

**Monitoramento de
retrocruzamentos para
tolerância ao Vírus do
Mosaico Dourado do
Feijoeiro Comum, via
marcadores microssatélites**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 25

Monitoramento de retrocruzamentos para tolerância ao Vírus do Mosaico Dourado do Feijoeiro Comum, via marcadores microssatélites

Leciane Kárita de Oliveira
Rosana Pereira Vianello Brondani
Leonardo Cunha Melo
Claudio Brondani
Josias Corrêa de Faria
Maria José Del Peloso

Santo Antônio de Goiás, GO
2006

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Arroz e Feijão

Rodovia GO 462 - Km 12 - Zona Rural - Caixa Postal 179

75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO

Fone: (62) 3533 2123

Fax: (62) 3533 2100

www.cnpaf.embrapa.br

sac@cnpaf.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Carlos Agustín Rava*

Secretário-Executivo: *Luiz Roberto Rocha da Silva*

Supervisor editorial: *Marina A. Souza de Oliveira*

Revisão gramatical: *Vera Maria T. Silva*

Normalização bibliográfica: *Ana Lúcia D. de Faria*

Capa:

Editoração eletrônica: *Fabiano Severino*

1ª edição

1ª impressão (2006): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Arroz e Feijão

Monitoramento de retrocruzamentos para tolerância ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro comum, via marcadores microssatélites / Leciane Kárita de Oliveira ... [et al.]. - Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006.

39 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9571 ; 25)

1. Feijão - Melhoramento Genético - Seleção. 2. Feijão - Mosaico Dourado. 3. Feijão - Marcador Molecular. I. Oliveira, Leciane Kárita de. II. Embrapa Arroz e Feijão. III. Série.

CDD 635.6522 (21. ed.)

© Embrapa 2006

Sumário

| | |
|--|-----------|
| Resumo | 7 |
| Abstract | 9 |
| Introdução | 10 |
| Material e Métodos | 12 |
| Material Vegetal | 12 |
| Coleta do material foliar | 13 |
| Extração do DNA genômico | 13 |
| Quantificação do DNA genômico | 14 |
| Preparo da reação de PCR | 14 |
| Eletroforese dos fragmentos em gel de poliacrilamida | 15 |
| Análise estatística dos dados | 15 |
| Resultados e Discussão | 17 |
| Conclusões | 35 |
| Agradecimentos | 35 |
| Referências Bibliográficas | 36 |

Monitoramento de retrocruzamentos para tolerância ao Vírus do Mosaico Dourado do Feijoeiro Comum, via marcadores microssatélites

Leciane Kárita de Oliveira¹, Rosana Pereira Vianello Brondani²; Leonardo Cunha Melo³; Claudio Brondani⁴; Josias Corrêa de Faria⁵ e Maria José Del Peloso⁶

Resumo

O mosaico dourado do feijoeiro é uma doença que ocasiona severa redução da produtividade nas principais áreas de produção do feijoeiro comum no Brasil, podendo comprometer seu cultivo tanto na safra “das águas” como “da seca”. O desenvolvimento de cultivares com tolerância ao Vírus do Mosaico Dourado do Feijoeiro (VMDF) pode contribuir para aumentar a competitividade da cultura do feijoeiro comum e também viabilizar o cultivo em áreas hoje não recomendadas, devido à alta incidência da doença. Este trabalho objetivou auxiliar no desenvolvimento de genótipos de feijoeiro comum com tolerância ao VMDF, obtidos por retrocruzamento, utilizando o monitoramento, com marcadores microssatélites, da proporção de fragmentos de DNA de cada genitor. Foram desenvolvidas quatro populações, sendo utilizado, em três delas, o mesmo genitor recorrente, ARC100-4, e as linhagens doadoras DOR303, PHAS8328 e G23554, tolerantes ao VMDF e pertencentes ao centro de origem mesoamericano. No quarto cruzamento foi

¹ Graduanda em Biologia, Universidade Católica de Goiás, Avenida Universitária 1.440, Setor Universitário. 74605-010 Goiânia-GO.

² Bióloga, Doutora em Biologia Molecular Vegetal, Embrapa Arroz e Feijão, Rod. GO 462, Km 12 75375-000 Santo Antônio de Goiás-GO. rosanavb@cnpaf.embrapa.br

³ Engenheiro Agrônomo, Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, Embrapa Arroz e Feijão. leonardo@cnpaf.embrapa.br

⁴ Engenheiro Agrônomo, Doutor em Biologia Molecular, Embrapa Arroz e Feijão. brondani@cnpaf.embrapa.br

⁵ Engenheiro Agrônomo, Ph.D. em Fitopatologia/Biotecnologia, Embrapa Arroz e Feijão. josias@cnpaf.embrapa.br

⁶ Engenheira Agrônoma, Doutora em Genética e Melhoramento de plantas, Embrapa Arroz e Feijão. mjpeloso@cnpaf.embrapa.br

utilizado o genitor recorrente Jalo Precoce, pertencente ao centro de origem Andino e o doador G23554, que é um feijão silvestre com centro de origem mesoamericano. Para os quatro cruzamentos, 400 indivíduos da geração F_2 e/ou F_2RC_1 foram fenotipados para a tolerância ao VMDF, sendo retrocruzados apenas os tolerantes ao VMDF. Nas populações ARC100-4 x DOR303 e ARC100-4 x PHAS8328 a seleção assistida foi realizada nas gerações F_2 e F_2RC_1 , enquanto nas demais populações, a seleção foi realizada somente da geração F_2RC_1 . Para a análise molecular, foram genotipados, em cada geração, 20 marcadores SSRs. Para cada geração de cada cruzamento foram obtidos dados moleculares que indicaram as plantas tolerantes geneticamente mais próximas do genitor recorrente para o avanço das gerações. Os resultados indicaram eficiência em resgatar o genótipo do parental elite por meio da utilização da estratégia de retrocruzamento assistido por marcadores. Este estudo mostra uma aplicação concreta do emprego da tecnologia de marcadores moleculares em programas de retrocruzamento, indicando que essa estratégia pode reduzir o número de gerações e, conseqüentemente, o tempo necessário para a recuperação do genoma do genitor recorrente.

Termos para indexação: Seleção assistida, marcadores moleculares, melhoramento genético, VMDF, *Phaseolus vulgaris*.

Backcross monitoring for the common bean golden mosaic virus tolerance using microsatellite markers

Abstract

The common bean golden mosaic virus, caused by the "Common Bean Mosaic Virus" (CBMV), is a disease that causes severe yield reduction in the main areas of bean crop in Brazil. The development of cultivars with tolerance to the CBMV would contribute to increase the competitiveness of the bean crop and also to make viable the cultivation of beans in areas not recommended today, due to high incidence of the disease. The objective of the present work was to develop common bean plants resistant to the CBMV by backcrosses, with the help of microsatellite assisted selection in the monitoring of introgressed recurrent fragments. This marker-aided selection aims to reduce the DNA fragments from the donor parent not related with the resistance to the golden mosaic disease, reducing the number of backcrosses to recover the genetic background of the recurrent parent. Four populations were developed, and for three of them the recurrent parent was ARC100-4. The donor parents were DOR303, PHAS8328 and G23554, all of them resistant to the CBMV and belonging to the Mesoamerican gene pool. The fourth cross was developed between the recurrent parent Jalo Precoce (originated from the Andean gene pool, and differentiated to the wild beans) and the donor parent G23554. For all crosses, all the individuals of the generations F₂ and F₂BC₁ were phenotyped for the resistance to the CBMV, and only the resistant plants were backcrossed. For crosses ARC100-4 x DOR303 and ARC100-4 x PHAS8328, the assisted selection was carried out in the F₂ and F₂RC₁ generations, while in the remaining crosses the selection was performed only in F₂RC₁ generation. For the microsatellite analysis, in each generation were genotyped 20 markers. The molecular data were analyzed using the programs FSTAT and NTSys. Matrices of genetic similarity based on microsatellite marker data were obtained in each generation, to identify the individuals genetically more similar to the recurrent parents. The results indicated a higher efficiency in recovery the genotype of the elite genitor through the strategy of backcross assisted selection in the successive generations. This study demonstrates a concrete application of the use of molecular marker technology associated to bean breeding to the reduction of the time to recover the genome of the recurrent genitors.

Index terms: Assisted selection, molecular markers, genetic breeding, CBMV, Phaseolus vulgaris.

Introdução

O total da produção mundial de feijão comum está em torno de 23 milhões de toneladas, sendo que aproximadamente sete milhões são produzidas na América Latina e África (Broughton et al., 2003). Devido a sua boa adaptação às mais variadas condições edafoclimáticas do Brasil, o feijoeiro comum é atualmente cultivado em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Com isso, o país tornou-se o segundo maior produtor de feijão do gênero *Phaseolus* e o primeiro produtor de feijoeiro comum, *Phaseolus vulgaris* (2,5 milhões de toneladas), cultivado em uma área de 2,6 milhões de hectares por pequenos, médios e grandes agricultores, que utilizam desde o mais baixo até o mais alto nível tecnológico no processo produtivo. O consumo *per capita* ultrapassa 12 kg/habitante/ano, existindo preferências regionalizadas por cor, tipo e forma de grão, além da qualidade culinária (Yokoyama, 2005).

Vários fatores influenciam na produtividade da cultura do feijoeiro comum, dentre eles pode ser citado o grande número de doenças que acometem a cultura (Vieira, 1983; Vieira et al., 2005). Dentre os vários insetos transmissores de doenças, a mosca branca merece importância, pois é o vetor do vírus do mosaico dourado, que, dependendo das condições climáticas e do estágio de desenvolvimento das plantas, pode ocasionar severos prejuízos na produtividade. A doença ocorre nas principais áreas de cultivo do feijoeiro comum no Brasil (Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Paraná), tanto na safra “das águas”, quanto na safra “da seca”, sendo esta última a mais prejudicada. Até o presente, não foi encontrada imunidade ao VMDF em genótipos de *Phaseolus spp.* avaliados por instituições de pesquisa nacionais e internacionais (Morales & Niessen, 1988; Faria et al., 1996), tendo sido identificada apenas uma tolerância parcial à doença. Ainda não existe consenso sobre o mecanismo de controle genético da tolerância ao VMDF, existindo na literatura informações de controle poligênico (Personi et al., 1997), controle monogênico (Blair & Beaver, 1993) e controle oligogênico (Blair et al., 1993; Melo et al., 2005). Existem relatos de cultivares que apresentam certa tolerância a essa virose, mas, quando submetidas a altas infestações de mosca branca virulífera, apresentam queda considerável da produtividade.

Um dos maiores desafios dos programas de melhoramento genético do feijoeiro tem sido o desenvolvimento de genótipos com tolerância ao VMDF. A implementação de programas de pré-melhoramento genético, que identifiquem e

introduzam alelos de tolerância ao VMDF proveniente de germoplasma base, visando o desenvolvimento de linhagens elite com tolerância à doença, é considerada uma possibilidade real e prioritária junto ao programa de melhoramento genético da Embrapa Arroz e Feijão. O desenvolvimento de genótipos tolerantes ao VMDF terá certamente impacto significativo na cadeia produtiva do feijoeiro comum, pois permitirá o retorno ao sistema produtivo de áreas produtoras de feijão, atualmente impróprias ao seu cultivo devido à alta incidência dessa doença.

Várias são as alternativas que possibilitam a incorporação de novos alelos responsáveis por fenótipos de interesse em linhagens e cultivares de feijoeiro comum. A escolha de qual metodologia utilizar depende do controle genético da característica, da facilidade de cruzamento e de técnicas ou protocolos disponíveis, caso se utilizem ferramentas biotecnológicas (Nass et al., 2005). Um método bastante utilizado, quando os caracteres são de herança simples, normalmente de alta herdabilidade, envolvendo um ou poucos genes, é o retrocruzamento. O uso concomitante de marcadores moleculares pode abreviar o número de gerações de retrocruzamento, acelerando o processo de introgressão de genes exóticos (Tanksley et al., 1981). Em cada retrocruzamento que é feito com o genitor recorrente são recuperados, em média, 50% dos alelos remanescentes, e o melhorista continuará o retrocruzamento até que o nível de alelos desejado do genitor recorrente tenha sido recuperado. Para características que serão transferidas tendo alelos dominantes, basta retrocruzar diretamente a geração F_1 com o pai recorrente. Entretanto, no caso de alelos recessivos, o processo para a transferência da característica é mais demorado, pois é necessária uma geração de autofecundação após cada retrocruzamento, a fim de identificar plantas com o fenótipo desejado (Ramalho et al., 1993).

O emprego de marcadores moleculares em programas de introgressão via retrocruzamentos é, segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), a aplicação mais concreta do emprego da tecnologia de marcadores moleculares no melhoramento genético. Entretanto, para que a eficiência na seleção seja maior, o conhecimento prévio das regiões genômicas associadas a caracteres de interesse possibilita que seja feito um monitoramento direto da região genômica que deve sofrer introgressão. Quanto mais próximo o marcador do gene de interesse, menor a chance de recombinação entre eles, tornando possível monitorá-los no decorrer das gerações de retrocruzamento. Adicionalmente, durante a transferência de alelos relacionados à expressão de um caráter de interesse, podem também ser transferi-

dos alelos com efeito negativo para outras características. Isto ocorre devido ao *linkage drag* (ou arraste de ligação, em tradução livre), resultante da proximidade física entre genes no genoma. A eliminação direcionada de alelos com efeitos indesejados na região de introgressão pode ser facilitada pela utilização conjunta de métodos clássicos de melhoramento e métodos moleculares.

Estudos bem sucedidos mostrando a aplicação de retrocruzamento assistido em programas de melhoramento para caracteres de herança quantitativa, como tolerância a várias doenças, têm sido descritos (Alzate-Marin et al., 1999). Nesta situação, em que vários genes estão envolvidos na manifestação do caráter, a seleção somente se torna efetiva à medida que genes de maior efeito sejam identificados, e os marcadores associados a estes genes possam ser diretamente acompanhados durante o processo de seleção. Mutlu et al. (2005) identificaram três QTLs para tolerância a *Xanthomonas campestris*, os quais foram introgrididos a partir de uma linhagem doadora e acompanhados durante o processo de incorporação na linhagem recorrente por meio de marcadores moleculares nas gerações RC_1F_1 e RC_2F_1 , obtendo, ao final do processo, linhagens com elevados índices de tolerância à doença.

Este trabalho objetivou auxiliar o desenvolvimento de genótipos de feijoeiro com tolerância ao VMDF, obtidos por retrocruzamento, através da seleção assistida por marcadores microssatélites dos fragmentos de DNA dos genitores recorrentes, com a finalidade de diminuir os fragmentos de DNA indesejáveis, reduzindo com isto o número de retrocruzamentos a serem realizados.

Material e Métodos

Material Vegetal

Foram geradas, na Embrapa Arroz e Feijão, quatro populações a partir de cruzamentos entre linhagens/cultivares de feijoeiro comum, utilizando sempre um genitor como fonte de tolerância ao Vírus do Mosaico Dourado do Feijoeiro, previamente identificado, e outro, suscetível, com características comerciais desejáveis. Os cruzamentos realizados envolveram os seguintes genitores: 1) ARC 100-4 (grão comercial carioca, origem mesoamericana) e DOR 303 (fonte de tolerância ao VMDF com grão não comercial, origem mesoamericana); 2) ARC 100-4 e PhAS.8328 (feijão silvestre e fonte de tolerância ao VMDF, origem

mesoamericana); 3) ARC 100-4 e G23554 (feijão silvestre e fonte de tolerância ao VMDF, origem mesoamericana) e; 4) Jalo Precoce (cultivar com grão comercial do tipo Manteigão/Jalo, origem andina) e G23554. Essas populações foram conduzidas pelo método de retrocruzamento, seguidos por autofecundação (Melo et al., 2005). Nos cruzamentos 1 e 2 as análises fenotípicas e moleculares foram realizadas em plantas da geração F_2 e F_2RC_1 , e nos cruzamentos 3 e 4 em plantas da geração F_2RC_1 .

Aproximadamente 400 progênies resultantes de cada cruzamento foram submetidas à inoculação com o VMDF por meio de infestação com mosca branca virulífera no estágio de plantas recém-emergidas, em condições controladas. Foram realizadas avaliações periódicas quanto à incidência de sintomas do VMDF, iniciando no estágio fisiológico V3, quando as plantas tinham duas folhas trifolioladas e finalizando no estágio em R5, na formação dos botões florais.

Coleta do material foliar

Foram coletadas amostras das folhas tenras e jovens, preferencialmente nas trifolioladas, dos genitores e descendentes nas gerações de F_2 e F_2RC_1 para os cruzamentos 1 e 2 e na geração F_2RC_1 para os cruzamentos 3 e 4. Todo o material foliar coletado foi mantido sob refrigeração e transportado até o Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão, onde foi estocado em freezer a -20°C .

Extração do DNA genômico

Para a extração do DNA genômico foi utilizado o protocolo de extração descrito por Doyle & Doyle (1987) e adaptado por Grattapaglia et al. (1992). Foram transferidos aproximadamente 150 mg do tecido foliar para microtubos de 1,5ml previamente identificados com o nome da amostra. As folhas foram completamente maceradas na presença de nitrogênio líquido até a formação de um pó. Ao tecido recém-macerado adicionaram-se 700 microlitros (μL) de tampão de extração (2% CTAB; 1,4M NaCl; 20mM EDTA; 100mM Tris-HCl pH8,0; 1% de polyvinylpyrrolidone), o qual possui detergente e agente tamponante, seguido por homogeneização do tubo para todo o tecido entrar em contato com a solução. Os microtubos foram incubados por 45 minutos a 65°C , sendo agitados a cada 15 minutos. Posteriormente, adicionaram-se 600 μL de solução contendo clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção de 24:1, com a finalidade de separar os compostos orgânicos do DNA e RNA. Após várias inversões dos microtubos, a fim de obter uma solução totalmente homogênea, estes foram

centrifugados por 15 minutos a 13.000 rotações por minuto (rpm). A fase superior foi retirada com o auxílio de uma pipeta e transferida para outro microtubo previamente identificado. A esta fase adicionaram-se 800 µL de etanol absoluto gelado, seguido por completa homogeneização da solução e armazenamento em freezer a -20C por duas horas. Após a incubação, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 13.000 rpm. Descartou-se a fase líquida e o precipitado foi lavado com 1000 µL de etanol 70%, seguido por outra lavagem com etanol absoluto. Ao precipitado, totalmente seco, foi adicionado 50 µL de tampão Tris-EDTA (TE) contendo 10 mg/mL de RNase, seguido por incubação a 37° C por uma hora para a completa degradação do RNA.

Quantificação do DNA genômico

A concentração do DNA foi estimada por eletroforese submarina em gel de agarose 1%, corado com solução de Brometo de Etídio (0,2 mg/mL). Em poços do gel, adjacente às amostras de DNA, foi acrescentado o DNA-padrão do fago λ nas concentrações conhecidas de 50, 100 e 200 ng. Ao final da eletroforese o gel foi registrado sob luz ultravioleta (UV) através do sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene). A estimativa da concentração do DNA foi feita através de comparação visual com o DNA-padrão, seguida por diluição do DNA para a concentração desejada de 3 ng/µL.

Preparo da reação de PCR

Para a análise molecular foram utilizados marcadores SSRs desenvolvidos para feijão e disponibilizados no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão. Para cada um dos quatro cruzamentos avaliados foi testado, quanto à presença de polimorfismo entre os genitores e a qualidade do produto amplificado, um conjunto de 98 pares de primers SSRs, distribuídos aleatoriamente no genoma do feijão (Tabela 1). As reações de amplificação foram conduzidas em um volume final de 15 µL, contendo 1,4 µL de tampão de reação 10X, 1,3 µL de dNTP (2,5 mM de cada nucleotídeo), 1,3 µL de DMSO (50%), 4,3 µL do par de primer "Forward" e "Reverse" (0,9 µM), 0,2 µL de Taq Polimerase (5 unidades/µL) e 5 µL de DNA genômico (3 ng/µL). As reações de amplificação da PCR foram conduzidas em termociclador PT-100 Thermal Controller (MJ Research) com a seguinte programação: um pré-ciclo de 94° C por 5 minutos, em seguida 29 ciclos de 94° C por 1 minuto, 56° C por 1 minuto, 72° C por 1 minuto, e um passo final de 72° C por 7 minutos.

Depois de concluído o ciclo de amplificação, adicionaram-se às amostras 3 μL de tampão de carregamento para gel de poliacrilamida (9,8 ml de formamida, 0,2 ml de EDTA 0,5M, pH 8,0, 25 mg de Azul de Bromofenol, 25 mg de Xileno Cianol). Em seguida efetuou-se uma rápida centrifugação, a fim de facilitar a dissolução do tampão na fase aquosa da reação.

A checagem da reação quanto a presença dos produtos amplificados foi feita via eletroforese submarina em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X (0,09M Tris Borato e 2mM EDTA), contendo 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de brometo de etídio. Os géis foram submetidos a eletroforese com voltagem de 80V por 20 minutos, seguido por visualização do produto amplificado em fotodocumentador de imagem Eagle Eyae II.

Eletroforese dos fragmentos em gel de poliacrilamida

Os produtos da amplificação foram analisados via eletroforese vertical em géis desnaturantes de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata, de acordo com o método descrito em Creste et al. (2001). Os géis foram submetidos a uma voltagem constante de 90 V por uma hora e meia e em seguida foram submetidos ao processo de coloração da seguinte forma: 1) Fixação por 10 minutos em solução de ácido acético (1780 mL de água destilada; 200 mL de etanol; 20 mL de ácido acético); 2) lavagem por 1 minuto em água; 3) oxidação por 3 minutos em solução de ácido nítrico (1900 mL de água destilada; 100 mL de ácido nítrico); 4) lavagem em água por 1 minuto; 5) incubação do gel em solução de prata (2 g de nitrato de prata em 2 L de água) por 30 minutos; 6) duas lavagens em água por 30 segundos cada; 7) revelação do gel por imersão em solução de revelação (60 g de carbonato de cálcio em 2 L de água destilada) a 10-12° C até a revelação das bandas correspondentes aos produtos amplificados; 8) parada da coloração através de imersão do gel em solução de ácido acético (200 mL de ácido acético em 1800 mL de água destilada) por 5 minutos; 9) lavagem do gel em água destilada por 1 minuto; 10) secagem do gel a temperatura ambiente durante a noite.

A documentação da imagem do gel foi feita utilizando um equipamento *scanner* e um programa computacional de edição de imagens *Adobe Photoshop*, seguido pelo armazenamento da imagem no formato JPEG.

Análise estatística dos dados

A genotipagem dos fragmentos de DNA amplificados e separados por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida foi efetuada realizando-se uma análise

visual, comparando a posição de migração dos fragmentos amplificados em relação à posição das bandas de tamanho conhecido do marcador de massa molecular *Ladder* dez pares de base. Para cada cruzamento, em cada geração, foram geradas duas matrizes de dados. A primeira foi criada contendo o nome do loco SSR e o tamanho do alelo amplificado em pares de base, estimado com base na comparação com o padrão de massa molecular, para cada indivíduo analisado. A segunda matriz foi gerada com base em dados binários em que os indivíduos segregantes foram genotipados quanto à presença de um determinado alelo amplificado (1) e ausência deste mesmo alelo (0). As matrizes geradas foram transferidas para uma planilha no programa Excel onde foram adequadamente formatadas para o programa computacional de análise dos dados.

Para a análise de similaridade genética utilizando as matrizes geradas a partir das informações dos alelos amplificados, foram utilizados os programas computacionais Fstat (Goudet, 1995) e NTSys (Rohlf, 1989). O programa Fstat calcula a frequência alélica, que corresponde ao número de vezes que um determinado alelo foi detectado, dividido pelo número total de alelos presentes no conjunto de indivíduos derivados de um cruzamento para um determinado loco SSR. O programa NTSys, a partir dos dados de frequência alélica gerados no Fstat, calcula as matrizes de distância genética e agrupamento dos indivíduos utilizando a estimativa de distância genética entre os indivíduos com base no coeficiente de Rogers modificada por Wright (doravante Rogers-W) (Wright, 1978). A partir destas estimativas, foram construídos os dendrogramas para cada geração dos cruzamentos utilizando o critério de agrupamento UPGMA, o qual maximiza a correlação cofenética entre as matrizes obtidas, por meio de uma análise com o programa NTSys.

Para a análise de similaridade genética utilizando as matrizes geradas a partir dos dados binários, calculou-se o coeficiente de similaridade de Jaccard entre todos os indivíduos e, a partir dos índices estimados, construiu-se o dendrograma utilizando o programa NTSys.

A análise de proporção do genoma do genitor recorrente introgridido nos indivíduos das gerações F_2 e F_2RC_1 foi realizada por meio da anotação dos alelos dos genitores recorrentes presentes em cada indivíduo das gerações segregantes para os 20 locos SSRs genotipados, incluindo os genótipos em homocigose e heterocigose para os locos SSRs avaliados. As informações de alelos compartilhados foram reunidas em uma tabela no formato Excel, onde se calculou a porcentagem do genoma de cada genitor introgridido nos indivíduos segregantes. A partir dos

dados obtidos, foram gerados gráficos indicando a proporção dos genomas dos genitores recorrentes e doadores em cada indivíduo das populações.

O teste estatístico empregado para comparar as proporções do genoma introgrado nas diferentes populações e gerações segregante de retrocruzamentos foi o Qui-quadrado (χ^2), ao nível de 5% de probabilidade. No caso de a hipótese ser aceita, os desvios eram considerados não significativos e atribuídos ao erro experimental com uma probabilidade específica de acerto.

Resultados e Discussão

Na avaliação da geração F_1 de cada cruzamento, todas as plantas foram suscetíveis ao VMDF, indicando preliminarmente que a tolerância à doença é condicionada por alelos recessivos de um ou mais genes. Devido a isto, foi realizada uma autofecundação após cada retrocruzamento, a fim de identificar as plantas com tolerância à doença. O número de plantas tolerantes analisado em cada geração para cada cruzamento foi variável e definido com base na segregação para reação ao VMDF. Para os cruzamentos ARC100-4 x DOR303 e ARC100-4 x PHAS8328, após a seleção fenotípica para tolerância, foram obtidos totais de 46 e 18 plantas, respectivamente, na geração F_2 , e 50 plantas para cada cruzamento na geração F_2RC_1 , para serem submetidas a análise com marcadores moleculares. Nas outras duas populações, foram avaliados 33 indivíduos do cruzamento ARC100-4 x G23554, e 13 do cruzamento Jalo Precoce x G23554, ambos na geração F_2RC_1 .

Para cada uma das populações segregantes avaliou-se o perfil de amplificação dos marcadores SSRs nos genitores quanto à presença de polimorfismo. Como foram avaliadas diferentes combinações de genitores, o número de SSRs capazes de detectar polimorfismo entre os genitores foi variável. Ao todo foram avaliados 98 marcadores SSRs e, destes, 51 foram utilizados em pelo menos um dos quatro cruzamentos (Tabela 1). Dos 51 marcadores polimórficos, apenas nove não estão mapeados no genoma de feijão, sendo que os 42 restantes estão distribuídos nos 11 grupos de ligação (Freyre et al., 1998; Grisi et al., 2005), garantindo desta forma uma ampla amostragem do genoma. O objetivo foi representar pelo menos um marcador SSR de cada grupo, e este resultado foi alcançado. Dos 51 marcadores polimórficos, 18 foram comuns a dois cruzamentos e somente seis foram comuns a três cruzamentos, evidenciando uma reduzi-

da variabilidade genética entre os genitores. Conforme esperado, todos os marcadores SSRs amplificaram nos quatro genitores utilizados nos cruzamentos, indicando um nível elevado de homologia entre os diferentes genomas mesmo, para genótipos de diferentes centro de origem.

Foram selecionados 20 marcadores polimórficos entre os genitores para cada um dos quatro cruzamentos. Entretanto, o número de marcadores testados quanto à presença de polimorfismo entre os genitores para cada cruzamento variou em função da diversidade genética existente entre os mesmos. Para os cruzamentos ARC100-4 x DOR303, ARC100-4 x PHAS8328, ARC100-4 x G23554 e Jalo Precoce x G23554 foram avaliados, respectivamente, 48, 50, 96 e 48 marcadores SSRs, sendo que o nível de polimorfismo estimado foi maior para o cruzamento Jalo Precoce x G23554, com 52% dos locos testados polimórficos, e menor para o cruzamento ARC100-4 x G23554, com apenas 20,8% de locos SSRs polimórficos. Isso fez com que um grande número de marcadores fossem avaliados a fim de selecionar 20 locos para a análise de seleção assistida. Conforme esperado, a porcentagem de locos polimórficos variou entre os cruzamentos, indicando diferentes níveis de diversidade entre os genomas dos genitores utilizados, sendo que a maior diversidade foi encontrada entre o cruzamento envolvendo o genitor Jalo Precoce, de origem andina, e o feijão silvestre, G23554, var. *aborigineus*, de origem mesoamericana. Em uma análise de mapeamento, onde foram analisados genitores dos centros de origem, mesoamericano e andino, índices similares de polimorfismo foram observados, chegando ao nível de 54% de locos SSRs polimórficos (Grisi et al., 2005), corroborando a tese de que há maior diversidade entre genótipos de diferentes origens. O reduzido polimorfismo encontrado em genótipos de feijão por marcadores SSR tem sido relatado em diversos trabalhos na literatura (Garcia et al., 2005) e provavelmente está relacionado com a base genética estreita da espécie *Phaseolus vulgaris*, principalmente entre genótipos originários de um mesmo centro de domesticação, como os utilizados no presente estudo. Beebe et al. (2001), em um outro estudo de diversidade genética de genótipos de feijoeiro comum representativos do *pool* gênico andino, com base em marcadores co-dominantes do tipo AFLP, encontraram uma base genética estreita entre os genótipos analisados e concluíram que estes genótipos provavelmente derivam de populações silvestres comuns e que as variações morfológicas presentes se devam ao processo seletivo imposto pelo homem, não estando, atualmente, os marcadores moleculares eficientes em captar esse tipo de variação.

Tabela 1. Temperatura de anelamento e informação de mapa de 98 marcadores SSRs utilizados para a análise molecular de quatro populações segregantes visando à tolerância ao Virus do Mosaico Dourado do Feijoeiro Comum.

| Marcadores SSRs | Temperatura de anelamento | Grupo de ligação no mapa genético | Populações polimórficas | Marcadores SSRs | Temperatura de anelamento | Grupo de ligação no mapa genético | Populações polimórficas |
|-----------------|---------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-----------------|---------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| AG1 | 56°C | 3 | * | BM156 | 56°C | 2 | 1 |
| BM3 | 56°C | n.m. | * | BM157 | 56°C | 10/1 | * |
| BM6 | 56°C | n.m. | * | BM158 | 56°C | n.m. | 3 |
| BM53 | 56°C | 1 | * | BM159 | 56°C | 3 | 3 |
| BM68 | 56°C | 4 | 4 | BM160 | 56°C | 7 | 1/3/4 |
| BM98 | 56°C | 3 | 4 | BM161 | 56°C | 8/4 | 2 |
| BM114 | 56°C | 9 | 2 / 4 | BM164 | 56°C | 2 | 1 |
| BM137 | 56°C | 6 | 3 | BM165 | 56°C | 8 | 4 |
| BM138 | 56°C | 5 | 2 | BM166 | 56°C | n.m. | * |
| BM140 | 56°C | 4 | 4 | BM175 | 56°C | 5 | 1/2 |
| BM141 | 56°C | 9 | * | BM181 | 56°C | 3 | * |
| BM142 | 56°C | 2 | 2 | BM183 | 56°C | 7 | 2 |
| BM143 | 56°C | n.m. | 1 | BM184 | 56°C | 11/9 | 2 |
| BM146 | 56°C | 1 | * | BM197 | 56°C | 3 | * |
| BM147 | 56°C | n.m. | * | BM200 | 56°C | 1 | 1 |
| BM148 | 56°C | n.m. | 2/3 | BM202 | 56°C | 9 | 1 |
| BM149 | 56°C | 4 | 1 | BM205 | 56°C | 7/10 | * |
| BM151 | 56°C | n.m. | 2/4 | BM210 | 56°C | 7 | 1 |
| BM152 | 56°C | 2 | 1 | BM211 | 56°C | 8 | 2 |
| BM153 | 56°C | n.m. | 4 | BM212 | 56°C | 10 | 1/3 |
| BM154 | 56°C | 9 | 1/3 | BM213 | 56°C | n.m. | 2/4 |
| BM155 | 56°C | 5 | 2 | PV21 | 56°C | 3 | 2/3/4 |
| AJ416391 | 56°C | 8 | * | PV23 | 56°C | 3 | 2/3/4 |
| AJ416394 | 56°C | n.m. | 2 | PV24 | 56°C | n.m. | * |
| AJ416395 | 56°C | n.m. | * | PV25 | 56°C | 2 | 1 |
| AJ416397 | 56°C | n.m. | * | PV26 | 56°C | 9 | * |
| AJ416409 | 56°C | n.m. | * | PV31 | 56°C | 1 | * |
| GATS11 | 56°C | n.m. | 2/3/4 | PV32 | 56°C | n.m. | * |
| GATS91 | 56°C | 2 | 1/2/4 | PV33 | 56°C | n.m. | * |
| M75855 | 56°C | n.m. | * | PV34 | 56°C | n.m. | 3 |
| M99497 | 56°C | 3 | * | PV37 | 56°C | n.m. | * |
| X59469 | 56°C | 2 | * | PV39 | 56°C | n.m. | * |
| X60000 | 56°C | 4 | * | PV40 | 56°C | n.m. | * |
| X80051 | 56°C | 9 | * | PV41 | 56°C | n.m. | * |
| X96999 | 56°C | 3 | 3 | PV53 | 56°C | 8 | 3/4 |
| U18791 | 56°C | 11 | * | PV61 | 56°C | 5 | 3 |
| U77935 | 56°C | 2 | * | PV67 | 56°C | n.m. | * |
| PV01 | 56°C | 11 | * | PV74 | 56°C | n.m. | * |
| PV02 | 56°C | 7 | 3 | PV77 | 56°C | n.m. | * |
| PV04 | 56°C | 3 | * | PV78 | 56°C | 2 | 3/4 |
| PV05 | 56°C | 6 | 1/2/4 | PV81 | 56°C | n.m. | 4 |
| PV06 | 56°C | 7 | * | PV83 | 56°C | 8 | * |
| PV07 | 56°C | n.m. | * | PV93 | 56°C | 5 | 3/4 |
| PV10 | 56°C | n.m. | * | PV96 | 56°C | n.m. | * |
| PV11 | 56°C | 2 | 4 | PV100 | 56°C | n.m. | * |
| PV12 | 56°C | 10 | 1 | PV101 | 56°C | 9 | 4 |
| PV13 | 56°C | 6 | 1/4 | PV103 | 56°C | n.m. | * |
| AJ416389 | 56°C | 8 | * | PV109 | 56°C | 3 | 3/4 |
| PV16 | 56°C | n.m. | * | PV112 | 56°C | 4 | * |

*: Marcadores monomórficos para os quatro cruzamentos avaliados; n.m.: Marcadores não mapeados no mapa genético de feijão; 1: Cruzamento ARC100 X DOR303; 2: Cruzamento ARC100 X PHAS8328; 3: Cruzamento ARC100 X G23554; 4: Cruzamento JALO PRECOCE X G23554.

Inicialmente, os marcadores identificados como polimórficos entre os genitores foram genotipados nas plantas identificadas como tolerantes ao VMDF das gerações F_2 para os cruzamentos ARC100-4 x DOR303 e ARC100-4 x PHAS8328 (Figura 1). A partir dos dados de genotipagem foram geradas as matrizes de dissimilaridade genética, com base nos dados de frequência alélica, e de similaridade genética, a partir dos dados binários, com a finalidade de estimar a diversidade entre os genótipos e identificar os mais próximos geneticamente do genoma do genitor recorrente elite, ARC100-4 (Figuras 2 e 3).

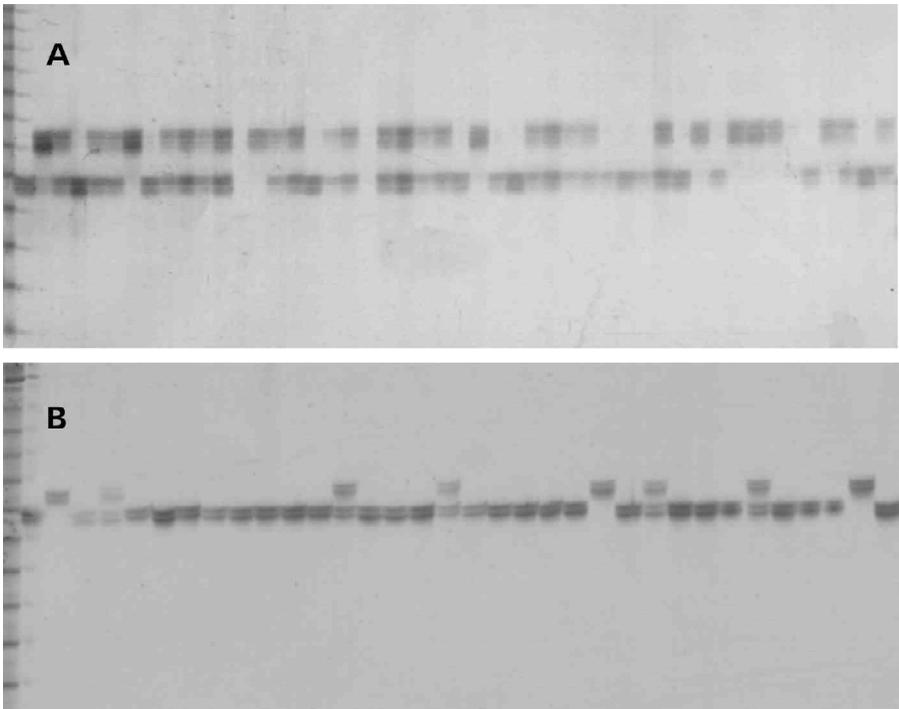


Fig. 1. Perfil de segregação de marcadores SSRs em gel de poliacrilamida amplificados pelo SSR BM175, com as populações ARC100-4 x DOR303 (painel A), e pelo SSR GAST91, com as populações ARC100-4 x G23554 (painel B). A primeira e última colunas representam o DNA-padrão, Ladder 10 Kb. A segunda e terceira colunas indicam os genitores e as colunas de 4 a 49 correspondem aos indivíduos segregantes.

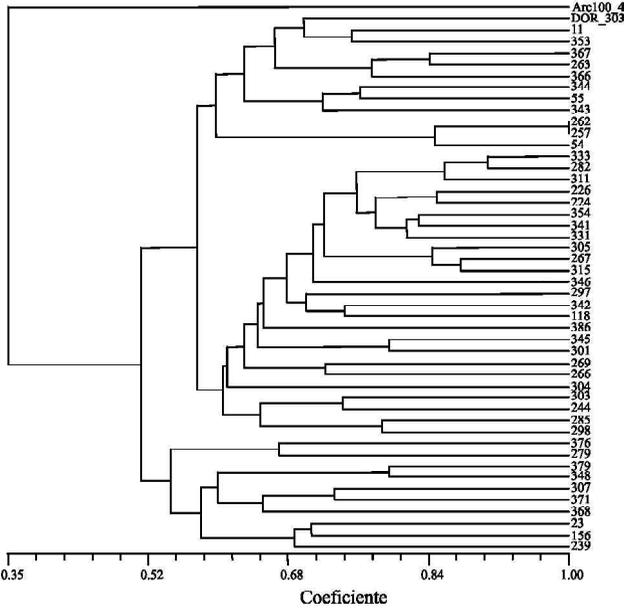
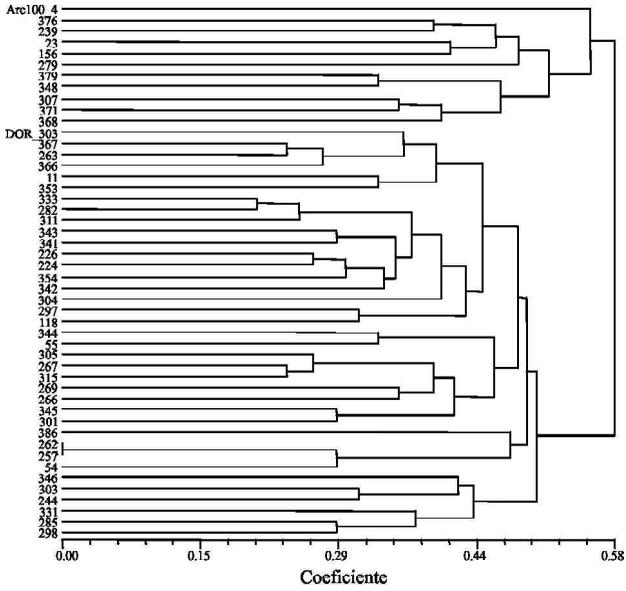


Fig. 2. Dendrogramas com base nos dados de frequência alélica (acima) e análise binária (abaixo), na geração F₂, de indivíduos da população segregante ARC100-4 x DOR303.

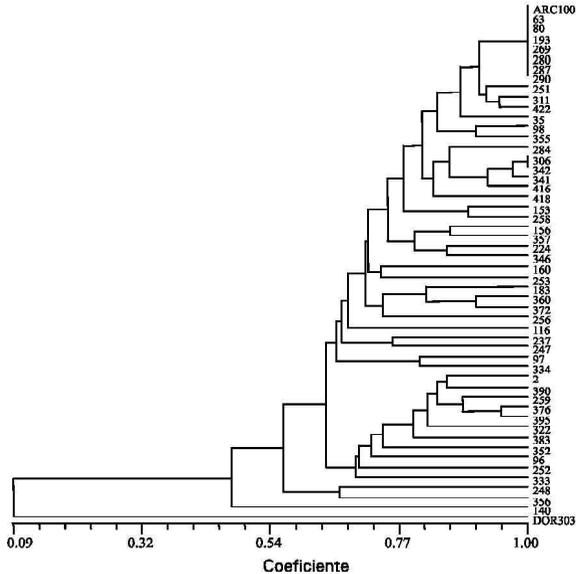
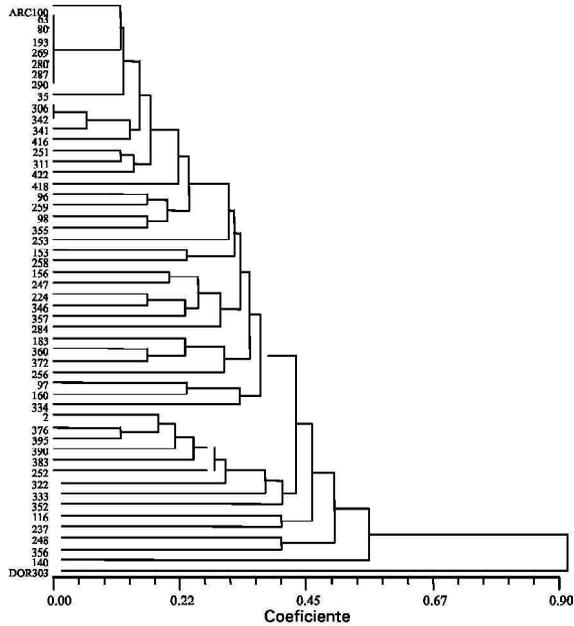


Fig. 3 . Dendrogramas com base nos dados de freqüência alélica e análise binária, na geração F_2RC_1 , de indivíduos da população segregante ARC100-4 x DOR303.

A análise de dissimilaridade genética com base no coeficiente de Rogers-W indicou que os indivíduos F_2 tolerantes ao VMDF das populações ARC100-4 x DOR303 e ARC100-4 x PHAS8328 apresentaram índices de dissimilaridade genética média e desvio padrão de $0,51 \pm 0,12$ e $0,49 \pm 0,16$, respectivamente. A análise de similaridade genética, com base no coeficiente Jaccard, entre os mesmos cruzamentos, revelou uma similaridade média geral de $0,58 \pm 0,11$ e $0,58 \pm 0,15$, e similaridade média com o pai recorrente de $0,36$ e $0,49$ (Tabela 2), respectivamente. Para a população ARC100-4 x DOR303, o dendrograma obtido (Figura 2), referente à geração F_2 , teve um índice cofenético estimado em $0,66$, com base na análise de dissimilaridade, e de $0,70$, para a análise de similaridade genética. Para a população ARC100-4 x PHAS8328, também com base na análise de agrupamento da geração F_2 (Figura 3), os índices cofenéticos estimados foram de $0,63$ e $0,67$ para as análises de dissimilaridade e similaridade genéticas, respectivamente. As diferenças encontradas entre as estimativas de similaridade e dissimilaridade ocorrem devido à diferença de suas fórmulas estatísticas. Uma análise detalhada dos alelos compartilhados entre os indivíduos segregantes e os genitores dentro de uma mesma população, e levando-se em consideração o índice cofenético (corresponde à correlação entre a matriz cofenética e a matriz que deu origem ao dendrograma), estimado para cada agrupamento formado, permitiu observar que as estimativas de similaridade, feitas com base no índice de Jaccard, foram mais consistentes com os dados de compartilhamento de informação genética. O feijoeiro comum é uma espécie diplóide e de reprodução autógama, o que faz com que a quase totalidade dos locos em seu genoma esteja em homozigose. Deste modo, em uma análise de segregação, no máximo dois alelos são amostrados por loco, o que resulta em um grande número de estimativas de frequências alélicas idênticas ou muito próximas, levando, provavelmente, a um desvio nos índices de dissimilaridade genética e agrupamento calculado. Esses dados permitiram selecionar os indivíduos F_2 (indivíduos 368, 239, 23, 307, 226, 266, 156, 269, 371 e 279 para o cruzamento Arc 100-4 x DOR 303, geração F_2 , e indivíduos 232, 193, 179, 57, 258, 148, 86, 31, 196 e 52 para o cruzamento Arc 100-4 x Phas8328, geração F_2 , Figuras 8 e 9, respectivamente, que apresentaram tolerância ao VMDF e estavam mais próximos geneticamente do genitor recorrente, para serem retrocruzados com o genitor ARC100-4.

Tabela 2. Resumo da análise molecular de diferentes cruzamentos e gerações em feijoeiro comum em um programa de retrocruzamento assistido por marcadores visando à obtenção de linhagens tolerantes ao Vírus do Mosaico Dourado.

| Cruzamentos | Total de Indivíduos Analisados | Marcado- res SSRs testados | Porcen- tagem de SSRs Polimór- ficos | Total de SSRs utilizados | Distância média de Similaridade com para o genitor pai recorrente (Todos os indivíduos tolerantes/Dez selecionados) | Índice Cofenético das matrizes de similaridade | Proporção de média do genoma do genitor recorrente incorporação Genomical(Todos os indivíduos tolerantes/ Dez selecionados) | Teste Qui- Quadrado ² |
|--|--------------------------------------|----------------------------------|---|--------------------------------|--|--|--|-------------------------------------|
| | | | | | | | | |
| Arc100 x DOR303 / F ₂ | 46 | 48 | 37,5% | 20 | 0,36/0,51 | 0,70 | 41,9%/ 61,1% | 47,32* |
| Arc100 x DOR303 / F ₂ RC1 | 50 | 48 ^{1*} | — | 20 | 0,82/0,97 | 0,91 | 88,3%/ 98,89% | 186,68* |
| Arc100 x PHAS8328 / F ₂ | 18 | 50 | 36% | 20 | 0,49/0,53 | 0,58 | 47,5%/ 53,12% | 1,8 (p = 17,97%) |
| Arc100 x PHAS8328 / F ₂ RC1 | 50 | 50 ^{1*} | — | 20 | 0,65/0,76 | 0,61 | 76,7%/ 86,94% | 3,08 (p = 7,9%) |
| Arc100 x G23554 / F ₂ RC1 | 33 | 96 | 20,8% | 20 | 0,38/0,55 | 0,36 | 70,4%/ 79,25% | 14,68 |
| Jato Precoco x G23554 / F ₂ RC1 | 13 | 48 | 52% | 20 | 0,52/0,60 | 0,50 | 67,2%/ 70,48% | 16,48* |

* 1Marcadores testados nas gerações F₂ dos respectivos cruzamentos.

²A hipótese testada foi que a proporção do genoma do genitor recorrente era igual 0,5 na geração F₂ e a 0,75 na geração F₂RC1.

*Desvios da hipótese significativo pelo teste Qui-quadrado a 5% de probabilidade.

Após um retrocruzamento e uma autofecundação a população F_2RC_1 resultante foi novamente submetida a uma análise fenotípica para a tolerância ao VMDF, conforme descrito anteriormente, a fim de identificar os genótipos tolerantes para serem utilizados na análise com marcadores moleculares. Foram selecionados para a análise com marcadores moleculares 50 indivíduos para o cruzamento ARC100-4 x DOR303, e 50 para o cruzamento ARC100-4 x PHAS8328. Novamente, todos os indivíduos tolerantes foram genotipados utilizando 20 marcadores SSR. A análise genética indicou que os indivíduos F_2RC_1 resultantes dos cruzamentos ARC100-4 x DOR303 e ARC100-4 x PHAS8328, apresentaram índices de dissimilaridade genética média de $0,38 \pm 0,16$ e $0,48 \pm 0,12$, similaridade média geral de $0,69 \pm 0,16$ e $0,61 \pm 0,12$ e similaridade média com o pai recorrente de $0,82$ e $0,65$ (Tabela 2), respectivamente. Para os mesmos cruzamentos na geração F_2RC_1 , a análise de agrupamento (Figuras 4 e 5), a partir dos dados de dissimilaridade genética, identificou índices cofenéticos de $0,94$ e $0,82$ e, a partir dos dados de similaridade genética, os índices cofenéticos foram de $0,91$ e $0,82$, respectivamente. Com base na análise de similaridade genética com o pai recorrente, foram selecionados os genótipos mais próximos desse genitor (indivíduos 63, 80, 193, 269, 280, 287, 290, 35, 311, 251 para o cruzamento Arc 110-4 x DOR 303, geração F_2RC_1 , e indivíduos 71, 73, 182, 110, 251, 179, 37, 183, 188 e 195 para o cruzamento Arc 110-4 x Phas8328, geração F_2RC_1 (Figuras 8 e 9, respectivamente) para participarem da próxima etapa do programa de retrocruzamento.

Para os cruzamentos ARC100-4 x G23554 e Jalo Precoce x G23554, que envolveram o mesmo genitor silvestre doador (G23554), todos os indivíduos da geração F_1 foram retrocruzados com o genitor elite, não tendo sido realizada a análise com marcadores moleculares, ou seja, não houve monitoramento com marcadores SSRs na primeira geração de retrocruzamento. Da mesma forma como realizado para os cruzamentos anteriores, os indivíduos F_2RC_1 resultantes foram fenotipados para a reação ao VMDF, e os que apresentaram tolerância foram submetidos à análise molecular. Foram selecionados, para a análise com 20 marcadores SSRs, 33 indivíduos do cruzamento ARC100-4 x G23554, e 13 do cruzamento Jalo Precoce x G23554. A análise de dissimilaridade genética com base no coeficiente de Rogers-W indicou que os indivíduos F_2RC_1 resultantes dos cruzamentos ARC100-4 x G23554 e Jalo Precoce x G23554, apresentaram índices de dissimilaridade genética média de $0,46 \pm 0,17$ e $0,55 \pm 0,21$, similaridade média geral de $0,36 \pm 0,28$ e $0,50 \pm 0,20$ e similaridade média com o pai recorrente de $0,38$ e $0,52$ (Tabela 2), respectivamente. Para os cruzamentos ARC100-4 x G23554 e Jalo Precoce x G23554, nas análises de grupamento

(Figuras 6 e 7), foram calculados índices cofenéticos de 0,73 e 0,87, respectivamente, com base na matriz de dissimilaridade, e índices de 0,86 e 0,87 para a matriz de similaridade genética. Foram selecionados, para o avanço de gerações, os genótipos (54, 92, 162, 127, 197, 220, 88, 128, 258 e 271 para o cruzamento Arc100 x G23554, geração F₂RC₁, e indivíduos 36, 335, 321, 235, 394, 2, 59 195, 14 e 144 para o cruzamento Jalo x G23554, geração F₂RC₁ (Figuras 10 e 11, respectivamente) mais próximos do genitor recorrente com base nos dados de similaridade genética com o pai recorrente.

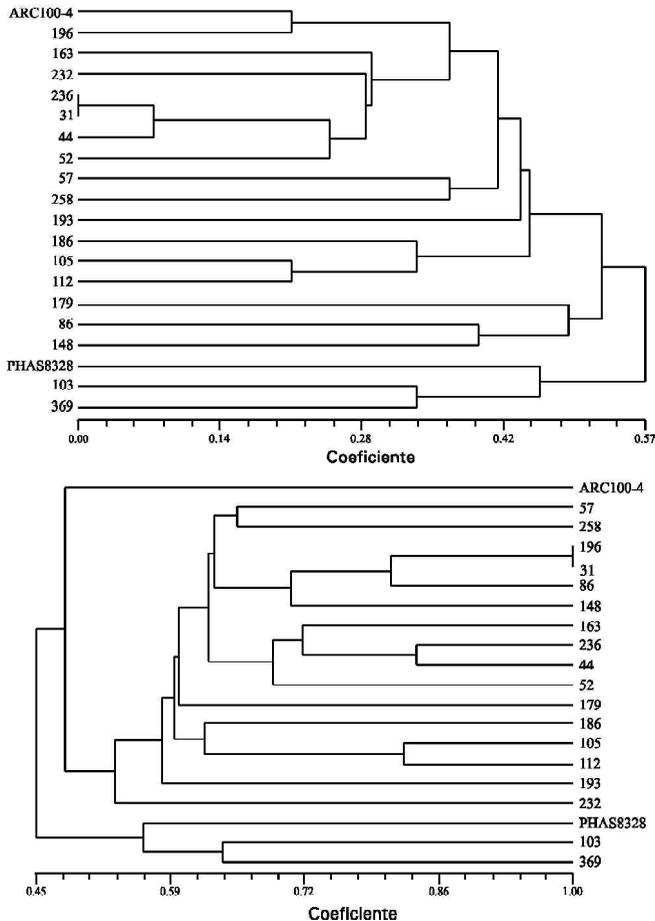


Fig. 4 . Dendrograma com base nos dados de frequência binária e análise binária, da geração F₂, de indivíduos da população segregante ARC100-4 x PHAS8328.

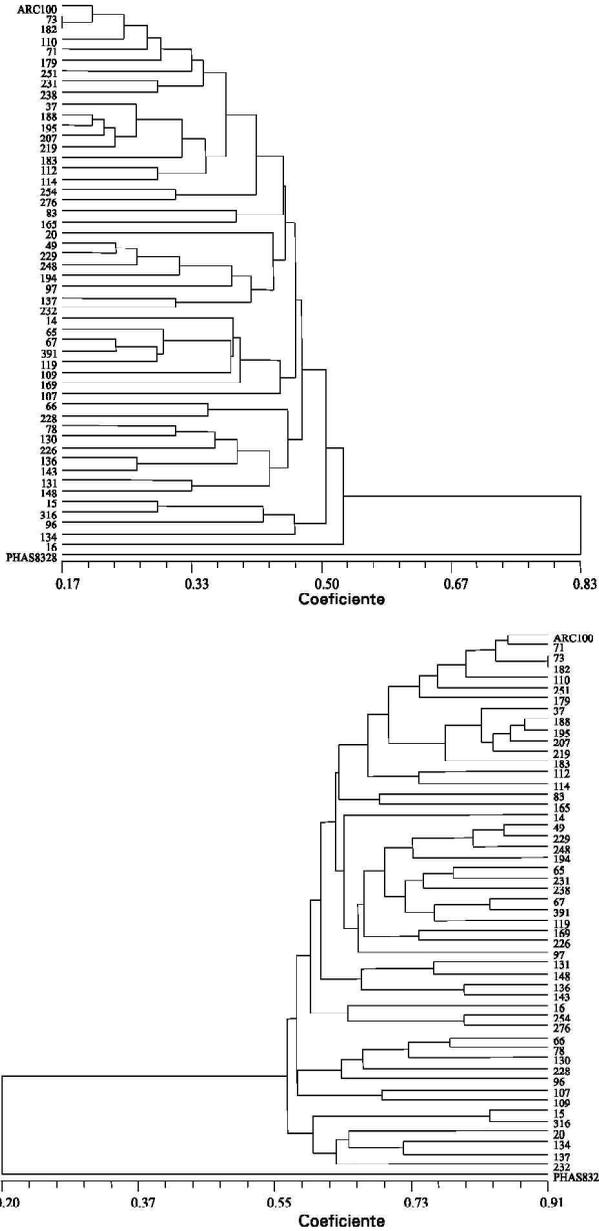


Fig. 5. Dendrograma com base nos dados frequência alélica e análise binária, na geração F_2RC_1 , de indivíduos da população segregante ARC100-4 x PHAS8328.

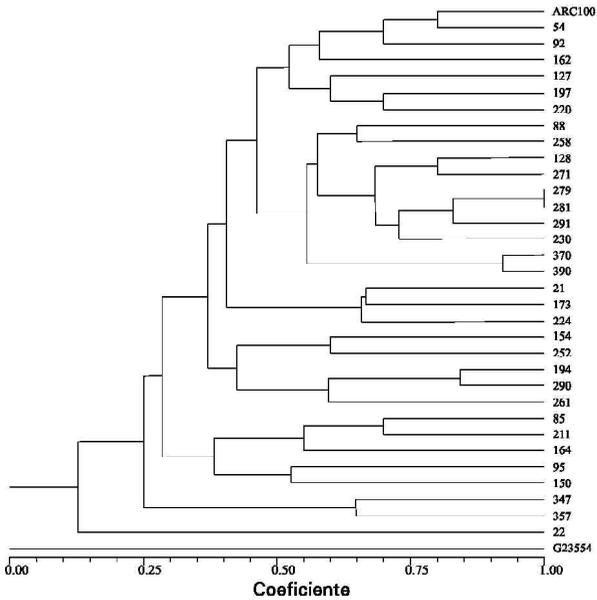
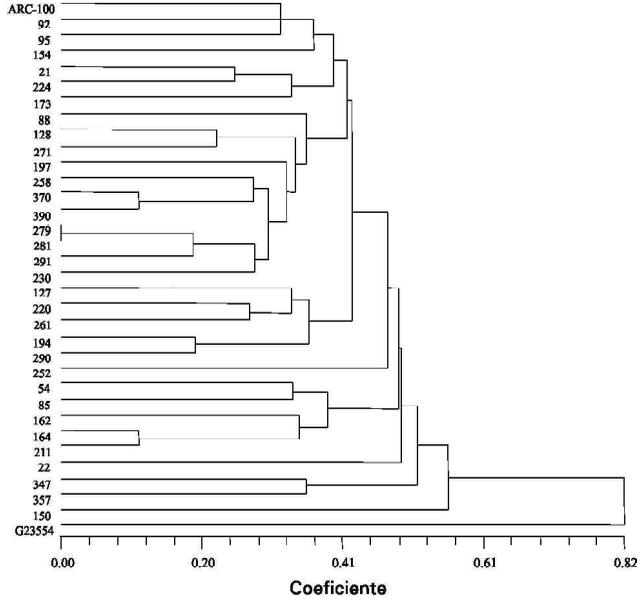


Fig. 6. Dendrograma com base nos dados frequência alélica e análise binária, na geração F_2RC_1 , com indivíduos da população segregante ARC100-4 x G23554.

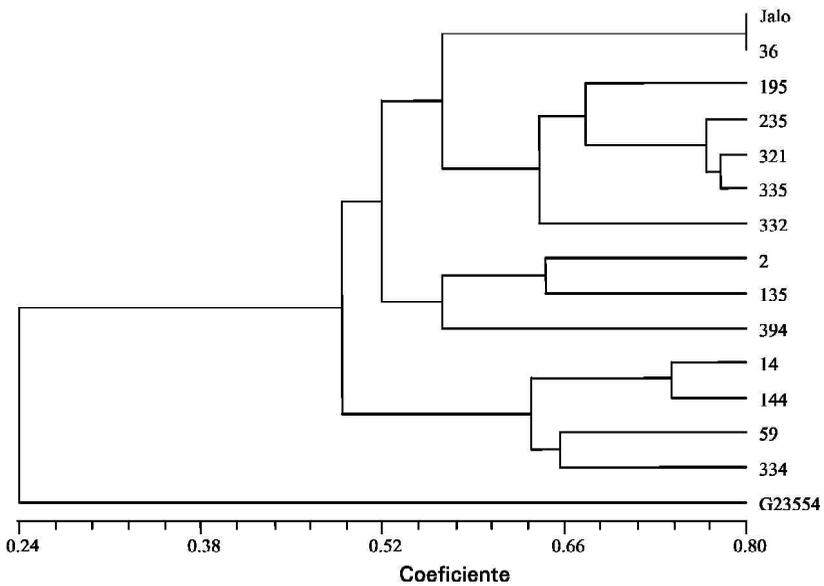
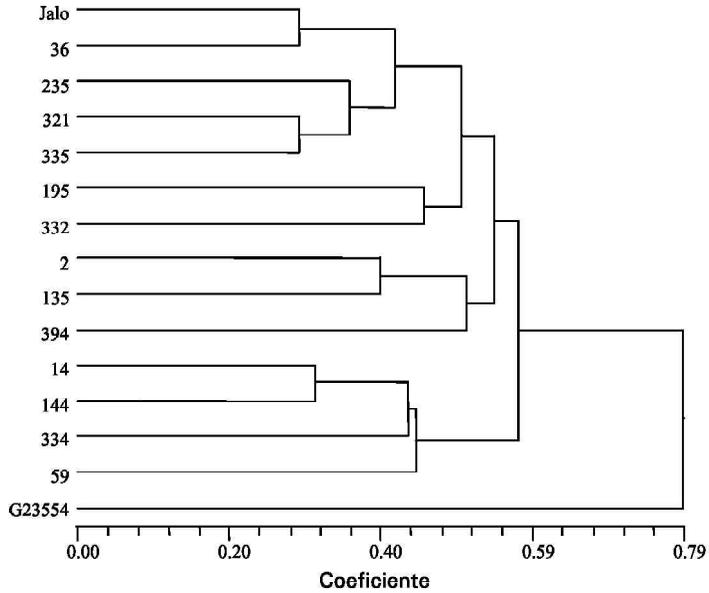


Fig. 7. Dendrograma com base nos dados de frequência alélica e análise binária, respectivamente, da geração F_2RC_1 de indivíduos da população segregante Jalo Precoce x G23554.

Comparando os dados de similaridade genética (Tabela 2) entre as plantas resistentes e o genitor recorrente, na geração F_2RC_1 dos cruzamentos onde se realizou uma geração de retrocruzamento assistido, com os cruzamentos onde não se realizou a seleção na primeira geração, nota-se que os maiores índices de similaridade com o genitor recorrente ocorreram quando a seleção foi assistida por marcadores SSRs (0,82 e 0,65, para os cruzamentos monitorados e 0,38 e 0,52 para os não monitorados). Estes resultados têm implicações práticas para o programa de melhoramento uma vez que, quanto mais gerações forem monitoradas com marcadores moleculares, menor será o número de retrocruzamentos necessários para a completa conversão da linhagem.

As análises de proporção do genoma do genitor recorrente nos indivíduos da geração F_2 (Tabela 2) revelaram índices que variam de 69,4% a 16,6%, com média de 41,9%, para a população ARC100-4 x DOR303 (Figura 8) e índices que variam de 71,8% a 25%, com média de 47,5%, para a população ARC100-4 x PHAS8328 (Figura 9). Esses resultados estão muito próximos do esperado para a geração F_2 (em média 50% do genoma de cada genitor), apesar de que no primeiro cruzamento os desvios da hipótese foram estatisticamente significativos pelo Teste do Qui-quadrado ($p=5\%$). Isto é um indicativo de que, nestes casos, os marcadores moleculares utilizados amostraram o genoma da espécie de forma eficiente. A proporção de genoma incorporado foi calculado na geração F_2RC_1 e resultou em estimativas que variaram de 100% a 72,2%, com média de 88,3%, desvios da hipótese significativos, para o cruzamento ARC100-4 x DOR303 e índices que variaram de 91,6% a 55,5%, com média de 76,7%, desvios da hipótese não significativos, para o cruzamento ARC100-4 x PHAS8328 (Figura 9). Para as análises na geração F_2RC_1 , que avançaram sem a seleção monitorada por marcadores, a proporção do genoma recorrente estimado variou de 92,5% a 47,5%, com média de 70,4%, para o cruzamento ARC100-4 x G23554, e de 88% a 52,3%, com média de 67,2%, para o cruzamento Jalo Precoces x G23554 (Figuras 10 e 11), ambos com desvios da hipótese significativos. As estimativas de proporção de genoma do genitor recorrente incorporado na geração F_2RC_1 , quando se comparam os cruzamentos onde se realizou o retrocruzamento assistido por marcadores SSRs na geração F_2 e os cruzamentos onde não se realizou a seleção (todas as plantas F_1 foram retrocruzadas), revelam que a proporção de genoma do genitor recorrente incorporado foi estatisticamente superior (Tabela 2), quando se realizou a seleção assistida (proporção de 88,3% e 76,7%, para os cruzamentos 1 e 2 respectivamente; e 70,4% e 67,2%, para os cruzamentos 3 e 4 respectivamente). Observa-se, com base nestas análises, uma maior eficiência em recuperar o genótipo do genitor elite por meio da realização da estratégia de retrocruzamento assistido nas sucessivas gerações.

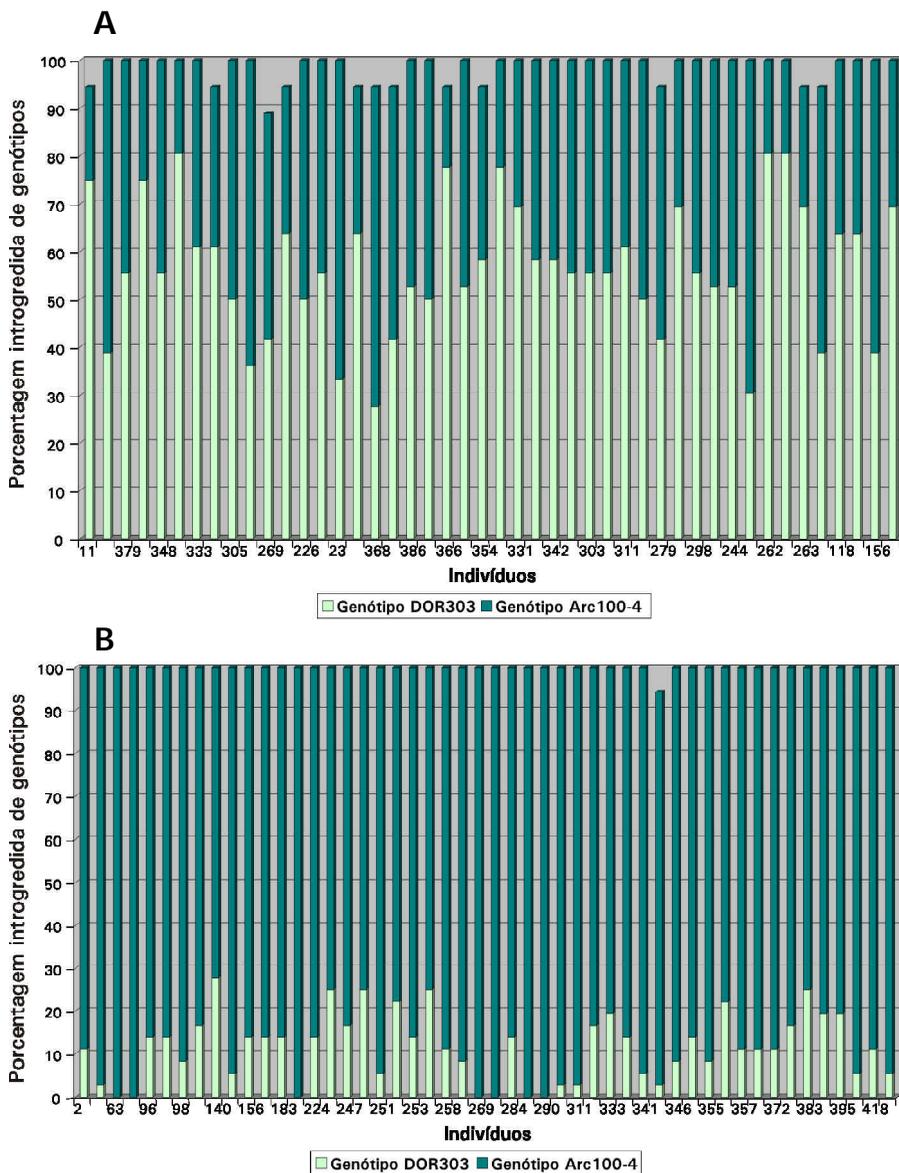


Fig. 8 . Proporção do genoma do genitor recorrente nas linhagens da geração F_2 (gráfico A) e do F_2RC_1 (gráfico B), respectivamente, tolerantes ao VMDF derivadas do cruzamento entre os genitores ARC100-4 e DOR303.

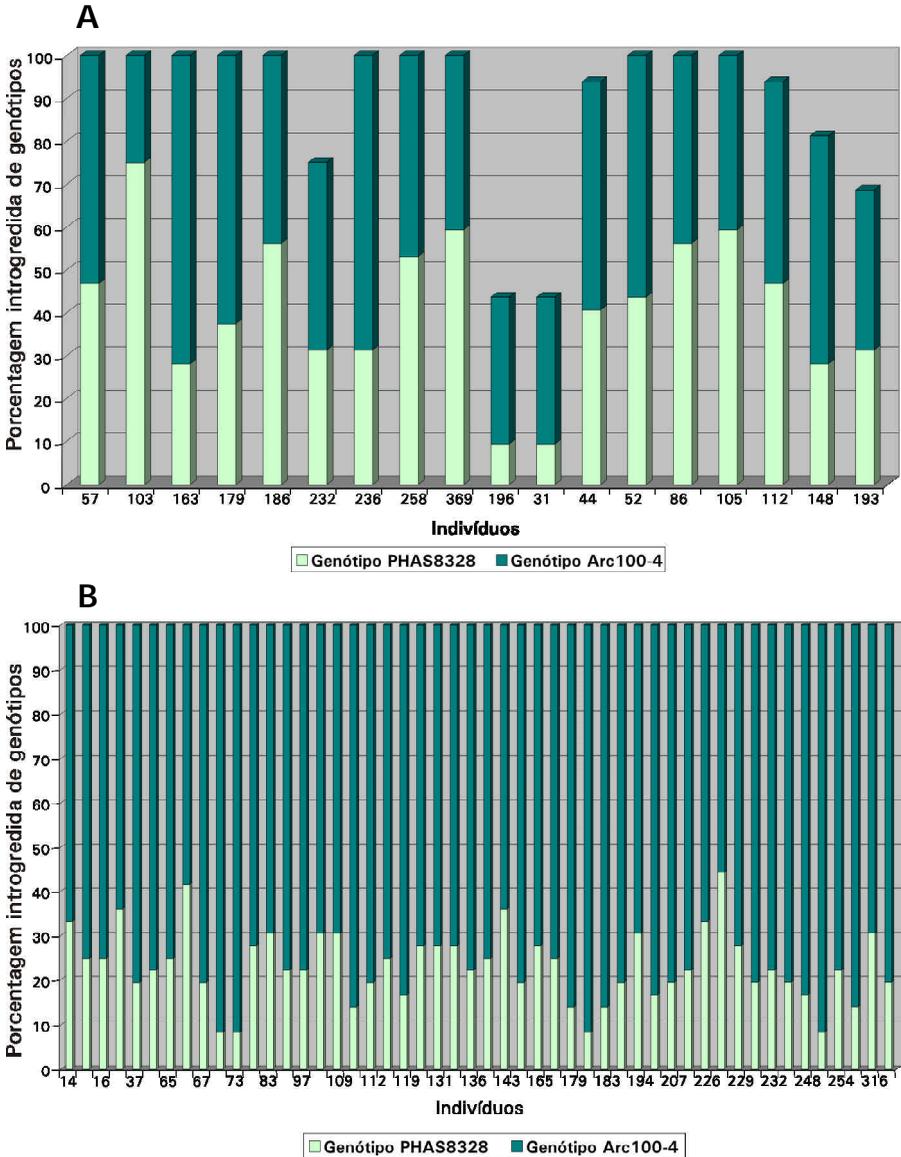


Fig. 9. Proporção do genoma do genitor recorrente incorporado nas linhagens da geração F₂ (gráfico A) e do F_{2,RC1} (gráfico B), respectivamente, tolerantes ao VMDF derivadas do cruzamento entre os genitores ARC100-4 e PHAS8328.

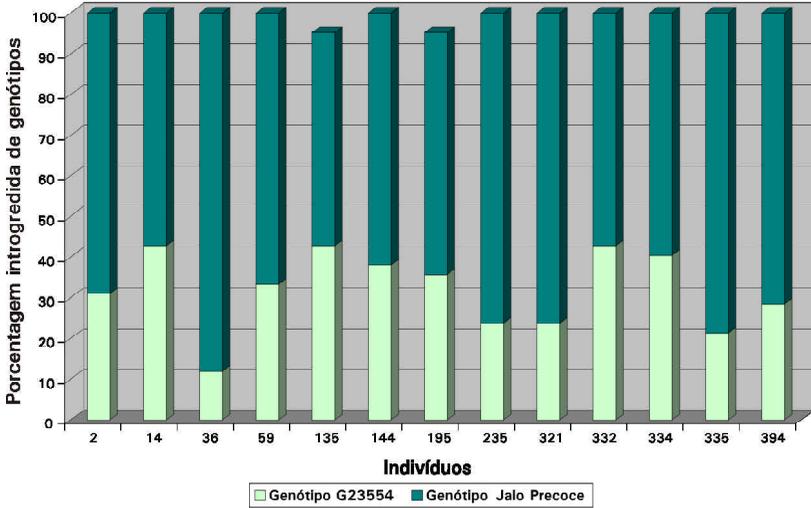


Fig. 10. Proporção do genoma do genitor recorrente incorporado nas linhagens da geração F_2RC_1 tolerantes ao VMDF derivadas do cruzamento entre os genitores Jalo Precoce e G23554.

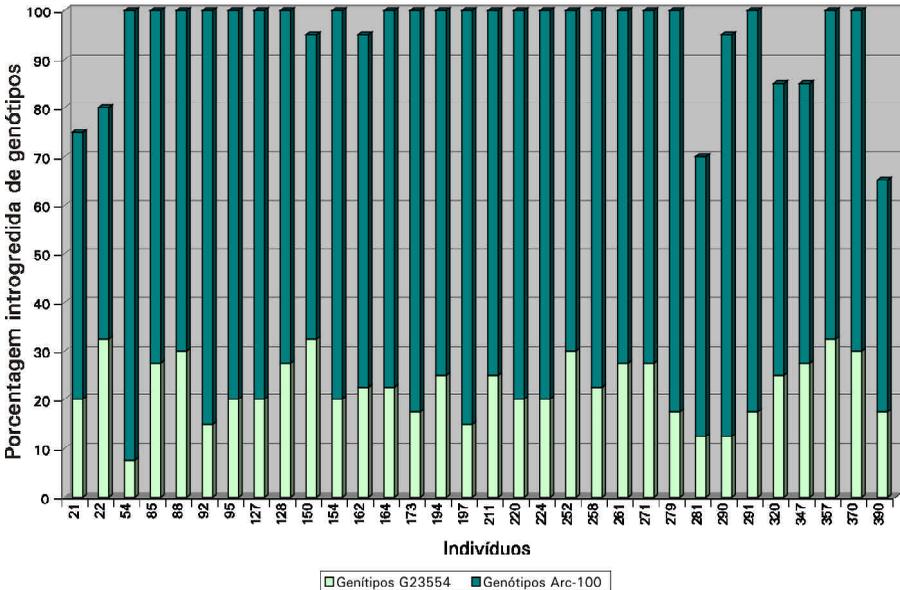


Fig. 11. Proporção do genoma do genitor recorrente incorporado nas linhagens da geração F_2RC_1 tolerantes ao VMDF derivadas do cruzamento entre os genitores ARC100-4 e G23554.

Uma vez que os efeitos da seleção assistida somente podem ser avaliados na geração seguinte, apenas na geração F_2RC_1 dos cruzamentos 1 e 2, onde os indivíduos F_2 foram selecionados com auxílio de marcadores SSRs, foi possível avaliar o efeito da seleção, estimado com base nos níveis de similaridade genética e proporção de genoma recuperado do genitor recorrente. Como a seleção foi no sentido de retrocruzar apenas os indivíduos F_2 mais similares ao genitor recorrente, era de se esperar um desvio para mais da proporção esperada de 75% de genoma do genitor recorrente recuperada na geração F_2RC_1 . Para o cruzamento 1, a seleção em F_2 mostrou-se eficiente com uma média de 88,3% do genoma recorrente observada, o que diferiu significativamente da proporção esperada (75%), pelo teste de Qui-quadrado a 5% de probabilidade (Tabela 2). Nesta situação, a seleção mostrou-se eficiente em acelerar o processo de conversão de linhagens. Para o cruzamento 2, não foram encontradas diferenças significativas pelo teste de Qui-quadrado a 7,9% de probabilidade (Tabela 2), entre os valores de proporção de genoma recuperado esperado e observado, indicando que a seleção não resultou em maior eficiência do que o esperado, no processo de recuperação da linhagem mais próximas do genitor recorrente. Entretanto, mesmo a recuperação não estando acima do esperado, quando as proporções estimadas em F_2RC_1 foram comparadas entre os cruzamentos 1 e 2 (com seleção assistida) e cruzamentos 3 e 4 (sem seleção), observou-se uma maior eficiência na recuperação do genoma do genitor recorrente, quando a seleção foi efetuada com o monitoramento de marcadores moleculares. Para os cruzamentos 1 e 2, estimou-se uma média de 82,5% de genoma recuperado, enquanto para os cruzamentos 3 e 4 a média foi de 68%, representando um ganho, estatisticamente significativo, de 14,5% na eficiência da recuperação do genoma recorrente.

Estes resultados são indicativos de que o processo de retrocruzamento assistido por marcadores é eficiente. Contudo, o reduzido número de plantas avaliadas e de marcadores utilizados em algumas populações e os diferentes grupos de marcadores analisados por cruzamento podem ter influenciado nas diferenças entre as estimativas encontradas, uma vez que determinados grupos de marcadores podem ter sido mais eficientes em amostrar o genoma como um todo, representando, de forma mais homogênea, regiões herdadas do genitor recorrente e doador. Certamente, um maior número de marcadores moleculares, com uma representatividade maior por grupo de ligação, traria uma maior precisão para a análise. Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), utilizando uma estratégia de distribuição de genótipos entre gerações, marcadores e número de

plantas, é possível identificar linhagens com mais de 94% de conversão em apenas duas gerações de retrocruzamento, podendo alcançar 98% em três gerações. A utilização da ferramenta molecular, aliada aos métodos de melhoramento genético, contribui de modo prático e significativo para a redução do número de retrocruzamentos necessários e também para a redução do tempo necessário para a recuperação do genoma do genitor recorrente.

Conclusões

- Os marcadores microsatélites mostraram-se eficientes para a detecção de polimorfismo entre os genitores dos diferentes cruzamentos, apresentando um perfil de fácil interpretação em géis de poliacrilamida.
- Para estimar, com maior precisão, a proporção de genoma introgridido no processo de conversão de linhagem, recomenda-se a utilização de um maior número de indivíduos das populações segregantes e de marcadores moleculares, principalmente na análise das gerações mais avançadas de retrocruzamento, onde a proporção do genoma do genitor doador é significativamente reduzida;
- A combinação das informações fenotípicas, da tolerância ao VMDF e genotípicas, por meio da determinação dos genótipos geneticamente mais relacionados aos genitores recorrentes, mostrou-se eficiente em acelerar o processo de recuperação de descendentes com maior parte do genoma do genitor cultivado.
- A utilização do método de retrocruzamento associado à seleção assistida possibilita o fortalecimento do uso rotineiro de ferramentas moleculares junto a programas de melhoramento genético do feijoeiro, tornando mais dinâmico o processo de desenvolvimento de genótipos tolerantes ao VMDF, ampliando o conhecimento da estrutura genética das populações.

Agradecimentos

Ao Antônio Cosmi de Freitas, Vanderlino Moreira de Santana e Vicente Henrique A. Tavares pela realização e condução dos trabalhos em telado e laboratório de apoio; ao Dr. Massaru Yokoyama pela disponibilização do espaço

físico e das moscas-brancas virulíferas para a infestação da plantas; ao CNPq pelo financiamento desse estudo e pela concessão da bolsa de Iniciação Científica à estudante Leciane Kárita.

Referências Bibliográficas

ALZATE-MARIN, A. L.; ARRUDA, M. C. C. de; MENARIM, H.; CHAGAS, J. M.; BARROS, E. G. de; MOREIRA, M. A. Identification of RAPD markers linked to resistance genes to anthracnose in common bean cultivars AB 136, TO and G2333. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, East Lansing, v. 42, p. 13-14, Mar. 1999.

BEEBE, S.; REGINFO, J.; GAITAN, E.; DUQUE, M. C.; TOHME, J. Diversity and origin of Andean landraces of common bean. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 3, p. 854-862, May/June 2001.

BLAIR, M. V.; BEAVER, J. C. Inheritance of bean golden mosaic virus resistance from bean genotype A429. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 36, p. 143, Mar. 1993.

BLAIR, M. V.; BEAVER, J. C.; ADAMES, C. Inheritance of the dwarfing response to bean golden mosaic virus infection in dry beans (*Phaseolus vulgaris*). **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 36, p. 144-145, Mar. 1993.

BROUGHTON, W. J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil**, The Hague, v. 252, n. 1, p. 55-128, May 2003.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of Single Sequence Repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 19, n. 4, p. 299-306, Dec. 2001.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1987.

FARIA, J. C.; ANJOS, J. R. N. A.; COSTA, A. F.; SPERANDIO, C. A.; COSTA, C. L. Doenças causadas por vírus e seu controle. In: ARAUJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F.; ZIMMERMANN, M. J. de O. (Ed.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Potafos, 1996. p. 731-769.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

FREYRE, R.; SKROCH, P. W.; GEFFROY, V.; ADAM-BLONDON, A. F.; SHIRMOHAMADALI, A.; JOHNSON, W. C.; LLACA, V.; NODARI, R. O.; PEREIRA, P. A.; TSAI, S. M.; TOHME, J.; DRON, M.; NIENHUIS, J.; VALLEJOS, C. E.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean: 4. development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 5/6, p. 847-856, Oct. 1998.

GARCIA, R. A. V.; BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; MELO, L.; BUSO, G. S. C.; BASSINELLO, P.; CARNEIRO, M. S.; SIBOV, S. T.; DEL PELOSO, M. J. Seleção de marcadores SSRs para o desenvolvimento de mapa genético para feijão visando a identificação de QTLs. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO - CONAFE, 8, 2005, Goiânia. **Anais...** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. v. 1, p. 45-48. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 182).

GOUDET, J. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, Washington, v. 86, n. 6, p. 485-486, Nov./Dec. 1995.

GRATTAPAGLIA, D.; O'MALLEY, D. M.; SEDEROFF, R. R. Multiple applications of RAPD markers to genetic analysis of *Eucalyptus* sp. In: IUFRO INTERNATIONAL CONFERENCE BREEDING TROPICAL TREES, 1992, Cali. **Proceedings...** Cali: [s.n.], 1992. p. 436-450.

GRISI, M. C. M.; BRONDANI, R. P. V.; DEL PELOSO, M. J.; BLAIR, M.; GEPTS, P.; BRONDANI, C. Integração de marcadores SSR no mapa genético consenso de feijão (BAT93XJALO EEP558). In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO - CONAFE, 8, 2005, Goiânia. **Anais...** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. v. 1, p. 37-40. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 182).

MELO, L. C.; FARIA, J. C.; ROSÁRIA, L.; YOKOYAMA, M.; BRONDANI, R. V. P.; DEL PELOSO, M. J.; BRONDANI, C.; FARIA, L. C. Controle genético da reação do feijoeiro comum ao vírus do mosaico dourado. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO - CONAFE, 8, 2005, Goiânia. **Anais...** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. v. 1, p. 393-396. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 182).

MORALES, F. J.; NIESSEN, A. I. Comparative responses of selected *Phaseolus vulgaris* germ plasm inoculated artificially and naturally with bean golden mosaic virus. **Plant Disease**, St. Paul, v. 72, n. 12, p. 1020-1023, Dec. 1988.

MUTLU, N.; MIKLAS, P.; REISER, J.; COYNE, D. Backcross breeding for improved resistance to common bacterial blight in pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Breeding**, Berlin, v. 124, n. 3, p. 282-287, June 2005.

NASS, L. L.; NISHIKAWA, M. A. N.; FÁVERO, A. P.; LOPES, M. A. Pré-melhoramento de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Org.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005.

PESSONI, L. A.; ZIMMERMANN, M. J. de O.; FARIA, J. C. de. Genetic control of characters associated with bean golden mosaic geminivirus resistance in *Phaseolus vulgaris* L. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 1, p. 51-58, Mar. 1997.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; ZIMMERMANN, M. J. de O. **Genética quantitativa em plantas autógamas**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 1993. 271 p.

ROHLF, F. J. **NTSYS-Pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter, 1989. Não paginado.

TANKSLEY, S. D.; MEDINA-FILHO, H.; RICK, C. M. The effect of isozyme selection on metric characters in an interspecific backcross of tomato: basis of an early screening procedure. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 60, n. 5, p. 291-296, Nov. 1981.

VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1983. 231 p.

VIEIRA, C.; BORÉM, A.; RAMALHO, M. A. P.; CARNEIRO, J. E. S. Melhora-
mento do feijão. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**.
Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2005. p. 301-391.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**: variability within and
among natural populations. Chicago: The Chicago University Press, 1978. v. 4.

YOKOYAMA, L. P. Importância econômica. In: AIDAR, H. (Ed.). **Cultivo do
feijoeiro comum**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2003.
(Embrapa Arroz e Feijão. Sistemas de Produção, 2). Disponível em: < [http://
sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/
importancia.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/importancia.htm) > . Acesso em: 16 dez. 2005.

