadores RAPD ligados ao alelo de resistência ao oídio

Quatro potencias marcadores RAPD em fase de acoplamento foram identificados. A Figura 1 mostra os padrões de amplificação dos genitores e dos bulks de DNA com os quatro primers que permitiram a detecção dos marcadores RAPD. Observa-se que os quatro marcadores (setas) exibiram-se com maior intensidade nos genitores que são homozigóticos, em relação aos bulks resistentes, pois as plantas F_1RC_1 são heterozigóticas.

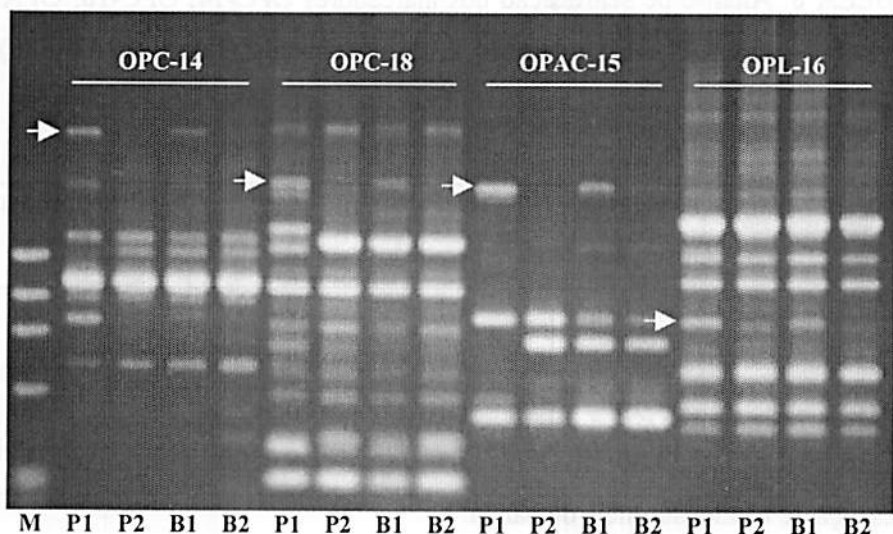


FIGURA 1. Marcadores RAPD (setas) obtidos pela amplificação dos *primers* OPC-14, OPC-18, OPAC-15 e OPL-16 em que: P1 é o genitor resistente ESAL 686, P2 é o genitor suscetível Jalo, B1 é o *bulk* resistente e B2 é o *bulk* suscetível. A coluna M corresponde ao DNA do fago lambda digerido com a enzima de restrição Hae III.

A análise da segregação observada dos marcadores em relação à esperada de 1/2 presença de bandas: 1/2 ausência de bandas, nos 64 indivíduos da população F_1RC_1 , foi consistente com a herança monogênica dominante para os quatro marcadores, o que os caracteriza como marcadores genéticos (Tabela 8).

TABELA 8. Análise de segregação dos marcadores OPC-14, OPC-18, OPAC-15 e OPL-16 na geração F₁ do cruzamento (Jalo x ESAL 686) x Jalo.

Loco Testado	Freqüência Observada	Razão Esperada ^a	χ^2	Probabilidade
OPC-14	34:30	1:1	0,2500	0,6171
OPC-18	35:29	1:1	0,5625	0,4533
OPAC-15	35:29	1:1	0,5625	0,4533
OPL-16	34:30	1:1	0,2500	0,6171

^a presença de banda: ausência de banda.

Para confirmar se os marcadores estavam realmente ligados ao alelo de resistência ao oídio, foi feita a análise de co-segregação entre cada marcador e o alelo de resistência/suscetibilidade e também entre os marcadores dois a dois (Tabela 9). Observa-se que os quatro marcadores estão intimamente ligados e todos eles estão relativamente distantes do alelo de resistência. Apenas o OPAC-15 apresentou χ^2 significativo ($P \leq 0,05$) quando testado com o alelo de resistência, indicando não terem distribuição independente. Os demais marcadores mostraram distribuição independente em relação ao alelo de resistência. Entretanto, o fato de os quatro marcadores estarem intimamente ligados implica que eles estão no mesmo cromossomo em que ocorre o gene de reação.

TABELA 9. Análise de χ^2 das frequências observadas e esperadas, admitindo distribuição independente entre cada marcador e o alelo de resistência e entre os marcadores considerados dois a dois.

Locos testados	Frequência observada	Razão Esperada AB:Ab:aB:ab	χ^2	Probab.
Alelo resistência/OPC-14	23:12:11:18	1:1:1:1 ^a	5,875	0,1179
Alelo resistência/OPC-18	24:11:11:18	1:1:1:1 ^a	7,375	0,0609
Alelo resistência/OPAC-15	24:11:10:19	1:1:1:1 ^a	8,375	0,0389
Alelo resistência/OPL-16	23:12:12:17	1:1:1:1 ^a	5,125	0,1629
OPC-14/OPC-18	34:0:1:29	1:1:1:1 ^b	60,875	0,0000
OPC-14/OPAC-15	33:1:1:29	1:1:1:1 ^b	56,75	0,0000
OPC-14/OPL-16	34:0:1:29	1:1:1:1 ^b	60,875	0,0000
OPC-18/OPAC-15	34:1:0:29	1:1:1:1 ^b	60,875	0,0000
OPC-18/OPL-16	34:1:1:28	1:1:1:1 ^b	57,375	0,0000
OPAC-15/OPL-16	33:2:1:28	1:1:1:1 ^b	53,375	0,0000

^a AB (presença do alelo de resistência e do marcador); Ab (presença do alelo de resistência e ausência do marcador); aB (presença do alelo de suscetibilidade e do marcador); ab (presença do alelo de suscetibilidade e ausência do marcador).

^b AB (presença da banda nos dois marcadores); Ab (presença da banda no primeiro marcador e ausência no segundo marcador); aB (ausência da banda no primeiro marcador e presença no segundo marcador); ab (ausência da banda nos dois marcadores).

As distâncias genéticas e seus LOD scores (*log of odds-ratio*), bem como as frequências de recombinação, seus erros padrões e os coeficientes de determinação (R^2) se encontram na Tabela 10.

TABELA 10. Distância e frequência de recombinação entre os marcadores RAPD e o alelo de resistência ao oídio na geração F₁ do cruzamento (Jalo x ESAL 686) x Jalo.

Loco	Distância ^a (cM)	LOD Score	r ^b (%)	Erro Padrão	R ²
Alelo resistência/OPL-16	69,3	0,88	37,5	3,83	78,05
Alelo resistência/OPC-14	63,4	1,11	35,9	3,25	86,19
Alelo resistência/OPC-18	58,2	1,38	34,4	3,83	84,75
Alelo resistência/OPAC-15	53,4	1,68	32,8	3,25	90,30
OPL-16/OPC-14	1,6	17,03	1,6	3,25	98,67
OPL-16/OPC-18	3,2	15,40	3,1	2,55	99,12
OPL-16/OPAC-15	4,9	14,01	4,7	3,25	99,98
OPC-14/OPC-18	1,6	17,03	1,6	3,25	98,67
OPC-14/OPAC-15	3,2	15,40	3,1	2,55	99,12
OPC-18/OPAC-15	1,6	17,03	1,6	3,25	98,67

^a distância total = 58,2 cM (Haldane);

^b frequência de recombinação.

Um LOD *score* indica essencialmente quanto mais provável é a ligação entre dois locos do que nenhuma ligação (Lander e Botstein, 1989).

$LOD = -\log_{10} \Lambda$, em que Λ é a razão de verossimilhança.

A expressão $-2 \ln \Lambda$ tem distribuição de χ^2 com um grau de liberdade, então $LOD = \frac{\chi^2}{2 \ln 10}$. Considerando 5% de erro, como sugerido por Soller e

Brody (1976), o ponto de corte é 0,83. Como os valores de LOD *score* excederam o ponto de corte predeterminado, os quatro marcadores são

considerados ligados entre si e também ao alelo de resistência com 95% de confiança.

Os altos valores de R^2 indicam que as frequências de recombinação estimadas se ajustam às observadas no RC_1 , mostrando a adequação do modelo.

Os resumos das análises de variância dos mínimos quadrados não lineares envolvendo os quatro locos marcadores e o loco de reação se encontram na Tabela 3A.

As posições relativas dos marcadores em relação ao alelo de resistência ao oídio, determinadas pelo programa MAPMAKER 3.0, estão representadas na Figura 2.

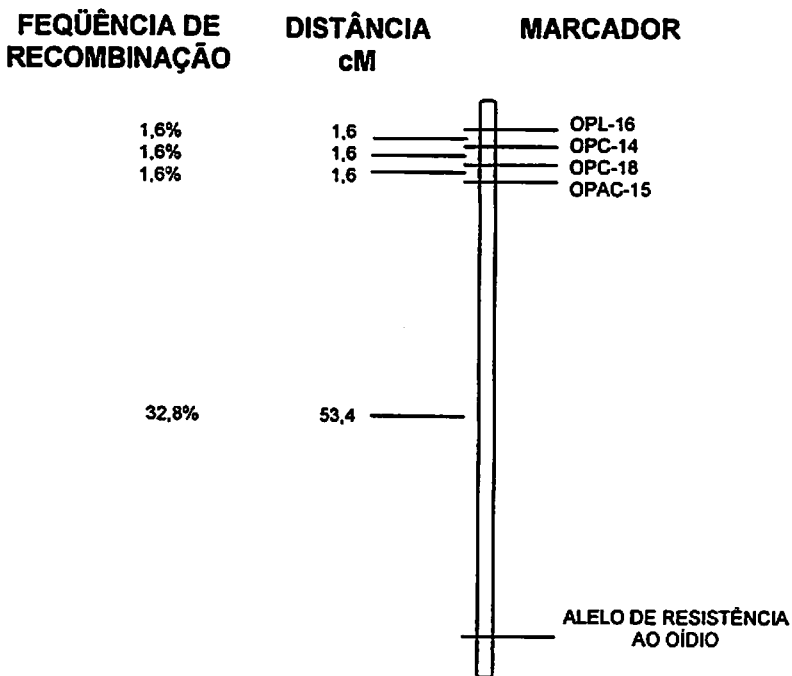



FIGURA 2. Mapa genético do gene de reação ao oídio e dos quatro marcadores RAPD identificados na população F_1 do cruzamento (Jalo x ESAL 686) x Jalo.



De acordo com os resultados das Tabelas 9 e 10, os quatro marcadores estão intimamente ligados entre si e fracamente ligados ao alelo de resistência.

Considerando o marcador mais próximo do alelo de resistência, amplificado pelo *primer* OPAC-15, cuja frequência de recombinação estimada é de 32,8%, pode-se prever que, se for realizada a seleção indireta de plantas com o marcador numa população F_2 , 18,3% das plantas selecionadas serão suscetíveis (Tabela 11). Esta frequência de plantas selecionadas erroneamente por meio do marcador, mostra que ele tem pouca utilidade para auxiliar na seleção. Nota-se, na Tabela 11, que os demais marcadores são ligeiramente menos eficientes para fins de seleção indireta do que o OPAC-15, pelo fato de estarem mais distantes do alelo de resistência.

A magnitude do erro esperado na seleção é proporcionalmente menor a medida que o marcador esteja mais próximo do alelo de interesse. Este é o caso, por exemplo, do alelo Co.5, que confere resistência a algumas raças de *Colletotrichum lindemuthianum* em feijão, em que apenas 7,2% das plantas selecionadas indiretamente em F_2 , por meio do marcador amplificado pelo *primer* OPF-10 ($r = 0,115$), serão suscetíveis (Castanheira et al., 1999).

Considerando a distância dos marcadores identificados em relação ao alelo de resistência, esforços devem ser feitos para identificar outros mais próximos, os quais deverão ser úteis para a seleção indireta, especialmente para acelerar o programa de seleção em épocas do ano quando a doença geralmente não se desenvolve. Este fato torna-se relevante no caso do *E. polygoni*, que é um patógeno obrigatório, dificultando a produção de inóculo para seleção direta de plantas resistentes em condições artificiais.

TABELA 11. Estimativa das frequências de plantas suscetíveis selecionadas como resistentes em F₂ por meio do marcador (FPSS).

<i>Primer</i> marcador	Seqüência de bases	Nº de pares de bases	r (%)	FPSS (%)
OPAC-15	5'TGCCGTGAGA3'	2239	32,8	18,3
OPC-18	5'TGAGTGGGTG3'	2239	34,4	19,0
OPC-14	5'TGCGTGCTTG3'	3020	35,9	19,7
OPL-16	5'AGGTTGCAGG3'	912	37,5	20,3

5 CONCLUSÕES

- Foi observada associação do alelo de resistência ao oídio apenas com o aspecto do grão. Entretanto, essa associação não deverá impedir a seleção de linhagens resistentes e com grãos semelhantes à 'Jalo'.
- Foram identificados quatro marcadores RAPD amplificados pelos *primers* OPAC-15, OPC-14, OPC-18 e OPL-16, os quais estão intimamente ligados entre si e relativamente distantes do alelo de resistência. Portanto, os mesmos têm pouca utilidade para a seleção indireta de plantas com o alelo de resistência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, A. de F.B.; RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. dos et al. Progresso do melhoramento genético do feijoeiro nas décadas de setenta e oitenta nas regiões Sul e Alto Paranaíba em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.1, p.105-112, jan. 1994.
- ADAM-BLONDON, A.F.; SEVIGNAC, M.; BANNEROT, H. et al. SCAR, RAPD, and RFLP markers linked to dominant gene (*Are*) conferring resistance to anthracnose in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.88, n.6/7, p.865-870, Aug. 1994.
- ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. Tradução de Almiro Blumenschein et al. Rio de Janeiro: USAID, 1971. 379p. Tradução de: Principles of plant breeding.
- ALZATE-MARIN, A.L.; CARVALHO, G.A de; MENARIM, H. et al. Identification of RAPD markers associated with resistance to anthracnose in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 40, p.130-131, 1997.
- ARRIEL, E. F.; SANTOS, J.B. dos; RAMALHO, M. A. P. Efeito do oídio no rendimento da cultura do feijão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.26, n.6, p.849-852, jun. 1991.
- ARRUDA, M.C.C. de. **Resistência do feijoeiro comum à antracnose: herança, identificação de marcadores moleculares e introgressão do gene Co-4 no cultivar Rudá**. Viçosa: UFV, 1998. 101p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- BEDENDO, I.P. Oídios. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (eds.) **Manual de Fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Ceres, 1995. v.1, cap.43, p.866-871.

BETT, K.E.; MICHAELS, T.E. A two-gene model for powdery mildew resistance in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v.38, p.145-146, 1995.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 2.ed. Viçosa: UFV, 1998. 453p.

CARVALHO, G.A.; NIETSCHKE, S.; ALZART-MARIN, A.L. et al. Identificação de marcadores RAPD ligados a genes de resistência à mancha-angular do feijão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p.255, jun. 1997.

CASTANHEIRA, A.L.M.; SANTOS, J.B. dos; FERREIRA, D.F. et al. Identification of common bean alleles resistant to anthracnose using RAPD. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.22, n.4, p.565-569, Dec. 1999.

COX, T.S.; BEQUETE, R.K.; BOWDEN, R.L. et al. Grain yield and breadmaking quality of wheat lines with the leaf rust resistance gene *Lr41*. **Crop Science**, Madison, v.37, n.1, p.154-161, Jan./Feb. 1997.

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

DUARTE, J.M.; SANTOS, J.B.dos; MELO, L.C. Genetic divergence among common bean cultivars from different races based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.22, n.3, p.419-426, Sept. 1999b.

DUNDAS, B. Breeding beans for resistance to powdery mildew and rust. **Phytopathology**, St. Paul, v.32, n.9, p.828, Sept. 1942.

DUNDAS, B. Inheritance of resistance to powdery mildew in beans. **Hilgardia**, Berkeley, v.10, n.8, p.241-253, Nov. 1936.

- ESTEFANEL, V.; PIGNATARO, I.A.B.; STORCK, L. Avaliação do coeficiente de variação de experimentos com algumas culturas agrícolas. In: SIMPÓSIO DE ESTATÍSTICA APLICADA À EXPERIMENTAÇÃO AGRONÔMICA, 2., 1987, Londrina. *Anais...* Londrina: UEL, 1987. p.115-131.
- FAIRBANKS, D.J.; WALDRIGUES, A.; RUAS, C.R. et al. Efficient characterization of biological diversity using field DNA and random amplified polymorphic DNA markers. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, v.16, n.1, p.11-22, Mar. 1993.
- FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Tradução de Martinho de Almeida e Silva e José Carlos Silva. Viçosa: UFV, 1987. 279p. Tradução de: *Introduction to quantitative genetics*.
- FEHR, W.R. **Principles of cultivar development**. New York: Mac Millan, 1987. 536p.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1995. 220p. (EMBRAPA-CENARGEM Documento 20).
- FUJIMAKI, H. New techniques in backcross breeding for rice improvement. Symposium on Methods of Crop Breeding. *Tropical Agricultural Research Series*, Ibaraki, Japan, n.11, p.55-67, 1978.
- FUJIMAKI, H.; COMSTOCK, R.E. A study of genetic linkage relative to success in backcross breeding programs. *Japanese Journal Breeding*, Tokyo, v.27, n.2, p.105-115, 1977.
- GALLANT, A.R. **Nonlinear statistical models**. New York: John Wiley, 1987. 610p.

- GEPTS, P.; BLISS, F.A. F₁ hybrid weakness in the common bean. **The Journal of Heredity**, Baltimore, v.76, n.6, p.447-450, Dec. 1985.
- HALDANE, J.B.S. The recombination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linkage factors. **Journal of Genetics**, Bangalore, v.8, p.299-309, 1919.
- HALEY, S.D.; AFANADOR, L.K.; KELLY, J.D. Identification and application of a random amplified polymorphic DNA marker for the I gene (potyvirus resistance) in common bean. **Phytopathology**, St. Paul, v.84, n.2, p.157-160, Feb. 1994a.
- HALEY, S.D.; AFANADOR, L.; KELLY, J.D. Selection for monogenic pest resistance traits with coupling- and repulsion-phase RAPD markers. **Crop Science**, Madison, v.34, n.4, p.1061-1066, July/Aug. 1994b.
- HALEY, S.D.; MIKLAS, P.N.; STAVELY, J.R. et al. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.86, p.505-512, 1993.
- JOHNSON, E.; GUZMAN, P.; MANDALA, D. et al. Molecular tagging of the bc-3 gene for introgression into Andean common bean. **Crop Science**, Madison, v.37, n.1, p.248-254, Jan./Feb. 1997.
- JUI, P.Y.; CHOO, T.M.; HO, K.M. et al. Genetic analysis of two-row x six-row cross of barley using doubled-haploid lines. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.94, n.5, p.549-556, Apr. 1997.
- KALAZICH, J.C.; PLAISTED, R.L. Association between trichome characters and agronomic traits in *Solanum tuberosum* (L.) x *S. berthaultii* (Hawkes) hybrids. **American Potato Journal**, New Brunswick, v.68, n.12, p.833-846, Dec. 1991.

- KELLY, J.D. Use of random amplified polymorphic DNA markers in breeding for major gene resistance to plant pathogens. **HortScience**, Alexandria, v.30, n.3, p.461-465, May 1994.
- KELLY, J.D.; MIKLAS, P.N. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. **Molecular Breeding**, Amsterdam, v.4, n.1, p.1-11, Feb. 1998.
- KNAPP, S.J.; STROUP, W.W.; ROSS, W.M. Exact confidence intervals for heritability on a progeny mean basis. **Crop Science**, Madison, v.25, n.1, p.192-194, 1985.
- KOMMINOTH, P.; LONG, A.A. In situ polymerase chain reaction. **Virchows Archiv. Selection B. Cell Pathology**, Berlin, v.64, p.63-67, 1993.
- LANDER, E.S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, Berlin, v.121, p.185-199, Jan. 1989.
- LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J. et al. Mapmaker: na interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, San Diego, CA, v.1, p.174-181, 1987.
- MARQUES JÚNIOR, O.G. **Eficiência de experimentos com a cultura do feijão**. Lavras: UFLA, 1997. 80p. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- MARIN, A.L.A. **Identificação de marcadores moleculares RAPD ligados a resistência à antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Viçosa: UFV, 1996. 53p. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).

- 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 of the United States of America**, Washington, v.88, p.2336-2340, 1991.
- MELCHINGER, A.E. Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. **Plant Breeding**, Berlim, v.104, p.1-19, 1989.
- MELOTTO, M.; ALFANADOR, L.; KELLY, J.D. Development of a SCAR marker linked to the *I* gene in common bean. **Genome**, Ottawa, v.39, n.6, p.1216-1219, Dec. 1996.
- MICHELMORE, R.A.; PARAN, I.; KESSELI, 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 segregant populations (RAPD, RFLP). **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v.88, p.9828-9832, 1991.
- MIKLAS, P.N.; JOHNSON, E.; STONE, V. et al. Selective mapping of QTL conditioning disease resistance in common bean. **Crop Science**, Madison, v.36, n.5, p.1344-1351, Sept./Oct. 1996.
- MIKLAS, P.N.; STONE, V.; URREA, C.A. et al. Inheritance and QTL analysis of field resistance to ashy stem blight in common bean. **Crop Science**, Madison, v.38, n.4, p.916-921, July/Aug. 1998.
- MILACH, S.C.K. (ed.) **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 141p.
- NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SCKROCH, P.; SANTOS, J.B. dos. Genetic relationships among cultivars and lines of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.120, n.2, p.300-306, 1995.

- OLAYA, G.; ABAWI, G.S.; WEEDEN, N.F. Inheritance of the resistance to *Macrophomina phaseolina* and identification of RAPD markers linked to the resistance genes in beans. *Phytopathology*, St. Paul, v.86, n.6, p.674-679, June 1996.
- PAINTING, K. **Measuring genetic variation using molecular markers. Unit 10.1.4. International Plant Genetic Resource.** Roma: Brain Ford-Lloyd, University of Birmingham, 1996. 82p.
- PARK, S.O.; COYNE, D.P.; BOKOSI, J.M. et al. Identification of RAPD markers linked to a major gene for rust resistance and indeterminate growth habit using bulked segregant analysis in a common bean cross. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v.40, p.116-117, 1997.
- PAULA JÚNIOR, T.J. de; SILVA, M.B. da; VIEIRA, R.F. Doenças causadas por fungos em hortaliças leguminosas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.17, n.182, p.63-71, 1994.
- RAVA, C. A.; SARTORATO, A. Eficiência de fungicidas no controle do oídio (*Erysiphe polygoni*) do feijoeiro comum. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.19, n.1, p.30, jan./mar. 1993.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. dos; ZIMMERMANN, M.J. de O. **Genética quantitativa em plantas autógamas: aplicações ao melhoramento do feijoeiro.** Goiânia: UFG, 1993.271p.
- REZENDE, V.F.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A. de F.B. Comportamento de linhagens de feijão com relação ao nível de resistência ao oídio. In: **REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 5., 1996, Goiânia. Anais...** Goiânia:Embrapa-CNPAP-APA, 1996. p.329-331.

- REZENDE, V.F.; RAMALHO, M.A.P.; CORTE, H.R. Genetic control of common bean (*Phaseolus vulgaris*) resistance to powdery mildew (*Erysiphe polygoni*). *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v.22, n.2, p.233-236, June 1999.
- SANTOS, J.B. dos; GAVILANES, M.L. Botânica. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J. de; BORÉM, A. (eds) *Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas*. Viçosa: UFV, 1998. p. 55-82.
- SARTORATO, A.; RAVA, C. A. Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. Brasília: EMBRAPA - SPI, 1994. 300p. (EMBRAPA - CNPAF. Documentos, 50).
- SARTORATO, A.; RAVA, C.A.; COSTA, J.G.C. Resistência do feijoeiro comum ao oídio (*Erysiphe polygoni*): resultados preliminares. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 4., 1993, Londrina. Anais... Londrina: IAPAR, 1993. Resumos 37.
- SCHWARTZ, H.F.; KATHERMAN, M.J.; THUNG, M.D.T. Yield response and resistance of dry beans to powdery mildew in Colombia. *Plant Disease Reporter*, Washington, v.65, p.737-738, 1981.
- SINGH, S.P. Breeding for seed yield. In: SHOONHOVEN, A. van; VOYSEST, O. (eds). *Common beans - Research for crop improvement*. Cali, CAB International, CIAT, 1993. p.383-443.
- SINGH, S.P.; GUTIERREZ, J.A. Geographical distribution of the DL₁ and DL₂ genes causing hybrid dwarfism in *Phaseolus vulgaris* L. their association with seed size, and their significance to breeding. *Euphytica*, Wageningen, v.33, n.2, p.337-345, June 1984.
- SOLLER, M.; BRODY, T. On the power of experimental designs for the detection of linkage between marker loci and quantitative loci in crosses between inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlim, v.47, p.35-39, 1976.

- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS User's Guide Statistics Version 6. 4.ed.** Caru NC: SAS Institut, 1990. 1686p.
- STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics. 2.ed.** New York: McGraw-Hill, 1980. 633p.
- STIRLING, G.R.; EDEN, L.; AITKEN, E. The role of molecular biology in developing biological controls for parasitic nematodes. In: GUNASSEKARAN, M.; WEBER, D.J. (Eds). **Molecular biology of the biological control of pest and diseases of plants.** Boca Raton, Florida: CRC, 1995. p.71-89.
- URREA, C.A.; MIKLAS, P.N.; BEAVER, J.S. et al. A codominant randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker useful for indirect selection of BGMV resistance in common bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.121, n.6, p.1035-1039, Nov. 1996.
- VALE, F.; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas.** Viçosa: UFV, Departamento de Fitopatologia, 1997. v.2, p.335-435.
- VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento.** Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética, 1992. 496p.
- VIEIRA, A.L.; RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. dos. Crossing incompatibility in some bean cultivars utilized in Brazil. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.12, n.1, p.169-171, Mar. 1989.
- VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro.** Viçosa: UFV, 1983. 231p.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary *primers*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p.7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; HANAFEY, M.K.; RAFALSKI, J.A. et al. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods Enzymology**, Orlando, FL, v.218, p.704-740, 1993.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.

YOUNG, R.A.; KELLY, J.D. RAPD markers linked to three major anthracnose resistance genes in common bean. **Crop Science**, Madison, v.37, p.940-946, 1997.

ANEXO

ANEXO A		Página
TABELA 1A	Médias ajustadas dos caracteres avaliados nas famílias $F_{1:3}$, segregantes para a reação ao oídio, do cruzamento (Jalo x ESAL 686) x Jalo.....	58
TABELA 2A	Médias ajustadas dos caracteres avaliados nas famílias $F_{1:3}$, suscetíveis para a reação ao oídio, do cruzamento (Jalo x ESAL 686) x Jalo.....	59
TABELA 3A	Resumo das análises de variância dos mínimos quadrados não lineares envolvendo os quatro locos marcadores e o loco de reação.....	60

TABELA 1A. Médias ajustadas dos caracteres avaliados nas famílias F_{1:3}, segregantes para a reação ao oídio, do cruzamento (Jalo x ESAL 686) x Jalo.

Família	Aspecto do grão ¹	Peso de 100 sementes (g)	Produção (g/parcela)	Dias p/ o florescimento
1	2,359	34,342	280,593	44,325
2	2,818	34,410	232,353	42,328
3	3,152	38,229	279,916	38,675
6	3,303	39,259	327,022	38,325
8	2,313	37,047	249,713	44,987
13	2,687	38,272	275,567	37,720
14	3,192	39,710	257,225	38,381
17	2,126	40,515	285,026	37,584
18	2,717	35,577	267,311	44,253
19	2,722	35,587	269,526	39,699
20	2,702	38,588	353,333	40,349
21	3,616	37,283	317,056	38,301
23	3,278	37,893	299,171	39,296
24	4,621	39,374	239,204	44,989
25	3,717	37,363	300,287	38,653
26	2,712	36,814	337,834	40,576
28	2,995	33,303	214,381	44,672
29	2,005	40,576	328,578	39,725
35	2,237	38,960	289,104	39,019
36	3,227	35,576	310,474	41,963
37	3,192	35,146	280,964	40,997
38	2,803	38,405	255,296	44,648
39	2,222	37,671	317,005	39,699
41	3,222	33,237	243,520	42,981
42	2,662	34,037	288,443	40,744
43	2,253	36,666	366,515	38,672
45	2,778	37,407	276,548	41,997
47	2,768	36,601	300,864	44,288
50	2,657	34,456	248,646	42,653
53	2,611	36,419	329,391	40,067
54	3,121	33,986	259,475	38,325
57	2,303	34,963	254,484	40,347
60	3,162	35,634	255,635	42,941
61	2,717	34,822	238,172	40,067
64	2,944	37,993	349,897	43,627
Média	2,855	36,746	285,101	41,025

¹- Valores em negrito indicam famílias com aspecto do grão próximo ao ideal.

TABELA 2A. Médias ajustadas dos caracteres avaliados nas famílias F_{1:3}, suscetíveis para a reação ao oídio, do cruzamento (Jalo x ESAL 686) x Jalo.

Família	Aspecto do grão ¹	Peso de 100 sementes (g)	Produção (g/parcela)	Dias p/ o florescimento
4	1,757	35,822	251,557	44,336
5	2,374	35,975	303,046	39,656
7	1,702	38,318	295,432	38,901
9	2,702	38,683	286,228	38,659
10	2,571	36,574	278,833	38,659
11	2,667	33,054	256,870	39,773
12	3,217	35,834	246,870	41,989
15	2,586	38,035	256,125	40,645
16	2,101	33,480	245,668	42,317
22	1,475	37,793	329,255	42,707
27	2,106	40,808	313,063	40,691
30	2,808	33,592	282,470	43,352
31	2,131	36,604	292,927	40,352
33	3,717	35,199	293,975	42,704
40	1,954	36,186	314,704	42,093
44	2,818	31,017	238,901	43,608
46	1,959	36,011	302,808	39,235
48	3,909	33,759	249,407	38,347
49	3,273	38,545	328,697	38,669
51	2,823	39,225	277,801	37,672
52	3,076	34,108	230,728	39,352
55	3,333	39,301	262,792	38,299
56	2,364	35,903	274,349	44,360
58	1,783	38,448	278,240	38,432
59	2,298	32,777	281,015	42,707
62	2,136	37,084	372,605	38,317
63	2,510	35,226	236,412	43,312
65	2,106	35,017	229,713	44,616
66	3,162	38,332	304,314	38,365
Média	2,532	36,231	279,821	40,763

¹ - Valores em negrito indicam famílias com aspecto do grão próximo ao ideal.

TABELA 3A. Resumo das análises de variância dos mínimos quadrados não lineares envolvendo os quatro locos marcadores e o loco de reação (R).

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios									
		AC15-R	C14-R	C18-R	L16-R	AC15-C14	AC15-C18	AC15-L16	C14-C18	C14-L16	C18-L16
Regressão	1	0,2795	0,2698	0,2744	0,2656	0,4697	0,4846	0,4553	0,4846	0,4846	0,4697
Resíduo	3	0,0011	0,0011	0,0015	0,0015	0,0007	0,0011	0,0011	0,0011	0,0011	0,0007
Tot. não corrigido	4										
Total corrigido	3										
Freq. recomb. (%)		0,3281	0,3593	0,3438	0,3750	0,0313	0,0156	0,0469	0,0156	0,0156	0,0313
Erro padrão		0,0325	0,0325	0,0383	0,0383	0,0255	0,0325	0,0325	0,0325	0,0325	0,0255
Interv. Confiança		0,2246 a	0,2558 a	0,2219 a	0,2532 a	-0,0500 a	-0,0879 a	-0,0566 a	-0,0879 a	-0,0879 a	-0,0500 a
		0,4316	0,4628	0,4656	0,4968	0,1125	0,1191	0,1504	0,1191	0,1191	0,1125
R ² (%)		90,2985	86,1858	84,7458	78,0488	99,1189	98,6653	99,9848	98,6653	98,6653	99,1189