



**AVALIAÇÃO DE FAMÍLIAS E USO DO RAPD PARA
IDENTIFICAR O 'STAY GREEN' EM FEIJÃO.**

SIDNEY LACERDA MARCELINO DO CARMO.

2001

SIDNEY LACERDA MARCELINO DO CARMO

**AVALIAÇÃO DE FAMÍLIAS E USO DO RAPD PARA
IDENTIFICAR O 'STAY GREEN' EM FEIJÃO.**



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. Doutor. João Bosco dos Santos.

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

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

Carmo, Sidney Lacerda Marcelino do

Avaliação de famílias e o uso do RAPD para identificar o 'stay green' em
feijão/Sidney Lacerda Marcelino do Carmo. -- Lavras : UFLA, 2001.
51p. : il.

Orientador: João Bosco dos Santos.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Feijão. 2. Melhoramento genético. 3. RAPD. 4. Stay green. 5. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.6523

SIDNEY LACERDA MARCELINO DO CARMO

**AVALIAÇÃO DE FAMÍLIAS E USO DO RAPD PARA IDENTIFICAR O
'STAY GREEN' FEIJÃO.**

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 29 de março de 2001.

Pesq. Ângela de Fátima Barbosa Abreu EMBRAPA-Arroz e
Feijão

Prof. Samuel Pereira de Carvalho DAG/UFLA



Prof Doutor. João Bosco dos Santos
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

DEDICATÓRIA

A DEUS - caminho, verdade e a vida.

OFEREÇO

AOS

Meus pais, pelo amor, esforço e estímulo para que eu me realize profissionalmente. Tenham certeza de minha sincera gratidão.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Biologia, pela oportunidade deste curso.

Aos professores relacionados à área de Genética e Melhoramento de Plantas pelos ensinamentos, amizade e confiança que me foram concedidos durante a realização do meu trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES) pela concessão de bolsa.

Aos colegas de república Juliano, Túlio, Wagner, Tárique e Guilherme, pelo convívio, ajuda e amizade durante esta etapa de minha vida.

Aos funcionários do Departamento de Biologia da UFLA.

A todos que deram sua parcela de contribuição para que este trabalho se realizasse.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Feijão – comum e sua importância.....	3
2.2 Arquitetura da planta.....	4
2.3 Controle genético do 'stay green'.....	9
2.4 Marcadores moleculares.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Material e procedimentos experimentais.....	15
3.2 Identificação de marcadores RAPD ligado ao 'stay green'.....	25
3.2.1 Extração de DNA.....	25
3.2.2 Obtenção dos bulks segregantes de DNA.....	26
3.2.3 Análise RAPD.....	26
3.2.4 Estimativa da frequência de recombinação entre o 'stay green' e o marcador.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	29
5. CONCLUSÕES.....	36
6. BIBLIOGRAFIA.....	37

RESUMO

CARMO, S.L.M. Avaliação de famílias e uso de RAPD para identificar o 'stay green' em feijão. Lavras : UFLA, 2001. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

Vários programas de melhoramento genético de feijoeiro no Brasil visam obter cultivares com menor índice de acamamento, ou seja, com porte ereto. Um dos caracteres relacionados a este fenótipo é o 'stay green, que é a senescência tardia do caule e folhas em relação às vagens. Com intuito de verificar a eficiência da seleção direta e encontrar um marcador molecular do tipo RAPD para o fenótipo 'stay green', utilizou-se a descendência do cruzamento entre as cultivares Carioca MG (com 'stay green') e Carioca 300 Vagens (sem 'stay green'). O caráter foi avaliado em 89 famílias F_{2-3} na safra da seca de 2000, e F_{2-4} na safra de inverno 2000. Juntamente com as famílias, foram incluídos os dois genitores e nove cultivares em um experimento em látice 10 x 10, com duas repetições nas secas e três repetições no inverno. Foi utilizado um diagrama de notas para avaliação do stay green. Verificou-se que a seleção direta foi pouco efetiva em razão da interação famílias x ambientes ser um complicador para obtenção de cultivares com esse fenótipo, como mostrou a herdabilidade realizada de 22,9%. Assim, identificou-se um marcador RAPD, amplificado pelo primer OPF04, o qual, no entanto, não se mostrou útil para se proceder a seleção indireta do fenótipo 'stay green', porque é praticamente independente.

Orientador : João Bosco dos Santos - UFLA.

ABSTRACT

CARMO S.L.M. Families performance and use of RAPD for tagging the 'stay green' in common bean . Lavras, 2001. (Dissertation - Master of Science in Genetics and Plant Breeding)

Some common bean breeding programs in Brazil aim to obtain upright cultivars. The stay green is one phenotype responsible for that type of plant habit, and it means late senescence of stem and leaves in relation to the pods. Aiming to verify the efficiency of selection for stay green, and also to find a RAPD marker linked to its allele there was crossed the cultivars Carioca MG (with stay green) and Carioca 300 VAGENS (without stay green). From that cross there were evaluated 89 F_{2,3} families in the dry season, and in winter of year 2000. Besides the families, both parents and 9 checks were included in the experiments using a 10 x 10 square lattice, with two replications in the dry season and three in the winter. The treatments were evaluated using a score diagram for stay green. Direct selection showed low efficiency due to the high families by environments interaction, as was confirmed by the realized heritability of only 22.9%. One RAPD marker was amplified by OPF04 primer although it is almost independent of stay green allele, therefore it is unuseful for assisting selection.

Adviser: João Bosco dos Santos - UFLA.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente nos programas de melhoramento do feijoeiro, têm-se buscado a obtenção de cultivares tão ou mais produtivas do que as que já se encontram no mercado, porém com um porte mais ereto. Isto porque as plantas mais eretas facilitam a condução da cultura, possibilitando uma fácil locomoção dos implementos agrícolas e redução da incidência de alguns patógenos, como exemplo o mofo branco (*Sclerotinia esclerotium* (Lib.) de Bary), por contribuir para um melhor arejamento da cultura, modificando, assim, o microclima favorável ao fungo. Além disso, as plantas eretas apresentam um menor índice de acamamento, proporcionam um menor contato das vagens com o solo úmido, reduzem as perdas e melhoram a qualidade do produto.

São vários os caracteres que se encontram associados com o porte mais eretos, dentre eles o fenótipo denominado 'stay green' (Duncan, Bockholt e Miller, 1981). Plantas com este fenótipo mantêm ramos verdes até a época da colheita, contribuindo, assim, para evitar o acamamento e, provavelmente, aumentar a eficiência fotossintética, refletida em melhor enchimento de grão.

No Brasil, o fenótipo 'stay green' é encontrado com frequência em cultivares de porte ereto tais como Rio Tibagi, FT Tarumã e Carioca MG. No entanto, mesmo com o conhecimento do controle genético do 'stay green', monogênico ou oligogênico, este caráter é bastante influenciado pelo ambiente e tem expressão somente no final do ciclo vegetativo (colheita), promovendo um atraso no desenvolvimento de novas cultivares. Uma alternativa para melhorar a eficiência da seleção do referido fenótipo consiste em realizá-la de forma indireta, de preferência na fase jovem da planta, em outro caráter de alta herdabilidade e altamente correlacionado

com o 'stay green'. Tal caráter pode ser um marcador molecular como o de DNA, obtido por meio do RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). A seleção por meio dos marcadores moleculares preenche os requisitos para se ter maior eficiência com a seleção indireta, com alta herdabilidade e correlação com o caráter de interesse, desde que esteja intimamente ligada a este.

Uma implicação desta alternativa é a de promover a identificação de plantas com 'stay green' em etapas iniciais de um programa de melhoramento por meio do uso de marcadores moleculares. Assim, os objetivos do trabalho foram verificar a eficiência de seleção de famílias com o fenótipo 'stay green' e identificar marcadores RAPD que o identifiquem.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O feijão-comum e sua importância

O feijão-comum é classificado como pertencente ao ramo Embryophytae Syphonogamae; sub-ramo Angiospermae; classe Dicotyledoneae; subclasse Archichlamydeae; ordem Rosales; família Leguminosae; subfamília Papilionoideae; tribo Phaseoleae; subtribo Phaseolineae; gênero Phaseolus L.; e espécie *Phaseolus vulgaris* L.

Phaseolus vulgaris L. é uma espécie diplóide com 11 pares de cromossomos, ou seja, $2n=2x=22$. Apresenta três centros de domesticação na América: uma na região central da América (México), de genótipos com sementes normalmente pequenas (<25g/100 sementes); outro no Sul do Andes, no qual predominam feijões de sementes grandes; e outro, de menor importância, ao Norte do Andes, com feijões de sementes pequenas (Gepts e Bliss, 1986; Gepts et al., 1986).

O feijão é uma planta autógama, com polinização do tipo cleistogâmica, por causa da estrutura de sua flor, na qual os órgãos masculinos e femininos são bem protegidos pelas pétalas, e também porque os grãos de pólen começam a cair sobre o estigma por ocasião da antese.

Contudo, ocorre uma taxa de fecundação cruzada natural que atinge, às vezes, proporções que trazem consequências para os trabalhos de melhoramento e para a manutenção da pureza das cultivares. A polinização cruzada é realizada por insetos e varia de lugar para lugar, devido à influência das condições do meio sobre a população e à atividade dos insetos. No entanto, tem-se demonstrado que a taxa de cruzamento é baixa, ficando entre pouco acima de zero a 6% (Vieira, 1960; Pompeu, 1963; Junqueira Netto e Lasmar Filho, 1971; Pacova e Rocha, 1975; Marques Júnior e Ramalho, 1995).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão-comum, com um consumo per capita de 17,84 Kg \ habitante \ ano, constituindo uma excelente fonte protéica na dieta do brasileiro (Agrianual, 2001). Além da sua importância para o brasileiro, essa leguminosa é um dos produtos agrícolas de grande expressão sócio-econômica, em virtude de ser cultivada em grandes áreas e da grande demanda de mão-de-obra empregada durante o seu ciclo de cultivo.

Notadamente a partir da década de 80, parte da cultura do feijão passou a ser explorada também pelo empresário agrícola, deixando de ser uma cultura de subsistência para se transformar em uma cultura de alta tecnologia, com uso de irrigação, uso balanceado de insumos e, às vezes, colheita mecanizada, sobretudo nas Regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. Esse produto agrícola constituiu uma das principais alternativas de cultivo de outono-inverno, ou seja, nos meses de maio a julho. No entanto, quando o feijoeiro é explorado em grandes áreas, um grande entrave que ainda se perpetua é a colheita mecanizada, podendo, inclusive, desmotivar os agricultores na expansão das lavouras.

Desse modo, então, é altamente desejável o desenvolvimento de cultivares adequadas à colheita mecanizada, que apresentem boa produtividade e possuam caule ereto, com poucas ramificações ou vagens inseridas em posição mais alta em relação ao nível do solo.

2.2 Arquitetura da planta

Em estudos do porte do feijoeiro ou arquitetura da planta, diversas características devem ser observadas: hábito de crescimento, número de nós, comprimento de entrenós, diâmetro do hipocótilo, número de ramificações, desenvolvimento do caule, duração e grau de lignificação, assim como altura de inserção da primeira vagem. Desse modo, maiores alturas da planta, aliadas a

um maior vigor, são essenciais para evitar o contato das vagens com o solo, preservar as qualidades da semente e viabilizar a colheita mecânica do feijoeiro. Com relação ao comprimento da haste principal e seus componentes primários, comprimento médio e número de internódios, o ideal é que uma planta vigorosa tenha um menor comprimento médio e um maior número de internódios (Santos e Vencovsky, 1986a).

Dentre as características do porte, o hábito de crescimento é o mais estudado, e pode ser dividido em hábito determinado ou indeterminado (Vilhordo et al., 1980; Singh, 1982). As plantas de hábito determinado desenvolvem inflorescência no final das gemas apicais do caule principal e das ramificações, do ápice para a base. As cultivares que apresentam este hábito têm um menor período de florescimento, ou seja, são mais precoces. Já nas plantas de hábito indeterminado, os meristemas apicais da haste principal e das ramificações não são terminados em inflorescência, caracterizando um florescimento mais prolongado e da base para o ápice, ou seja, acrópeto.

Os hábitos de crescimento, devido à diversidade de tipos de crescimento das plantas e para facilitar a comunicação entre os melhoristas, são agrupados em quatro tipos : I, II, III e IV.

Tipo I - Determinado: Apresentam inflorescência nas gemas apicais e laterais e altura em torno de 50 cm. Normalmente o período de floração é curto e a maturação é mais ou menos uniforme. Algumas cultivares com esse tipo são: Goiano Precoce; Manteigão Foscol 1; Novo Jalo, Ouro Branco.

Tipo II - Arbustivo Indeterminado com guia curta: As cultivares desse tipo apresentam um pequeno crescimento da gema apical, com poucas e curtas ramas laterais, sendo mais eretas, com dossel relativamente compactos. A altura média é de 70 cm, e a maturação das vagens é uniforme. São ideais para a colheita mecanizada. Como exemplos, têm-se as cultivares: Rio Tabagi; FT

Tarumã, BR 6-Barriga Verde, BR 1-Xodó, BR-IPA 10; Carioca MG; Rico 23; EMGOPA 201-Ouro.

Tipo III - Indeterminado com guia longa, mas não trepador: As cultivares enquadradas nesse tipo apresentam tendência trepadora com ramificação relativamente forte, e as gemas terminais vegetativas no caule principal e nos ramos, nos quais ocorre a produção depois que começa o florescimento. A altura das hastes principais pode atingir até 120 cm. Alguns cultivares desse tipo são: Aporé, Bambuí, Carioca; Mulatinho Paulista; Ouro Negro.

Tipo IV - Indeterminado com guia longa, trepador : As cultivares são trepadoras, com intensa produção de nós no caule principal, poucos ramos laterais e a haste principal atingindo mais de 2 m de comprimento. São mais adaptadas ao plantio consorciado e à colheita manual. Como exemplos de cultivares, têm-se : Flor de Mayo; Amarelinho de Cipó; Tomaba Morro; Preto de Cipó e Oaxaca.

Os tipos citados anteriormente podem ser subdivididos em subtipos, dificultando a correta classificação do hábito de crescimento. As características que permitem determinar os subtipos (Singh, 1982) são: Ia - ramos e caule principal geralmente fortes e eretos; Ib - ramos e caule principal fracos, prostrados e com alguma capacidade de trepar; IIa - não possui capacidade trepadora; IIb - ramos terminais longos, com alguma capacidade trepadora; IIIa - ramos relativamente curtos, com fraca capacidade trepadora; IIIb - ramos longos, prostrados ou entrelaçados, com moderada capacidade de trepar; IVa - carga de vagens distribuída por toda a planta; IVb - maioria das vagens concentrada na parte superior da planta.

Essa classificação apresenta dificuldades, pois o hábito de crescimento é muito influenciado pelo ambiente, podendo alterar a expressão do caráter em

função da temperatura, umidade e matéria orgânica, dificultando as avaliações. Além disso, o número de nós não é um bom indicador do tipo de crescimento devido à ampla variabilidade desse caráter dentro de um mesmo tipo (Vilhordo et al, 1980).

Visando melhorar a eficiência produtiva inspirada na revolução verde que aconteceu durante a década de sessenta, os melhoristas sentiram necessidade de buscar modificações na arquitetura das plantas, muito bem evidenciadas no milho, cevada, trigo e no arroz. No milho, a simples redução na altura das plantas, e a utilização de cultivares com folhas eretas permitiu uma maior produção por unidade de área em virtude do aumento da densidade de plantio. No arroz, os melhoristas tiveram a maior resposta à alta fertilidade do solo e à alta densidade de semeadura com o uso de plantas baixas, de caules firmes e folhas eretas, resultando em maior produção por unidade de área, menor acamamento e melhor intercepto da luz por meio das folhas (Donald, 1968).

Com esses procedimentos, desenvolveu-se o conceito de ideótipo de planta, ou seja, um conjunto de caracteres morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, anatômicos e fenológicos que auxiliam para uma maior eficiência fotossintética, caracterizando um modelo de planta que permite maior eficiência na utilização dos recursos (Donald, 1968; Rasmusson, 1987). Entretanto, o ideótipo deve ser considerado como um atributo dinâmico, variando entre as espécies e dentro da espécie, com a região de cultivo, finalidade da cultura, e evoluindo juntamente com as mudanças nas práticas agrícolas.

Adams (1973 e 1982) sugeriu um ideótipo para o feijoeiro considerando o sistema de monocultivo em condições favoráveis de umidade, luz, nutrientes e temperatura, com a cultura desenvolvida em em período de 100 dias, plantas espaçadas de 35 cm entre fileiras e 6 cm dentro das fileiras, ou seja, em torno de 500.000 plantas por hectare. O tipo ideal de planta por ele proposto foi descrito com base nas seguintes características morfológicas: hábito de crescimento

determinado, estreito, ereto; eixo central formado por um só caule ou com o mínimo de ramas eretas; grosso e vigoroso, com numerosos nós; taxa de crescimento que permita rápida acumulação de área foliar ótima; folhas numerosas, pequenas, capazes de se orientar verticalmente; ráculos axilares em cada nó, com muitas flores; vagens longas, com muitas sementes; sementes de maior tamanho possível, dentro dos limites da sua classe comercial; taxa fotossintética alta e constante em todas as folhas; e alta taxa de translocação dos produtos da fotossíntese das folhas para os órgãos de sua utilização.

No caso de cultivares destinadas ao consórcio com milho, o mesmo autor recomendou as seguintes características morfológicas: crescimento indeterminado com longos entrenós, muitas ramas, folhas médias a pequenas, grande número de flores por ráculo; grande número de sementes por vagem; ciclo vegetativo longo; alta eficiência fotossintética; alta capacidade de translocação dos produtos da fotossíntese para o órgão utilizador; e alto índice de colheita.

Na literatura, entre as características relacionadas ao ideótipo do feijoeiro, o porte da planta é que tem recebido uma maior atenção, isto porque as plantas mais eretas reduzem as perdas na colheita manual e mecânica, são mais resistentes ao acamamento e facilitam os tratamentos culturais (Santos e Vencovsky, 1986b; Acquah, Adams e Kelly, 1991; Brothers e Kelly, 1993).

Uma planta com hábito de crescimento tipo II apresenta um potencial produtivo menor, quando comparada com plantas que apresentam hábito tipo III, por possuir um menor número de nós, tendo como consequência um menor número de gemas capazes de produzir inflorescência. No entanto, tem sido possível obter cultivares com hábito tipo II tão produtivas quanto às de tipo III com o emprego da seleção (Konerday, White e Cruz, 1992; Malburg e Kelly, 1992; Brothers e Kelly, 1993; Collicchio, 1995). Plantas de hábito de crescimento indeterminado com guia curta apresentam uma maior eficiência

produtiva quando comparadas com plantas do tipo III, isto porque as primeiras são eretas, com a maioria das vagens na região central do caule, enquanto as plantas do tipo III apresentam 70% de suas vagens na região basal (Kelly e Adams, 1987), caracterizando uma menor qualidade do produto final devido ao maior contato daquelas com o solo. Também tem-se verificado que as plantas mais eretas apresentam uma menor incidência de patógenos, principalmente mofo branco (*Sclerotinia sclerotium* (Lib.) de Bary), porque o microclima gerado na região inferior das plantas de hábito tipo II é modificado, caracterizando um melhor arejamento da cultura (Coyne, 1980).

2.3 Controle genético do stay green

Há consenso entre os melhoristas que o fenótipo 'stay green' é importante para assegurar plantas mais eretas, principalmente porque a senescência do caule é mais tardia, só ocorrendo após a maturação fisiológica das vagens.

O processo de senescência tardia do caule, 'stay green', é observado em algumas espécies de importância agrônoma como: milho, sorgo, girassol e feijão. (Duvick, 1992; Thomaz e Smart, 1993; Genchev, 1993).

É verificado em milho, sorgo e girassol que as cultivares com 'stay green' são mais resistentes ao acamamento e ao estresse hídrico, além de serem mais tolerantes a pragas e doenças (Duncan, Bockholt e Miller, 1981). No entanto, no que diz respeito à cultura do feijoeiro, são necessárias mais pesquisas sobre o assunto para melhor esclarecimento a respeito dos benefícios trazidos pelo 'stay green'.

Visando estudar o controle genético do 'stay green' em feijão, Aguiar (1999) utilizou as gerações F_2 , F_2RC_{11} e F_2RC_{21} de um cruzamento envolvendo genitores que variavam na expressão do caráter, concluindo que houve

predominância dos efeitos dominantes e que o controle deve ser monogênico ou oligogênico, havendo também uma forte influência do ambiente sobre a característica. Entretanto, em sorgo observou-se que os genes se manifestaram de forma dominante sob condições de cultivo normal, e sob estresse hídrico houve predominância dos efeitos aditivos (Walulu et al, 1994). Já em girassol, mesmo detectando significância para os efeitos aditivos, dominantes e de epistasia aditiva x dominante, ocorreu predominância dos efeitos aditivos (Culkadar-Olmedo e Miller, 1997; Culkadar-Olmedo, Miller e Hammond, 1997).

Embora o controle genético do 'stay green' do feijoeiro seja mono ou oligogênico, a acentuada influência do ambiente dificulta a seleção. Desse modo, uma alternativa para melhorar a eficiência da seleção do referido fenótipo consiste em realizá-la de forma indireta, por meio de marcadores como os de DNA.

2.4 Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares de DNA diferenciam-se pela tecnologia utilizada, revelando a variabilidade em relação ao DNA, sendo classificados em dois grupos, ou seja, os que envolvem o processo de hibridação e os que promovem a amplificação do DNA (Milach, 1998).

Entre os marcadores que são caracterizados pela hibridação, encontram-se os RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") e minisatélites ou locos VNTR ("Variable Number of Tandem Repeats"). Entre os que utilizam a amplificação, estão o PCR ("Polymerase Chain Reaction"); RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"); SCAR ("Sequence Characterized Amplified Regions"); Microssatélites e AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism") (Milach, 1998).

~~_____~~

Em meados da década de 80, a tecnologia de reação de polimerase em cadeia (PCR) foi estabelecida por Kary Mullis (Mullis e Faloona, 1987; Saiki et al., 1985). A partir de então, esta tecnologia promoveu um avanço na pesquisa biológica, tanto quanto ao entendimento dos processos biológicos fundamentais como nas áreas aplicadas a diagnósticos e melhoramento genético de plantas e animais.

PCR é uma técnica fácil, rápida, versátil, é uma poderosa ferramenta para estudos genéticos moleculares e se baseia na síntese in vitro de segmentos de específicos de DNA na presença da enzima DNA polimerase termorresistente. A reação de PCR é processada por meio do anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores que delimitam a sequência de DNA de fita dupla alvo da amplificação.

Durante um ciclo de PCR ocorrem três fases : desnaturação, anelamento e extensão. Na primeira, a hélice dupla do DNA de interesse é desnaturada pela elevação da temperatura para 92 a 95°C. Na segunda, a temperatura é reduzida para 35 a 60°C, dependendo preferencialmente do tamanho e da sequência do primer utilizado de modo a permitir a hibridização DNA-DNA de cada primer com as sequências complementares que flanqueiam a região alvo, o que constitui o anelamento. Posteriormente, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos primers. Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a sequência-alvo, de maneira que uma cópia desta sequência é feita no processo. Este ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes por meio de um termociclador, que fornece as temperaturas e os respectivos tempos adequados para realização de cada etapa. Assim, a sequência de interesse dobra a cada ciclo em uma progressão geométrica, de modo que a quantidade inicial da sequência alvo é produzida mais de um milhão de vezes.

Uma limitação do PCR para uso em larga escala advém da necessidade de conhecimento prévio das sequências de fragmentos de DNA para obtenção dos primers. Uma modificação do PCR resultou no RAPD, que promove a amplificação simultânea de vários locos anônimos no genoma utilizando primers de sequência aleatória (Williams et al., 1990).

O RAPD se diferencia do PCR em basicamente duas características distintas, isto é, o primeiro utiliza "primer" único ao invés de um par de "primers" e esse tem sequência aleatória. Desse modo, sua sequência-alvo é desconhecida.

A amplificação de um fragmento RAPD no genoma em estudo ocorre quando duas sequências de DNA complementares ao "primer" arbitrário estão suficientemente adjacentes (< 4000 pares de bases) e em orientação oposta, de maneira a permitir a amplificação exponencial de um segmento de DNA pela DNA polimerase. A partir de então, o segmento de DNA amplificado pode ser visualizado em gel de eletroforese corado com o brometo de etídio, em luz ultravioleta.

Assim, o polimorfismo genético detectado pelos marcadores RAPD tem natureza binária, isto é, quando se comparam dois genótipos, um por ter um fragmento de DNA amplificado e o outro não. Diferenças de apenas um par de bases (mutações de ponto) são suficientes para causar a não complementariedade do primer com o sítio de iniciação e, assim, impedir a amplificação de um segmento (Williams, 1990). Uma característica importante dos marcadores RAPD é que estes comportam-se como marcadores genéticos dominantes, isto é, ao se observar uma banda no gel, não é possível distinguir se aquele segmento se originou a partir de uma ou de duas cópias da sequência amplificada. Então, a detecção dos segmentos RAPD não tem sensibilidade quantitativa suficiente para discriminar o heterozigoto (Aa) do homozigoto (AA). Desse modo, o genótipo homozigótico "recessivo" (aa) é identificado pela ausência da banda no

gel e os genótipos homozigótico "dominante" (AA) e heterozigótico são colocados juntos na mesma classe fenotípica, ou seja, presença da banda. Assim, a técnica RAPD detecta apenas dois alelos em cada loco.

O uso de RAPD ampliou significativamente o número de associações entre marcadores moleculares e caracteres de herança mono ou oligogênica de importância econômica. O grande número de marcadores distribuídos pelo genoma permite uma amostragem mais completa na busca de ligação gênica com o loco de interesse. Desse modo, a técnica tem sido amplamente empregada tanto na identificação de diversidade genética quanto na marcação de genes de interesse agrônômico, como os genes responsáveis por reação a patógenos em diversas culturas, como feijoeiro (Nodari et al., 1993; Adam-Blodon et al., 1994; Haley, Afanador e Kelly, 1994; Kelly, 1995; Miklas, Johnson e Stone, 1996; Young e Kelly, 1996; Castanheira, Santos e Melo, 1996; Santos, Castanheira e Melo, 1996; Alzate-Marin et al., 1997; Young e Kelly, 1997; Kelly e Miklas, 1998; Young et al., 1998; Arruda, 1998; Castanheira et al., 1999; Silva, 2000); alface (Paran e Michelmore, 1993) e tomate (Martin, Williams e Tanksley, 1991); na virulência e diversidade genética de *Colletotrichum lindemuthianum* (Otoya et al., 1993; Vilarinhos et al., 1995; Mesquita, 1997; Alzate-Marin et al., 1999); na identificação de híbridos verdadeiros em feijão (Alzate-Marin et al., 1996).

A identificação de marcadores em atração e em repulsão pode caracterizar um aumento na eficiência da seleção assistida por marcadores moleculares do tipo RAPD, quando aqueles encontram-se fortemente ligados e flanqueando o alelo de interesse. Caso esse alelo seja dominante, os marcadores em repulsão estarão nos indivíduos homozigotos recessivos ou heterozigotos (Alzate-Marin et al., 1997; Haley, Afanador e Kelly, 1994; Young e Kelly, 1997).

Para os melhoristas que lançam mão da biologia molecular como ferramenta de seleção, identificando alelos de importância agrônômica, um procedimento muito eficiente é a utilização de misturas de DNA de indivíduos homocigotos para o loco de interesse em populações segregantes, principalmente em F₂. Esta estratégia foi inicialmente proposta por Arnheim et al. (1985), sendo posteriormente modificada por Michelmore et al. (1991), que propuseram seu uso para rápida identificação de marcadores em regiões específicas do genoma utilizando populações segregantes, recebendo o nome de Bulk Segregant Analysis (BSA).

Esta técnica se baseia na seleção de indivíduos com base nos fenótipos extremos de uma população segregante para a característica de interesse. A partir de então, as amostras agrupadas são construídas ao misturar quantidades iguais de DNA dos indivíduos selecionados, tendo uma amostra de DNA com genótipos idênticos em uma região genômica de interesse e genótipos ao acaso em regiões não ligadas à região alvo. Assim, as duas amostras tendem a diferir somente na região alvo e são monomórficas para todas as outras regiões.

Com isso, o BSA tem sido muito utilizado na identificação de marcadores ligados a genes responsáveis por características de herança simples.

Assim, em virtude do 'stay green' do feijão ter um controle mono ou oligogênico, há a possibilidade de identificar marcadores RAPD por meio do BSA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Genética Molecular e na área experimental do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no Sul de Minas Gerais (21°14' S, 45°00' W, 900 m de altitude), latossolo vermelho-escuro e clima CWb, de acordo com a classificação climática de Koppen.

3.1 Material e procedimentos experimentais

Foram utilizadas 89 famílias, cada uma descendente de uma planta da geração F_2 do cruzamento Carioca MG (com stay green) x Carioca 300 Vagem (sem stay green).

As 89 famílias $F_{2,3}$ mais os genitores e 9 cultivares foram avaliadas durante o período da seca, em 2000 (semeadura em fevereiro). Utilizou-se o delineamento de látice simples 10 x 10, sendo a parcela representada por uma linha de 1m com 15 plantas. No inverno de 2000 (semeadura em julho), os mesmos tratamentos foram avaliados na geração $F_{2,4}$, em um látice triplo 10 x 10. A parcela foi representada por uma linha de 2m com 30 plantas. Foram empregados os tratos culturais normais para a cultura do feijão, acrescidos da irrigação por aspersão sempre que necessário.

As famílias foram avaliadas para o fenótipo 'stay green' por meio de um diagrama único de notas (Walulu et al.. 1994, Aguiar 1999). Nesse diagrama, a nota 1 refere-se à presença do 'stay green' em todas as plantas e a nota 5 à ausência em todas as plantas; já notas de 2 a 4 referem-se a proporções variáveis

de plantas com e sem 'stay green'. Anotou-se também a produtividade de grãos em gramas por parcela.

Os dados de 'stay green' foram submetidos à análise de variância de acordo com o seguinte modelo estatístico :

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

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

m : média geral;

t_i : efeito aleatório do tratamento i (sendo $i = 1, \dots, 100$);

r_j : efeito da repetição j (sendo $j = 1, 2$ ou 3);

$b_{k(j)}$: efeito do bloco incompleto k dentro da repetição j ($k = 1, \dots, 10$);

$e_{ij k}$: erro experimental associado a observação $Y_{ij k}$.

A partir do modelo, realizou-se a análise de variância em cada geração (Tabela 1) e estimaram-se as variâncias genética e fenotípica, bem como a herdabilidade no sentido amplo e os respectivos limites superior e inferior.

I. Estimador da variância genética ($\sigma^2_{G_{F2I}}$) na geração I:

$$\sigma^2_{G_{F2I}} = \frac{Q_1 - Q_6}{r}$$

II. Estimador da variância fenotípica ($\sigma^2_{F_{F2I}}$) na geração I:

$$\sigma^2_{F_{F2I}} = \frac{Q_1}{r}$$

III. Estimador da herdabilidade no sentido amplo (h^2_{al}) na geração I, :

$$h^2_{al} = \frac{\sigma^2_{GF2:I}}{\sigma^2_{FF2:I}}$$

TABELA 1. Esquema da análise de variância e esperanças matemáticas dos quadrados médios da análise individual do látice.

F.V.	QM	E(QM)
Repetição		
Tratamentos		
Famílias	Q ₁	$\sigma_e^2 + r\sigma^2_{GF2:I}$
Genitores	Q ₂	
Cultivares	Q ₃	
Famílias vs Genitores	Q ₄	
Famílias vs Cultivares	Q ₅	
Erro efetivo	Q ₆	σ_e^2

r : número de repetições.

$\sigma^2_{GF2:I}$: variância genética entre as famílias originadas de plantas F₂ na geração I;

IV. Estimadores dos limites superior (LS) e inferior (LI) das herdabilidade no sentido amplo na geração I (Knapp, Stroup e Ross, 1985), adotando-se a probabilidade de $1 - \alpha = 0,95$:

$$LI = \left\{ 1 - \left[\left(\frac{QM_{famílias}}{QM_{Erro}} \right) F_{1-\frac{\alpha}{2}; GL_{Erro}; GL_{famílias}} \right]^{-1} \right\}$$

$$LS = \left\{ 1 - \left[\left(\frac{QM \text{ familias}}{QMErro} \right) F_{\frac{\alpha}{2}; GL_{Erro}, GL_{familias}} \right]^{-1} \right\}$$

Com interesse de verificar o efeito da interação famílias x ambientes, realizou-se a análise conjunta, utilizando as médias ajustadas das análises individuais de acordo com o seguinte modelo estatístico :

$$Y_{ijk} = m + t_i + r_{j(k)} + g_k + (tg)_{ik} + e_{ijk}$$

Y_{ijk} : valor observado na parcela que recebeu o tratamento i , na repetição j , dentro da geração k ;

m : média geral;

t_i : efeito aleatório de tratamento i (sendo $i = 1, \dots, 100$);

G_k : efeito fixo da geração g (sendo $k = 1, 2$);

$r_{j(k)}$: efeito aleatório da repetição j , dentro da geração g ($k = 1, 2$);

$(tg)_{ig}$: efeito da interação do tratamento i com a geração g ;

e_{ijk} : erro experimental médio.

Utilizando as médias ajustadas das famílias das análises individuais, estimou-se a variância genética entre as mesmas por meio da covariância ($COV_{x, x'}$), usando a expressão:

$$COV_{x, x'} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i x'_i - \frac{(\sum x_i)(\sum x'_i)}{n}}{n-1}$$

x_i : média da família i na geração $F_{2,3}$, onde ($i : 1, \dots, 89$);

x'_i : média da família i na geração $F_{2,4}$, onde ($i : 1, \dots, 89$).

A variância fenotípica foi estimada respeitando o modelo estatístico da análise conjunta (Tabela 2).

I. Variância fenotípica entre as famílias :

$$\sigma^2_F = \frac{Q_1}{rg}$$

II. Herdabilidade no sentido amplo :

$$h^2_a = \frac{COV_{x x'}}{\sigma^2_F}$$

TABELA 2:Esquema da análise de variância e esperanças matemáticas dos quadrados médios da análise conjunta para o caráter 'stay green'.

F.V.	QM	E(QM)
Geração		
Tratamentos		
Famílias	Q ₁	$\sigma_e^2 + rg\sigma_G^2$
Genitores	Q ₂	
Cultivares	Q ₃	
Famílias vs Genitores	Q ₄	
Famílias vs Cultivares	Q ₅	
Tratamento x geração	Q ₆	
Famílias x geração	Q ₇	$\sigma_e^2 + r \frac{g}{g-1} \sigma_{GE}^2$
Genitores x gerações	Q ₈	
Cultivares x gerações	Q ₉	
Famílias vs Genitores x gerações	Q ₁₀	
Famílias vs Cultivares x gerações	Q ₁₁	
Erro médio	Q ₁₂	σ_e^2

g : número de gerações.

r : número de repetições.

σ_G^2 : variância genética entre as famílias originadas de plantas F₂.

III. Estimativa dos limites superiores(LS) e inferiores(LI) da herdabilidade no sentido amplo, referente à análise conjunta:

$$LI = \left\{ 1 - \left[\left(\frac{QM_{Famílias}}{Q_{Merro}} \right) F_{1-\frac{\alpha}{2}; GL_{Erro} GL_{Famílias}} \right]^{-1} \right\}$$

$$LS = \left\{ 1 - \left[\left(\frac{QM_{Famílias}}{Q_{Merro}} \right) F_{\frac{\alpha}{2}; GL_{Erro} GL_{Famílias}} \right]^{-1} \right\}$$

IV. Estimativa da variância da interação famílias x gerações :

$$\sigma_{GE}^2 = \frac{Q_7 - Q_{12}}{r}$$

Então promoveu-se a decomposição dos componentes da variância da interação de acordo com a expressão apresentada por Cruz e Regazzi (1994):

$$\sigma_{GE}^2 = \frac{1}{4} (\sigma_I - \sigma_{I'})^2 + \frac{1}{2} \sigma_I \cdot \sigma_{I'} (1 - r_{II'})$$

onde :

$r_{II'}$: correlação genética entre as médias das famílias nas gerações I e I';

$\sigma_{I'}$: desvio padrão da variância genética entre famílias $F_{2,3}$, na geração I';

$\sigma_{I'}$: desvio padrão da variância genética entre famílias F_{2:4}, a geração I.

Utilizando o desempenho médio das famílias ao longo das gerações, promoveu-se o cálculo da herdabilidade realizada (h^2_{RIF}) e o ganho realizado (GS_R) com objetivo de verificar o efeito da seleção precoce sobre o caráter 'stay green', utilizando a média das 10 famílias com as menores notas para o fenótipo, de acordo com a expressão (Fehr 1987):

$$h^2_{RIF} = \frac{m_{SI'} - m_{I'}}{m_{SI} - m_{I}}$$

em que :

$m_{SI'}$ e m_{SI} : média das famílias selecionadas nas gerações I' e I;

$m_{I'}$ e m_{I} : média geral das famílias nas gerações I' e I.

$$GS_R = \frac{m_{SI'} - m_{I'}}{m_{I'}} \cdot 100$$

em que :

$m_{SI'}$ = média das 10 melhores famílias em F_{2:3} avaliadas em F_{2:4};

$m_{I'}$ = média geral da geração F_{2:4}.

Foram estimadas as correlações genéticas e fenotípicas entre o 'stay green'(x) e produção de grãos(y) (g/parcela). Para isso foram estimadas as covariâncias a partir da análise de variância dos dois caracteres (TABELA 3).

TABELA 3: Resumo das análises de variâncias do 'stay green' (x), da produção de grãos (y) e da soma dos dois caracteres (x + y) relativos à avaliação das famílias na geração i(F_{2,3} e F_{2,4}).

FV	QM _x	QM _y	QM _(x+y)	PM	E(PM)
FAMÍLIAS	Q ₁	Q ₂	Q ₃	PM ₁ =1/2(Q ₃ - Q ₂ - Q ₁)	Cov _{ei(x,y)} + rCov _{Gi(x,y)}
ERRO	Q ₄	Q ₅	Q ₆	PM ₂ =1/2(Q ₆ - Q ₄ - Q ₅)	Cov _{ei(x,y)}

Com base nas esperanças dos produtos médios, estimaram-se as covariâncias genética e fenotípica em cada geração.

I. Covariância fenotípica média entre os caracteres x e y (Cov_{F(x,y)}):

$$\text{Cov}_{F(x,y)} = \frac{PM_1}{r}$$

II. Covariância genética entre os caracteres x e y (Cov_{G(x,y)}):

$$\text{Cov}_{G(x,y)} = \frac{PM_1 - PM_2}{r}$$

III. Coeficiente de correlação fenotípica ($r_{F(x,y)}$):

$$r_{F(x,y)} = \frac{Cov_{F(x,y)}}{\sqrt{\sigma_{F(x)}^2 \cdot \sigma_{F(y)}^2}}$$

IV. Coeficiente de correlação genética entre x e y ($r_{G(x,y)}$), em cada geração:

$$r_{G(x,y)} = \frac{Cov_{G(x,y)}}{\sqrt{\sigma_{G(x)}^2 \cdot \sigma_{G(y)}^2}}$$

onde :

$\sigma_{G(x)}^2$: variância genética para o caráter x, na geração i;

$\sigma_{G(y)}^2$: variância genética para o caráter y, na geração i;

V. Correlação genética ($r_{G(x,y)}$) considerando média entre x e y das duas gerações:

$$r_{G(x,y)} = \frac{Cov_{G(x,y)}}{\sqrt{\sigma_{G(x)}^2 \cdot \sigma_{G(y)}^2}}$$

onde $Cov_{G(x,y)}$ é a covariância média entre o caráter 'stay green' avaliado na geração F_{2,3} e a produção avaliada na geração F_{2,4}, e vice-versa. Porém, $\sigma_{G(x)}^2$ é a variância genética do caráter 'stay green' e corresponde à covariância entre o

'stay green' avaliado na geração F₂₃ e F₂₄. De modo semelhante, estimou-se a variância genética para o caráter produção $\sigma_{G(y)}^2$.

As significâncias de r_G e r_F foram testadas pelo teste t.

3.2 Identificação de marcadores RAPD ligados ao 'stay green'.

3.2.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi feita usando um procedimento semelhante ao utilizado por Nienhuis *et al.* (1995). De cada planta F₂ foram colhidos aproximadamente 2 gramas de folhas jovens, as quais foram trituradas em 10 ml de tampão de extração a 65°C em 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, juntamente com 20 μ l de β -mercaptoetanol, e incubado por 30 minutos em banho-maria a 65°C. Após o banho-maria, foi realizada a primeira etapa da 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. Foi coletado o sobrenadante e adicionado a 30 ml da mistura álcool 95% : acetato de amônio (7,5M), precipitando os ácidos nucléicos. Esta mistura foi colocada no freezer por pelo menos uma hora. Em seguida, os ácidos nucléicos precipitados foram transferidos para tubos de microcentrífuga e rehidratados em tampão TE (1 mM de TRIS e 0.1 mM de EDTA). Foi realizada uma segunda etapa da extração com clorofórmio-álcool isoamil e o sobrenadante foi precipitado pela adição de pelo menos três volumes de uma mistura de acetato de sódio (3M) : etanol 95% (1:20). Após a precipitação, o DNA foi rehidratado em tampão TE, quantificado, utilizando o

fluorímetro Hoffer TKO100, e diluído para concentração de 10 ng/ μ l utilizada em reação.

3.2.2 Obtenção dos bulks segregantes de DNA

Após a extração do DNA das plantas F_2 e a identificação das classes genotípicas destas por meio das plantas em famílias $F_{2,4}$, foram formadas duas misturas (bulks) de DNA: uma somente com DNA de dez plantas homozigóticas com 'stay green' e outra com dez homozigótica sem 'stay green'. Os DNA's de cada planta foram misturados de forma equitativa, para que todas as plantas fossem igualmente representadas no bulk.

A identificação das classes genotípicas das plantas F_2 foi feita a partir da avaliação das famílias no experimento de inverno de 2000, da seguinte forma. A família que mostrou 100% dos caules verdes foi proveniente de uma planta F_2 , provavelmente homozigótica para o fenótipo c 'stay green', recebendo nota 1, e a família que se mostrou segregante foi proveniente de uma planta F_2 , com o fenótipo 'stay green' e heterozigótica, as quais receberam notas intermediárias, ou seja, notas 2, 3 e 4. Aquelas famílias que se mostraram 100% sem o caule verde foram provenientes de plantas F_2 , provavelmente homozigóticas para o fenótipo sem 'stay green', recebendo, assim, nota 5.

3.2.3 Análise de RAPD

A reação de RAPD foi preparada em volume de 10 μ l, os quais se misturaram os seguintes ingredientes, com as respectivas concentrações: 200 μ M dNTP's; 0,6 unidades de Taq DNA polimerase; 0,4 μ M de primer; tampão de reação (50mM tris; 2,0 mM $MgCl_2$; 20 mM KCl; 250 μ g/ml de albumina de soro bovino; 1% de ficol 400; 1mM de tartrazine); 20 ng de DNA e água pura. As

reações foram realizadas em tubos capilares de vidro, em um termociclador refrigerado a ar. O termociclador foi programado para 40 ciclos, com as seguintes condições: 60 segundos para desnaturação a 91°C nos dois primeiros ciclos; 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, reduzido 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.

Foram utilizados 700 primers decanucleotídeos na análise dos bulks segregantes. O primer que produziu uma banda polimórfica nos bulks foi utilizado para a análise de toda população F₂.

3.2.4 Estimativa da frequência de recombinação entre o 'stay green' e o marcador

A estimativa da frequência de recombinação entre o alelo para 'stay green' e o fragmento de DNA polimórfico nos bulks foi realizada por meio do procedimento da máxima verossimilhança (Allard, 1956), utilizando a seguinte expressão:

$$D = N^{\circ} \text{Re} \left[\frac{2(p-1)}{3-2p+p^2} \right] + N^{\circ} (\text{Re}0 + \text{Se}1) \left[\frac{2(1-p)}{p(2-p)} \right] + N^{\circ} \text{Se}0 \left(\frac{2}{p-1} \right)$$

$$I = N \times I_p \quad A = D / I \quad p' = p + A$$

Onde:

D: indicador do ajuste do modelo

p: frequência de recombinação inicial arbitrária

p': frequência de recombinação ajustada

Re1 : plantas com stay green e com banda

Re0: plantas com stay green e sem banda

Se1 : plantas sem stay green e com banda

Se0: plantas sem stay green e sem banda

I: índice de ajuste do modelo

Ip: índice tabelado

A: ajuste final do modelo

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As análises de variância individuais das famílias $F_{2,3}$ e $F_{2,4}$, baseadas no caráter 'stay green', estão apresentadas na tabela 4. Fica evidenciada, em nível de 1% de significância, a diferença entre as famílias quanto ao 'stay green'.

A precisão experimental, avaliada por meio do coeficiente de variação (Tabela 4), foi semelhante nas duas gerações. Apesar de ter sido utilizada a média de dois avaliadores, os valores de CV foram relativamente altos, semelhantes aos que têm sido obtidos para a produtividade de grãos em experimentos de campo e também semelhantes ao obtido por Aguiar (1999) para a avaliação do 'stay green'. Embora tenha sido utilizado o diagrama com apenas cinco notas, o que aparentemente facilitaria a identificação dos diferentes fenótipos, a grande dificuldade decorre da influência do ambiente na expressão do caráter. Considerando esse fato, os experimentos foram conduzidos nos períodos de seca e inverno, quando se pode controlar a umidade por meio da irrigação. Na cultura do feijão na época das águas, geralmente ocorre excesso de chuvas e a sua distribuição é desuniforme, ocasionando maior irregularidade de expressão do 'stay green'. Entretanto, há que se considerar também que a irrigação, embora seja mais uniforme quanto à periodicidade de volume de água fornecido para o experimento, provoca irregularidade de distribuição dentro da área e pode ser uma das causas do aumento do erro experimental, como evidenciado pela eficiência do látice. Vale salientar, ainda, que a avaliação das famílias durante o período de inverno-primavera ($F_{2,4}$), no Sul de Minas Gerais, foi provavelmente a mais eficiente, porque os fenótipos dos genitores foram como era esperado, isto é, com 'stay green' para o Carioca MG e sem 'stay green' para o Carioca 300 Vagens. Nas época das secas, as notas médias dos genitores foram 3,989 para o Carioca MG e 4,011 para o Carioca 300 Vagens.

TABELA 4:Resumo das análises de variância individuais do caráter 'stay green' avaliado nas famílias F₂₃ e F₂₄, em Lavras 2000.

F.V.	G.L.(F ₂₃)	QM(F ₂₃)	G.L.(F ₂₄)	QM(F ₂₄)
Repetição	1		2	
Tratamentos	99	1,211 **	99	1,523 **
Famílias	88	1,244 **	88	1,494 **
Genitores	1	0,042 ns	1	4,528 **
Cultivares	8	1,105	8	1,744
Famílias vs Genitores	1	1,424 **	1	0,190 ns
Famílias vs Cultivares	1	0,060 ns	1	0,672
Erro efeti vo	81	0,52	171	0,398
CV (%)		25,25		22,83
Eficiência do látice (%)		1,15		1,26

**significância em nível de 1% pelo teste F.

Com base nas médias ajustadas das famílias das duas gerações, processou-se a análise conjunta, segundo Tabela 5. Verificou-se que os efeitos famílias e interação famílias por gerações foram altamente significativos. Especificamente a alta significância das interação indica que a magnitude de 'stay green' das famílias não foi coincidente nas duas gerações. Quando se decompôs a interação, constatou-se que praticamente toda ela é de natureza complexa (95,25%).

Conforme mostrou Aguiar (1999), provavelmente um ou cinco genes controlam o caráter. Poder-se-ia, então, atribuir a interação ao fato de se terem utilizado famílias de duas gerações diferentes (F₂₃ e F₂₄). Entretanto, principalmente se o controle genético do caráter é monogênico com dominância na expressão (Aguiar 1999), espera-se ter, em F₂₃, famílias com 'stay green', sem 'stay green' e famílias com 'stay green' segregantes, na proporção de 3 plantas

com e uma sem 'stay green' em cada. Já em $F_{2:4}$, espera-se ter famílias também com 'stay green', sem 'stay green' e famílias com 'stay green' segregantes, na proporção de 5 plantas com e 3 sem 'stay green' em cada. Portanto, o uso de gerações diferentes não deve ter contribuído para aumentar a interação, uma vez que são poucos os genótipos diferentes para o caráter e, certamente, não houve problema de amostragem de uma geração para a outra, mesmo utilizando parcelas pequenas.

TABELA 5: Resumo da análise de variância conjunta do caráter 'stay green' avaliado nas famílias $F_{2:3}$ e $F_{2:4}$.

F.V.	GL	QM
Geração	1	
Tratamentos	99	1,8744 **
Famílias	88	1,9579 **
Genitores	1	1,821 *
Cultivares	8	1,3392 **
Famílias vs Genitores	1	0,5064 ns
Famílias vs Cultivares	8	0,1750 ns
Tratamento x geração	99	0,7968 **
Famílias x geração	88	0,7296 **
Genitores x gerações	1	1,7299 ns
Cultivares x gerações	8	1,381 **
Famílias vs Genitores x gerações	1	1,2346 ns
Famílias vs Cultivares x gerações	1	0,7714 ns
Erro médio	252	0,4591
CV (%)		20,52

**significância em nível de 1% pelo teste F.

Assim, o que certamente ocorreu é a alta sensibilidade do caráter às variações ambientais, o que indica a grande dificuldade que o melhorista terá para seleção de famílias com maior 'stay green'.

As estimativas das variâncias genéticas e fenotípicas das famílias, bem como da interação famílias por gerações, encontram-se na Tabela 6, tanto a partir das análises individuais quanto da conjunta. Já as estimativas de herdabilidade no sentido amplo (h^2_a), com base nos dados de cada geração e da média das gerações, encontram-se na Tabela 7.

TABELA 6: Estimativas das variâncias genéticas e fenotípicas das gerações e da análise conjunta.

Variâncias	F ₂₃	F ₂₄	Conjunta
σ^2_G	0,362	0,3653	0,3114
σ^2_F	0,622	0,498	0,4079
σ^2_{GE}	—	—	0,0555
σ^2_{GE} simples	—	—	0,0025
σ^2_{GE} complexa	—	—	0,0529

TABELA 7: Estimativas das herdabilidades no sentido amplo do caráter 'stay green', a partir dos dados das análises individuais e conjunta, e seus respectivos limites superiores e inferiores.

Geração	Estimativa	LI	LS
F ₂₃ (%)	58,20	35,89	72,85
F ₂₄ (%)	73,35	61,18	81,32
Conjunta(%)	76,34	67,38	83,64

De posse destes resultados, constata-se mais uma vez a variabilidade genética e fenotípica para o caráter em estudo. Apesar da interação ser principalmente do tipo complexa, ela representou cerca de 35,65% da variação genética entre famílias. Por isso, as estimativas de herdabilidade podem ser consideradas altas.

Apenas em F_{23} ela foi de 58,2%, provavelmente devido ao erro experimental ligeiramente superior, em consequência da utilização do menor tamanho da parcela.

Esses resultados de herdabilidade indicam que se terá sucesso com a seleção fenotípica. Os ganhos estimados com base nas avaliações individuais e conjunta encontram-se na Tabela 8. Entretanto, mais uma vez se observa o efeito da interação do tipo complexa, dificultando o sucesso esperado com a seleção, quando se realiza a seleção em um ambiente para obter ganho em outro, como mostra a herdabilidade realizada de 22,3%. Como se nota, o ganho realizado em F_{24} a partir da seleção das 10 melhores famílias em F_{23} foi baixo, quando comparado com os ganhos baseados nos parâmetros genéticos das duas gerações. Considerando a seleção das 10 melhores famílias com base na média das duas gerações, apenas quatro seriam ideais no período da secas e quatro no período de inverno-primavera.

Considerando a dificuldade para selecionar o fenótipo 'stay green' e, por outro lado, a suposição de que cultivares com 'stay green' devem ser favoráveis,

TABELA 8: Estimativas dos ganhos com a seleção considerando a média das 10 famílias de maior expressão do fenótipo 'stay green'.

Estimativa	F_{23}	F_{24}	Conjunta
GS	-0,5915(20,72%)	-0,7975(28,86%)	-0,7203(25,64%)
GS _R (%)	-	-0,2335(8,45%)	-

porque devem contribuir para que as plantas tenham porte mais ereto e melhor enchimento de grãos (Rosenow, Woodfin e Clark, 1988), é interessante avaliar a associação do caráter com produtividade de grãos (Tabela 9). Os resultados de correlação, embora baixos, indicam que genótipos com maior 'stay green' (notas entre 1 e 2) realmente devem contribuir para a maior produtividade de grãos.

O panorama que se observa é a importância da obtenção de cultivares com 'stay green' o que, à primeira vista, pode parecer fácil em face do controle genético monogênico ou oligogênico (Aguiar 1999). Entretanto, a sensibilidade do caráter aos fatores ambientais, gerando principalmente uma inversão na expressão dos fenótipos com e sem 'stay green' em diferentes ambientes, torna difícil o sucesso com a seleção direta. Assim, uma alternativa é praticar a seleção indireta por meio de marcadores do tipo RAPD ligados ao 'stay green'.

A análise dos bulks por meio do RAPD permitiu a identificação de um marcador amplificado pelo primer OPF4, provavelmente ligado ao 'stay green'. O primer OPF4 foi então utilizado para a análise RAPD da população F_2 . De posse dos dados de RAPD e da expressão do caráter com e sem 'stay green' das plantas F_2 , avaliadas a partir das famílias $F_{2,4}$, foi realizada a análise de co-segregação. É necessário mencionar que o caráter 'stay green' segregou entre famílias $F_{2,4}$ na proporção de 75% com 'stay green' para 25% sem 'stay green' ($\chi^2=1,65$), indicando um controle genético monogênico, concordando com o resultado obtido por Aguiar (1999). Nessa segregação, foram consideradas como presença de 'stay green' todas famílias com nota até 3,5 (Xu, Rosenow e Nguyen, 2000), pois, como mencionado anteriormente, ocorreu segregação dentro das famílias descendentes de plantas F_2 heterozigóticas e isso ocasionou um aumento da nota média da família.

TABELA 9: Correlação fenotípica e genética entre a produção de grãos (g) e a nota de 'stay green' do cruzamento Carioca MG x Carioca 300vagens, em duas épocas em Lavras.

Estimativa	F _{2,3}	F _{2,4}	Média
Correlação Fenotípica	- 0,2870 **	- 0,2128 ns	
Correlação Genética	- 0,3964	- 0,2229	- 0,5053 **

**significância em nível de 1%.

As famílias com notas acima de 3,5 foram consideradas sem 'stay green'. Embora em algumas dessas famílias tenham sido encontradas algumas plantas com 'stay green', isso era esperado, pois, como também já constatado, esse fenótipo é muito influenciado pelo ambiente.

A utilidade do marcador é diretamente dependente da sua distância em relação ao alelo de interesse. Quanto mais próximo, mais eficientemente se poderá praticar a seleção indireta. No presente caso, infelizmente, o fragmento de DNA amplificado pelo primer OPF4 se recombinou com o alelo para 'stay green', a uma frequência de 0,43 (erro padrão=0,00774). Portanto, esse marcador é praticamente independente do alelo 'stay green' e, conseqüentemente, inútil para fins de seleção indireta. Deve ser mencionado que os bulks segregantes foram analisados por meio do RAPD utilizando os 700 primers disponíveis. Entre eles, apenas o OPF4 foi o que amplificou o fragmento de DNA mais próximo do alelo de 'stay green'. Dada a importância desse fenótipo para o melhoramento do feijão e, principalmente, a dificuldade da seleção direta, novos primers devem ser utilizados, ou mesmo outros marcadores, visando identificar um marcador mais eficiente para realizar a seleção indireta.

5 CONCLUSÕES

A seleção direta em etapas iniciais de um programa de melhoramento para o 'stay green' é pouco efetiva devido à forte interação famílias por ambientes.

O fragmento de DNA amplificado pelo primer OPF04 não é um bom marcador para o 'stay green' por se encontrar praticamente com distribuição independente, pois a frequência de recombinação entre eles foi de 0,43 (erro padrão = 0,00774).

6 BIBLIOGRAFIA

ACQUAAH, G.; ADAMS, M.W.; KELLY, J.D. Identification of effective indicators of erect plant architecture in dry bean. *Crop Science*, Madison, v.31, n.2. p.261-264, Mar./Apr. 1991.

ADAM-BLONDON, A.; SÉVIGNAC, M.; BANNEROT, H.; DRON, M. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to Are, simple gene conferring resistance to *C. lindemuthianum*, the causal agent of antracnose in French bean, *Theoretical Applied Genetics*, Berlin, v.88, n.6/7, p.865-870, Aug. 1994.

ADAMS, M.W. Plant architecture and physiological efficiency in the field bean. In: CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. *Pontentials of field beans and other food legumes in latin america*. Cali, 1973. p.266-278.

ADAMS, M.W. Plant architecture and yield breeding. *Iowa State Journal of Research*, Ames, v.56, p.225-254, 1982.

AGRIFANUAL 2001 Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e comércio 2001. p.329-336.

AGUIAR, A.M. Controle genético do "stay green" no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Lavras: UFLA, 1999.

ALLARD, R.W. Formulas and tables to facilitate the calculation of recombinant values in heredity. *Hilgardia*, Berkeley, v.24, n.10, p.235-260, Jan. 1956.

ALZATE-MARIN, A.L. Resistência à antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.): diversidade genética de raças de *Colletotrichum lindemuthianum*, herança de resistência e identificação de marcadores moleculares. Viçosa: UFV, 1996. 65p. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).

ALZATE-MARIN, A.L.; MENARIM, H.; CARVALHO, G.A.; PAULA JR, 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*, St. Paul, v.89, n.4, p.281-285, Apr. 1999.

- ALZATE-MARIM, A.L.; PAULA JR, T.J.; MENARIN, H.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Use of markers to understand the dominant nature of antracnose resistance genes present in common bean cultivar AB-136. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v.40, p.132-133, 1997.
- ARRUDA, M.C.C. **Resistência do feijoeiro-comum à antracnose: herança, identificação de marcadores moleculares e introgressão do CO-4 no cultivar Rudá**. Viçosa: UFV, 1998. 101p. (Dissertação - Mestrado Genética e Melhoramento de Plantas).
- BROTHERS, M.E.; KELLY, J.D. Interrelation of plant architecture and components in the pinto bean ideotype. **Crop Science**, Madison, v.33, n.6, p.1234-1238, Nov./Dec. 1993.
- CASTANHEIRA, A.L.M.; SANTOS, J.B. dos; FERREIRA, D.F.; MELO L. C. Identification of common bean alleles resistant to antracnose using RAPD. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.22, n.4, p.565-569, Dec. 1999.
- CASTANHEIRA, A.L.M.; SANTOS, J.B. dos; MELO, L.C. Uso do RAPD na identificação de genótipos de feijoeiro resistentes à antracnose. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.19, n.3, p.328, set. 1996.
- COLLICCHIO, E. **Associação entre o porte da planta do feijoeiro e o tamanho de grãos**. Lavras: UFLA, 1995. 98p. (Dissertação - Mestrado Genética e Melhoramento de Plantas.).
- COYNE, D.P. Modification of plant architecture and crop yield by breeding. **HortiScience**, Alexandria, v.15, n.3, p.244-247, June 1980.
- CRUZ, C.D; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa : UFV. Imprensa Universitária, 1994. 390p.
- CUKADAR-OLMEDO, B.; MILLER, J.F. Combining ability of the stay green trait and seed moisture content in sunflower. **Crop Science**, Madison, v.37, n.2, p.378-382, Mar./Apr. 1997.
- CUKADAR-OLMEDO, B.; MILLER, J.F.; HAMMOND, J.J. Inheritance of the stay green trait in sunflower. **Crop Science**, Madison, v.37, n.1, p.150-153, Jan./Feb. 1997.

- DONALD, C.M. The breeding of crops ideotypes. *Euphytica*, Wageningen, v.17, n.3, p.385-403, Dec. 1968.
- DUNCAN, R.R.; BOCKHOLT, A.J.; MILLER, F.R. Descriptive comparison of senescent and nonsenescent sorghum genotypes. *Agronomy Journal*, Madison, v.73, n.5, p.849-853, Sept./Oct. 1981.
- DUVICK, D.N. Genetic contributions to advances in yield of U.S maize. *Maydica*, Bergamo, v.37, p.69-79, 1992.
- FEHR, W.R. **Principles of cultivar development**. Ames: Macmillan publishing company, 1987. v.1, 536p.
- GENCHEV, D. Asynchronously ripening of stem and pods of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Annual Bean of the Improvement Cooperative*, Fort Collins, v.36, p.87-88, 1993.
- GEPTS, P.; BLISS, F.A. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from Colombia. *Economic Botany*, New York, v.40, n.4, p.469-478, Oct./Dec. 1986.
- GEPTS, P.; OSBORN, T.C.; RASHKA, BLISS, F.A. Phaseolin protein variability in wild forms landraces of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): evidence for multiple centers of domestication. *Economic Botany*, New York, v.40, n.4, p.451-468, Oct./Dec. 1986.
- 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. 1994.
- JUNQUEIRO NETTO, A.; LASMAR FILHO, J. Taxa de alogamia do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em Lavras, Minas Gerais. *Agros*, Lavras, v.1, n.1, p.19-21, 1971.
- 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, Jan./Feb. 1985.
- KELLY, J.D. Use of random amplified polymorphic DNA markers in breeding for major gene resistance to plant pathogens. *HortiScience*, Alexandria, v.30, n.3, p.461-465, June 1995.

- KELLY, J.D.; ADAMS, M.W. Phenotypic recurrent selection in ideotype breeding of pinto beans. *Euphytica*, Wageningen, v.36, p.69-80, 1987.
- 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, Jan. 1998.
- KORNEGAY, J.; WHITE, J.W.; CRUZ, O.O. de la. Growth habit and gene pool effects on inheritance of yield in common bean. *Euphytica*, Wageningen, v.62, n.3, p.171-180, Apr. 1992.
- MALBURG, M.E.; KELLY, J.D. Pinto bean for the Midwest. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, Fort Collins, v.35, p.15-16, 1992.
- MARQUES JÚNIOR, G.; RAMALHO, M.A.P. Determinação da taxa de fecundação cruzada do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) nas diferentes épocas de semeadura em Lavras. *Ciência e Prática*. Lavras, v.19, n.3, p.339-341, jul./set. 1995.
- 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 Sciences USA*, Washington, v.88, n.6, p.2336-2340, Mar. 1991.
- MESQUITA, A.G.G. *Caracterização de raças fisiológicas de Colletotrichum lindemuthianum por meio de marcadores moleculares RAPD*. Viçosa: UFV, 1997. 53p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- MICHELMORE, R.H.; PARAN, I.; KESSELL, 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). *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, Washington, v.88, n.11, p.9828-9832, Nov. 1991.
- MIKLAS, P.N.; JOHNSON, E.; STONE, V. Selective mapping of QTL conditioning disease resistance in common bean. *Crop Science*, Madison, v.36, n.5, p.1344-1351, Sept./Oct. 1996.

- MILACH, S.C.K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p.17-28.
- MULLIS, K.B.; FALLONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods enzymology**. [S.1], v.55, p. 335-350, 1987.
- NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SKROCH, P.; SANTOS, J.B. dos. Genetic relationship 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, Mar. 1995.
- NODARI, R.O; TSAI, S.M.; GUZMAN, P.; GILBERTSON, R.L.; GEPTS, P. Toward an integrated linkage map of common bean. III. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. **Genetics**, Austin, v.134, n.2, p.341-350, Feb. 1993.
- OTOYA, M.; MAYA, M.; PASTOR-CORRALES, M.; MAYER, J.E. Evolution of virulence of *Colletotrichum lindemuthianum* and *Phaeoisariopsis griseola* revealed by RAPD analysis. In: INTERNATIONAL WORKSHOP OF THE Phaseolus BEANS ADVANCED RESEARCH NETWORK, 1993, Cali. **Resumos ...** Cali: CIAT, 1993. 85p.
- PACOVA, B.E.V.; ROCHA, A.C. de M. Hibridação natural do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Linhares, Espírito Santo. **Revista Ceres**, Viçosa, v.22, n.120, p.157-158, mar./abr. 1975.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.85, n.8, p.985-993, Sept. 1993.
- POMPEU, A.S. Polinização cruzada natural no feijoeiro. **Bragantia**, Campinas, v.22, n.5, p.53-57, jan. 1963.
- RASMUSSEN, D.C. An evaluation of ideotype breeding. **Crop Science**, Madison, v.27, n.6, p.1140-1146, Nov./Dec. 1987.
- ROSENOW, D.T.; WOODFIN, C.D.; CLARK, L.E. Breeding for the stay green trait in sorghum. In **Agronomy abstracts**, ASA, Madison, WI, 1988. p.94.

- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, Washington, v.230, n.4732, p.1350-1354, Dec. 1985.
- SANTOS, J.B. dos; CASTANHEIRA, A.L.M.; MELO, L.C. Emprego de marcadores RAPD na identificação de alelos de resistência a antracnose no feijão. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 5., 1996, Goiânia. Resumos... Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, 1996. v.1, p.263-264.
- SANTOS, J.B. dos; VENCOVSKY, R. Controle genético de alguns componentes do porte da planta do feijoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.21, n.9, p.957-963, set. 1986a.
- SANTOS, J.B. dos; VENCOVSKY, R. Correlação fenotípica e genética entre alguns caracteres agrônômicos do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ciência e Prática*, Lavras, v.10, n.3, p.265-272, set./dez. 1986b.
- SILVA, M.V. da. **Identificação de marcadores RAPD ligado ao alelo Co-7 de resistência do feijão ao agente causal da antracnose.** Lavras: UFLA, 2000. 41p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- SINGH, S.P. A key for identification of different growth habits of *Phaseolus vulgaris*. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, Fort Collins, v.25, p.92-94, 1982.
- THOMAS, H.; SMART, C.M. Crops that stay green. *Annals Applied of Biology*, Warwick, v.123, n.1, p.193-219, Aug. 1993.
- VEIRA, C. Sobre a hibridação natural em *Phaseolus vulgaris* L. *Revista Ceres*, Viçosa, v.11, n.63, p.103-107, ju./dez. 1960.
- VILARINHOS, A.; VIDIGAL, M.C.; BARROS, E.G.; PAULA JR., T.J.; CRUZ, C.D.; MOREIRA, M.A. RAPD-PCR characterization of varieties of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) used to identify races of antracnose fungus (*Colletotrichum lindemuthianum*). *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, v.18, n.2, p.275-280, jun. 1995.
- VILHORDO, B.W.; MULLER, L.; EWALD, L.F.; LEÃO, M.L. Hábito de crescimento em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomia Sulriograndense*, Porto Alegre, v.16, n.1, p.79-98, 1980.

- WALULU, R.S.; ROSENOW, D.T.; WERTER, D.B.; NGUYEN, H.T. Inheritance of the stay green trait in sorghum. **Crop Science**, Madison, v.34, n.4. p.970-972, July/Aug. 1994.
- WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, A.; TINGEY, S. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are use useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.22, p.6531-6535, Nov. 1990.
- XU, W.; ROSENOW, D.T.; NGUYEN, H.T. Stay green trait in grain sorghum: relationship between visual rating and leaf chlorophyll concentration. **Plant Breeding**, Berlin, v.119, p.365-367, 2000.
- YOUNG, R.; KELLY, J.D. Gene pyramiding using markers assisted selection for stable resistance to bean anthracnose. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v.39, p.57-58, 1996.
- YOUNG, R.; KELLY, J.D. RAPD markers linked to tree major anthracnose resistance gene in commom bean. **Crop Science**, Madison, v.37, n.3, p.940-946, May/June 1997.
- YOUNG, N.; MELOTTO, M.; NODARI, R.O; KELLY, J.D. Marker-assisted dissection of oligogenic anthracnose resistance in the commom bean cultivar, G2333. **Theorical and Applied Genetics**, Berlin, v.96, n.1, p.87-94, Jan. 1998.