

# Diversidade genética e identificação de híbridos por marcadores RAPD em feijão-de-vagem

Marlon Peres da Silva<sup>1\*</sup>, Antônio Teixeira do Amaral Júnior<sup>1</sup>, Messias Gonzaga Pereira<sup>1</sup>, Rosana Rodrigues<sup>1</sup>, Rogério Figueiredo Daher<sup>1</sup> e Sheila Cristina Prucoli Posse<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF),  
<sup>2</sup>Laboratório de Fitotecnia (LFIT), Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Av. Alberto Lamego, 2000, 28013-202, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. \*Autor para correspondência: marlon@uenf.br

**RESUMO.** Cinco acessos de feijão-de-vagem da Coleção de Germoplasma da UENF foram avaliados quanto à diversidade genética por meio de caracteres morfoagronômicos e marcadores RAPD. Para tanto, foram utilizados os métodos multivariados de Agrupamento de Tocher e “Hierárquico do Vizinheiro Mais Próximo” e análise por meio de Variáveis Canônicas. Os resultados de cada método apresentaram semelhança, indicando a existência de variabilidade. A formação de grupos entre os genitores variou de acordo com o tipo de vagem. Conclui-se que é possível, em nível molecular ou morfoagronômico, inferir a respeito da diversidade genética dos genitores. Os marcadores RAPD permitiram a inequívoca identificação de híbridos.

**Palavras-chave:** feijão-de-vagem, diversidade genética, marcadores RAPD.

**ABSTRACT. Genetic diversity studies and hybrid identification in snap bean assisted by RAPD markers.** Five snap beans accessions from Germplasm Collection of UENF were evaluated concerning genetic diversity using morphological and agronomic traits, and RAPD markers. Multivariate analysis, including Tocher's methods, Nearest Neighbor and Canonical Variable were used to analyze the data. The results of each method showed resemblance, indicating the presence of genetic variability. The groups among parents were formed according to pod type. It was possible to detect genetic diversity among parents with molecular markers or morphagronomic traits. RAPD markers were useful for reliable hybrid identification.

**Key words:** snap beans, genetic diversity, RAPD.

## Introdução

Por muitos anos, a escolha dos métodos de melhoramento de plantas, bem como a identificação genotípica de plantas, tem sido implementada com base na avaliação de caracteres morfoagronômicos e fisiológicos. Porém, tais caracteres apresentam desvantagens quando utilizados como marcadores no estudo genético: alelos recessivos, fundamentais, para uso como marcadores, podem ser deletérios quando em homozigose; efeitos epistáticos e pleiotrópicos, ou ambos, podem, de forma significativa, limitar o número de marcadores em determinado estoque genético; a necessidade de cruzamentos, os quais nem sempre são de fácil execução e a obtenção de descendentes com os marcadores em proporções desejáveis (Barros, 1991).

O advento dos marcadores moleculares

possibilitou a discriminação genotípica, de forma hábil, pois permite o estudo da variação genética no nível do DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

A aplicação de técnicas multivariadas em estudos de diversidade genética tem permitido a potencialização da discriminação genotípica, mesmo quando são utilizados caracteres morfoagronômicos (Cruz e Regazzi, 2001).

No que se refere à cultura do feijão-de-vagem, a diversidade genética tem sido notadamente estreita, devido ao seu sistema de autopolinização, que proporciona elevada homogeneidade na espécie, uma vez que a possibilidade de ocorrer cruzamentos naturais entre plantas é muito pequena, variando, segundo Gonzales (1981), de 0 a 13%.

Segundo Singh *et al.* (1991), a avaliação da diversidade genética do feijão tem sido realizada por meio de caracteres morfoagronômicos, como tipo de semente, tipo de vagem, hábito de crescimento,

dentre outros. Raros são os estudos envolvendo marcadores moleculares nessa cultura, não obstante as dificuldades apresentadas por genes marcadores morfoagronômicos, o que reforça a necessidade da utilização de marcadores moleculares no estudo da divergência genética e, também, na identificação de híbridos.

Referindo-se aos marcadores moleculares, Ferreira e Grattapaglia (1998) relatam que esses recursos permitem ao pesquisador uma maior informação de dados, que, associadas aos dados fenotípicos, complementam os resultados desejados para os programas de melhoramento, exemplificando-se o planejamento de cruzamentos, o agrupamento de genótipos e a identificação de híbridos.

Este trabalho foi desenvolvido com o intento de caracterizar a variabilidade molecular de cinco genitores de feijão-de-vagem, por meio de técnica de RAPD, avaliar a diversidade morfoagronômica dos genitores e seus 10 híbridos dialélicos, identificar com fidedignidade os híbridos por meio de marcadores RAPD, e estimar a correlação entre as divergências morfoagronômicas e moleculares.

### Material e métodos

Foram avaliados cinco acessos de feijão-de-vagem (UENF 1429, UENF 1432, UENF 1442, UENF 1445 e UENF 1448) e suas 10 combinações híbridas  $F_1$ , em esquema dialélico, sem inclusão de recíprocos.

Efetuaram-se quatro semeaduras para obtenção das progênes, sendo que as duas primeiras ocorreram em maio de 2001, com o período de cruzamentos tendo ocorrido entre junho e julho de 2001, totalizando 581 cruzamentos. As outras duas semeaduras foram realizadas nos meses de julho e agosto de 2001, sendo os cruzamentos efetuados entre setembro e outubro de 2001, perfazendo um total de 528 cruzamentos. Os acessos UENF 1429, UENF 1432, UENF 1442 e UENF 1445 participaram como doadores de pólen, e os acessos UENF 1432, UENF 1442, UENF 1445 e UENF 1448, como receptores. Em todos os cultivos, o acesso UENF 1448, por ser precoce, foi semeado uma semana após os demais genitores. A semeadura estabelecida para avaliação do experimento foi realizada em julho de 2002, avaliando-se nove plantas de cada genitor e  $F_1$  em casa de vegetação, localizada na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em vasos plásticos com volume de 5,0 dm<sup>3</sup> de substrato, contendo 40% de solo, 40% de esterco bovino e 20% de areia.

As seguintes características foram avaliadas: a) comprimento médio da vagem (CV), expresso em cm, obtido pela quantificação do comprimento longitudinal de uma amostra de 10 vagens por planta, de todas as plantas de cada tratamento, em relação ao número de repetições; b) diâmetro de vagem (DV), expresso em mm, obtido pela medição da seção transversal da vagem com auxílio de um paquímetro digital, em uma amostra de 10 vagens de todas as plantas de cada tratamento, em relação ao número de repetições; c) número médio de lóculos por vagem (NL), obtido pela contagem do número total de lóculos de cada vagem, em uma amostra de 10 vagens por planta; d) altura média da inserção da primeira vagem (APV), expressa em cm, obtida pela medição da distância do colo até a inserção da primeira vagem, de todas as plantas de cada tratamento, relativo ao número total de repetições do experimento; e) teor de fibra (TF), obtido a partir de 10 g de vagens "in natura", triturados por três minutos em liquidificador; em seguida, as amostras foram colocadas em peneiras de 30 "mesh" e lavadas em água corrente; posteriormente, as amostras foram lavadas com acetona (100%) e secas em estufa a 105°C por cerca de uma hora, procedendo-se, em seguida, à pesagem do material (adaptado de Frank *et al.*, 1961; Rodrigues, 1997; Rodrigues *et al.*, 1998; Abreu, 2001); f) peso médio de vagens por planta (PMV), expresso em g, obtido pela relação entre o peso das vagens de todas as plantas de cada tratamento, em todos os blocos, e o número total de repetições; e g) número médio de vagens por planta (NMV), obtido pela razão entre o total de vagens, por tratamento, de todos os blocos em relação ao número de repetições.

Na análise estatística, identificados os pretensos híbridos que eram, de fato, autofecundações dos genitores, com base em marcadores RAPD, procedeu-se à avaliação das características morfoagronômicas por meio da análise de variância de blocos inteiramente casualizados entre os genitores e entre genitores e híbridos, utilizando os recursos computacionais do Programa Genes (Cruz, 2001).

Foram utilizados os recursos computacionais do Programa Genes (Cruz, 2001) na análise das Variáveis Canônicas e para os procedimentos de Agrupamento pelo Método de Otimização de Tocher e Hierárquico do "Vizinho mais Próximo" (Cruz e Regazzi, 2001), com base na Distância Generalizada de Mahalanobis, a qual leva em consideração a matriz de variâncias e covariâncias residuais (Miranda *et al.*, 1988).

Na identificação dos híbridos, empregou-se a

análise por marcadores RAPD. Para tanto, procedeu-se à extração do DNA genômico de cada genitor, conforme o método descrito por Doyle e Doyle (1990) e, em seguida, foram obtidos os “primers” selecionados para comprovação da hibridação nos indivíduos considerados F<sub>1</sub>.

Na execução do procedimento laboratorial, foram coletadas quatro folhas jovens e tenras de cada genitor, de plantas crescidas em casa de vegetação e, imediatamente, colocadas em meio ao nitrogênio líquido. Para a extração de DNA, cada amostra foi macerada em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó, sendo esse transferido, com cerca de 200 a 300 mg, para microtubos “eppendorf” de 2,0 mL, devidamente identificados. Em seguida, foi adicionado o volume de 1,2 mL de tampão de extração (CTAB 5%; NaCl 5 M; EDTA 0,5 M; Tris-HCl 1,0 M; pH 8,0; H<sub>2</sub>O; β-Mercaptoetanol a 0,1% e P.V.P a 1,0%) a cada tubo.

Os microtubos foram dispostos em suportes e incubados em banho-maria a 65°C por 40 minutos. Durante a incubação, os tubos foram suavemente agitados a cada 10 minutos e, em seguida, foram resfriados à temperatura ambiente e centrifugados a 14.000 rpm por cinco minutos, transferindo-se o sobrenadante (cerca de 0,9 mL) para novos microtubos de 2,0 mL, já identificados. Após, foi efetuada a desproteção, por meio da adição de 0,8 mL de clorofórmio-alcool isoamílico (24:1) a cada tubo, agitando-os suavemente por 10 minutos e promovendo uma nova centrifugação.

Novamente, o sobrenadante, cerca de 0,75 mL, foi transferido para novos tubos de 2,0 mL e adicionados 0,8 mL de clorofórmio-alcool isoamílico (24:1). Procedeu-se a uma nova centrifugação. Após essa etapa, a fase superior, aproximadamente 0,6 mL, foi transferida para novos tubos de 1,5 mL, e adicionados 2/3 do volume de isopropanol gelado, promovendo a precipitação dos ácidos nucléicos. Os tubos foram invertidos suavemente, algumas vezes, e incubados a -20°C por três horas. Após a incubação, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 14.000 rpm, promovendo a formação de um precipitado branco no fundo de cada tubo. O sobrenadante foi, então, removido e o precipitado, lavado duas vezes com etanol a 70% e uma vez com etanol a 95%.

Em seguida, o material ficou exposto à temperatura ambiente por 20 minutos, para secar, sendo ressuspensão em 0,25 mL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), contendo RNase na concentração final de 40 µg/mL. Após a ressuspensão, as amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C por 30 minutos e, em seguida,

foi adicionado NaCl a 5 M, na proporção de 1:10 (NaCl : DNA ressuspensão), e adicionados 2/3 do volume de isopropanol gelado para precipitar o DNA novamente.

O material foi incubado em geladeira a 4°C durante a noite. Posteriormente, as lavagens com etanol a 70% e a 95% foram repetidas e o precipitado final foi ressuspensão em 0,2 mL de TE, repousando durante quatro horas. Finalmente, o material foi quantificado com amostras de concentrações de 20, 40 e 80 ng/µl em gel de agarose, através da reflexão de luz ultravioleta sobre brometo de etídio.

Após a quantificação do DNA dos genitores, foram realizadas as devidas diluições e preparados os coquetéis de reagentes (água Milli-Q, tampão PCR 10X, Mg Cl<sub>2</sub> 25 mM, dNTPs, “primer”, Taq DNA Polimerase e DNA), para realização da reação de PCR, feita em termociclador por, aproximadamente, 4,5 horas, utilizando-se um volume final de 25 µl, seguindo metodologia descrita por Ferreira e Grattapaglia (1998), com a finalidade de promover a amplificação dos fragmentos de DNA e, diante da revelação em gel, selecionar os “primers” que apresentaram polimorfismo, para a identificação dos híbridos. Os seguintes “primers” foram utilizados: OPAA01, OPAA02, OPAA03, OPAA04, OPAA05, OPAA06, OPAA07, OPAA08, OPAA09, OPAA10, OPAA11, OPAA12, OPAA13, OPAA14, OPAA15, OPAA16, OPAA17, OPAA18, OPAA19, OPAA20, OPAB01, OPAB02, OPAB03, OPAB04, OPAB05, OPAB06, OPAB07, OPAB08, OPAB09, OPAB10, OPAB11, OPAB12, OPAB13, OPAB14, OPAB15, OPAB16, OPAB17, OPAB18, OPAB19, OPAB20, OPAE01, OPAE02, OPAE03, OPAE04, OPAE05, OPAE06, OPAE07, OPAE08, OPAE09, OPAE10, OPAE11, OPAE12, OPAE13, OPAE14, OPAE15, OPAE16, OPAE17, OPAE18, OPAE19, OPAE20, OPAC01, OPAC02, OPAC03, OPAC04, OPAC05, OPAC06, OPAC07, OPAC08, OPAC09, OPAC10, OPAC11 e OPAC12.

Após se obter os dados de presença e de ausência de bandas entre os genitores, por meio das imagens registradas em gel de agarose, obteve-se uma matriz de dados binários, pela atribuição de valor 1 à presença da banda gerada com a amplificação e valor 0 quando não se registrava a sua amplificação. A distância entre os pares dos genótipos foi calculada com base no Complemento Aritmético do Índice de Jaccard. Os procedimentos de Agrupamento pelo método de Otimização de Tocher e Hierárquico do “Vizinho mais Próximo” foram utilizados para confeccionar os agrupamentos dos genótipos (Cruz e Carneiro, 2003). Por fim, estimou-se a correlação de Pearson entre as distâncias genéticas com base no

Complemento Aritmético do Índice de Jaccard e na Distância Generalizada de Mahalanobis, utilizando o programa GENES (Cruz, 2001).

## Resultados e discussão

Para as sete características avaliadas, a análise de variância registrou diferença significativa entre as médias dos cinco genótipos estudados, em 1% de probabilidade pelo teste F (Tabela 1), indicando haver variabilidade genética entre eles.

O coeficiente de variação experimental revelou valores inferiores a 21%, indicando pouca influência ambiental. Valores elevados de 47,4064% para APV e de 31,2105% para NMV, provavelmente estão vinculados às variações nas alturas de inserção da primeira vagem entre os genótipos, bem como a amplitude diferencial na produtividade de vagens.

Pela análise obtida entre os genitores e híbridos, também foi verificada diferença significativa entre as médias dos genótipos, em 1% de probabilidade pelo teste F (Tabela 2). Este fato ratifica a existência de diferenças genéticas não apenas entre os genótipos utilizados nos cruzamentos, mas também entre estes e os híbridos, indicando possibilidade de ganhos em futuros programas de melhoramento.

À semelhança do que ocorreu com o comportamento do coeficiente de variação na análise dos genitores (Tabela 1), a inclusão dos híbridos continuou evidenciando os maiores valores para APV e NMV (53,6712% e 38,7919%, respectivamente), denotando que houve uma tendência na manutenção da diferença de amplitude entre as inserções das primeiras vagens, bem como entre a produtividade de vagens entre genitores e híbridos.

Pela comparação entre pais e pais e híbridos, foi

possível observar uma pequena redução de valores nas médias gerais das características CV, DV, APV e PMV. Por outro lado, as características NL, TF e NMV apresentaram pequeno acréscimo em suas médias gerais. Essa pequena variação entre os valores das médias gerais indica que a escolha correta dos genótipos a serem combinados em cruzamentos dialélicos podem favorecer a obtenção de um indivíduo superior com características agrônômicas desejáveis.

A quantificação da divergência genética entre os cinco genitores, por meio das sete características morfoagronômicas (Tabela 3), revelou que os genótipos mais similares foram UENF 1442 e UENF 1445, por apresentarem a menor magnitude de distância, correspondente a 15,5151. Os genótipos UENF 1429 e UENF 1432 constituíram o segundo par mais semelhante, expresso pelo valor de  $D_{ii}^2$  igual a 17,8205. Por sua vez, os genótipos UENF 1432 e UENF 1442 foram os mais divergentes, revelando a maior magnitude de distância, ou seja, 217,9565.

Tais resultados denotam a existência de 'pools gênicos' entre os materiais avaliados que, em razão do tipo de vagem, se "Macarrão" ou "Manteiga", exibem comportamento dissimilar ou de proximidade gênica. Isso é ratificado pelo fato de o par mais próximo possuir vagens do tipo "Manteiga"; de o segundo par similar deter vagem do tipo "Macarrão"; ao passo que o par mais distante, UENF 1432 e UENF 1442 detém vagem do tipo "Macarrão" e "Manteiga", respectivamente.

Todavia há que se ressaltar que o segundo par mais distante (UENF 1442 e UENF 1448) possui vagem do mesmo tipo, qual seja, "Manteiga". Assim,

**Tabela 1.** Variância univariada para sete características<sup>1</sup> avaliadas em cinco genótipos de feijão-de-vagem em Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro.

FV	GL	Quadrados médios						
		CV	DV	NL	APV	TF	PMV	NMV
Tratamentos	4	224,6312**	19,8250**	17,8721**	1221,5435**	1,1206**	167,6775**	178,2999**
Resíduos	40	1,0769	0,3318	0,1551	293,7459	0,0155	2,4260	32,6611
Média		16,0393	7,2251	7,7146	36,1533	0,6228	9,1410	18,3111
CVe (%)		6,4700	7,9728	5,1054	47,4064	20,0163	17,0393	31,2105

\*\* significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F; <sup>1</sup>CV = Comprimento de vagem; DV = Diâmetro de vagem; NL = Número médio de lóculos; APV = Altura de inserção da primeira vagem; TF = Teor de Fibras; PMV = Peso médio de vagens; e NMV = Número médio de vagens

**Tabela 2.** Variância univariada para sete características<sup>1</sup> avaliadas em 15 genótipos de feijão-de-vagem avaliados em Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro.

FV	GL	Quadrados médios						
		CV	DV	NL	APV	TF	PMV	NMV
Tratamentos	14	115,7895**	13,8559**	8,3167**	893,3428**	0,8118**	88,8762**	205,3629**
Resíduos	120	0,9457	0,2516	0,2755	315,1776	0,0219	2,2351	61,6277
Médias		15,9387	7,1026	7,7624	33,0777	0,6904	8,7715	20,2370
CVe (%)		6,1013	7,0630	6,7621	53,6712	21,4751	17,0440	38,7919

\*\* significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F; <sup>1</sup>CV = Comprimento de vagem; DV = Diâmetro de vagem; NL = Número médio de lóculos; APV = Altura de inserção da primeira vagem; TF = Teor de Fibras; PMV = Peso médio de vagens; e NMV = Número médio de vagens

a lógica da ocorrência de ‘pools gênicos’ com base no tipo de vagem deve ser analisada com certo ceticismo. Falconer (1987) recomenda cruzamentos entre genótipos mais contrastantes, uma vez que maior efeito heterótico é esperado em híbridos entre populações mais divergentes. Desse modo, os genótipos UENF 1432 e UENF 1442 seriam os mais indicados para tais cruzamentos.

Entretanto não se pode deixar de comentar a respeito da estreita base genética do feijão-de-vagem, por se tratar de uma espécie autógama. Portanto a necessidade de cruzamento entre diversos genótipos para obtenção de uma ampla gama de indivíduos é bastante conveniente. Isso posto, a utilização de combinações múltiplas a partir de cruzamentos dialélicos é uma alternativa viável para a ampliação da base genética da espécie e a obtenção de segregantes superiores.

Pelos resultados obtidos das distâncias de Mahalanobis entre genitores e híbridos (Tabela 4), verifica-se que os genótipos UENF 1442 e UENF 1448 foram os mais divergentes (199,6305).

Isso denota a inexistência de heterobeliose, enquanto genitores mais divergentes (Tabela 3); não houve híbrido que os suplantassem com relação ao valor de distância genética, mantendo-se como os mais divergentes, mesmo na presença dos F<sub>1s</sub>. Assim, tais genótipos seriam indicados como os mais adequados para a obtenção de um indivíduo com expressivo efeito heterótico.

Os híbridos UENF 1448 x UENF 1442 e UENF 1448 x UENF 1445 apresentaram o menor valor de  $D_{ii}^2$  (1,0564), revelando elevada similaridade. Esse fato não era esperado, vez que UENF 1448 e UENF 1442 detiveram o segundo maior valor de  $D_{ii}^2$  (Tabela 3); e UENF 1445 e UENF 1448, a quarta magnitude de  $D_{ii}^2$ , conforme Tabela 3.

**Tabela 4.** Medidas de dissimilaridade entre 15 genótipos de feijão-de-vagem em relação a sete características, com base na Distância Generalizada de Mahalanobis ( $D_{ii}^2$ ).

Genótipos <sup>1</sup>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	10,0175	161,5507	114,5998	90,8297	2,6046	49,1505	48,2034	58,9425	49,3516	36,2998	42,1758	125,5515	60,4666	68,4631
2		142,2108	100,0731	84,9768	7,8799	40,5542	44,8013	63,0834	36,2936	30,7626	39,9424	107,5194	61,5378	65,0370
3			8,8892	199,6305	170,9010	34,9875	35,7115	125,3462	36,6403	46,7443	129,9632	6,7685	116,2634	107,5857
4				157,4579	122,9383	18,2069	18,5850	92,2945	20,4095	23,4150	92,8676	2,9218	83,6757	76,4182
5					101,8725	99,5927	114,5136	14,7894	105,6239	105,3443	13,4299	149,6587	18,1602	17,8448
6						55,2429	55,3042	73,4811	52,0678	41,9881	52,4096	136,8861	74,7181	82,4688
7							1,2427	48,9536	2,4974	2,3896	44,4387	20,6342	42,9711	41,8828
8								56,5531	4,8617	2,1084	53,1648	22,7830	50,4935	50,6428
9									58,0129	53,6905	4,0860	87,5332	1,5143	2,7848
10										3,6772	48,7725	23,7955	53,7558	51,2424
11											45,6215	28,5033	48,6046	48,2846
12												89,6377	5,8582	6,4530
13													78,8656	70,5198
14														1,0564

<sup>1</sup> 1 = UENF 1429; 2 = UENF 1432; 3 = UENF 1442; 4 = UENF 1445; 5 = UENF 1448; 6 = UENF 1432 x UENF 1429; 7 = UENF 1442 x UENF 1429; 8 = UENF 1445 x UENF 1429; 9 = UENF 1448 x UENF 1429; 10 = UENF 1442 x UENF 1432; 11 = UENF 1445 x UENF 1432; 12 = UENF 1448 x UENF 1432; 13 = UENF 1445 x UENF 1442; 14 = UENF 1448 x UENF 1442; e 15 = UENF 1448 x UENF 1445

**Tabela 3.** Medidas de Dissimilaridade entre cinco genótipos de feijão-de-vagem em relação a sete características, com base na Distância Generalizada de Mahalanobis ( $D_{ii}^2$ ).

Genótipos	UENF 1432	UENF 1442	UENF 1445	UENF 1448
UENF 1429	17,8205	201,9356	125,8080	108,9340
UENF 1432		217,9565	140,7979	107,8062
UENF 1442			15,5151	211,1905
UENF 1445				159,2312

Pelo Método de Tocher (Tabela 5), utilizando-se apenas os genitores, houve a formação de três grupos. Esse resultado revela que os genótipos com mesmo tipo de vagem se uniram em grupos; entretanto há presença de certa divergência genética entre os pais, posto que um dos genótipos com vagem tipo “Manteiga” ficou configurado em um grupo isolado. O grupo I foi composto pelos genótipos UENF 1442 e UENF 1445, os quais apresentaram a menor magnitude de dissimilaridade, obtida pela Distância Generalizada de Mahalanobis (Tabela 3). O grupo II foi constituído pelo genótipo UENF 1429 e UENF 1432, enquanto o grupo III, formado apenas pelo genótipo UENF 1448, indica elevada divergência deste para com os demais, confirmando os valores elevados das suas distâncias nos pares em que participou (Tabela 3).

Com base no Método Hierárquico do “Vizinho mais Próximo” (Figura 1), com corte de 30%, depreende-se a formação dos mesmos grupos representados no método anterior, confirmando os resultados obtidos pelas distâncias de Mahalanobis (Tabela 3). O genótipo UENF 1448 foi caracterizado como o mais divergente em todos os métodos utilizados.

Pela análise do Método de Otimização de Tocher entre genitores e híbridos (Tabela 6), foi registrada a formação de cinco grupos, sendo que apenas um grupo revelou um único genótipo. Destaca-se que o grupo I foi configurado pela presença de quatro híbridos, todos tendo o genótipo UENF 1448 como receptor de pólen e os genitores restantes como doadores em cada combinação. O grupo II apresentou as combinações UENF 1442 x UENF 1429, UENF 1445 x UENF 1429, UENF 1442 x UENF 1432 e UENF 1445 x UENF 1432. Os genitores UENF 1429 e UENF 1432, juntamente com o híbrido formado pela sua combinação (1432 x UENF 1429) compuseram o grupo III. O híbrido UENF 1445 x UENF 1442 e os genitores UENF 1445 e UENF 1442, representaram o grupo IV, enquanto o genitor UENF 1448 ficou isolado dos demais, representando o grupo V.

Por meio de análise da Figura 2, obtida pelo Método Hierárquico do “Vizinho mais Próximo”, entre genitores e híbridos, com corte de 30%, foi estabelecida a formação de cinco grupos, assim como observado no método de Tocher (Tabela 6), ocorrendo apenas a troca de ordem entre eles, sendo que os grupos II, IV e V de Tocher correspondem aos respectivos grupos IV, V e II do método do “Vizinho mais Próximo”.

**Tabela 5.** Agrupamento pelo método de Tocher, de cinco genótipos de feijão-de-vagem, com base na Distância Generalizada de Mahalanobis ( $D_{ii}^2$ ).

Grupo	Genótipos
I	UENF 1442 e UENF 1445
II	UENF 1429 e UENF 1432
III	UENF 1448

Apesar da concordância nos resultado das análises, Amaral Júnior (1996), referindo-se aos métodos de agrupamento utilizados, alerta para o modo subjetivo como são caracterizados os grupos nos métodos hierárquicos, relatando, ainda, que há maior confiabilidade nos métodos de otimização em relação aos hierárquicos, por proporcionar a formação de grupos independentes, não-relacionados.

**Tabela 6.** Agrupamento pelo Método de Tocher, de 15 genótipos de feijão-de-vagem, com base na Distância Generalizada de Mahalanobis ( $D_{ii}^2$ ).

Grupo	Genótipos
I	UENF 1448 x UENF 1442, UENF 1448 x UENF 1445, UENF 1448 x UENF 1429 e UENF 1448 x UENF 1432
II	UENF 1442 x UENF 1429, UENF 1445 x UENF 1429, UENF 1445 x UENF 1432 e UENF 1442 x UENF 1432
III	UENF 1429, UENF 1432 x UENF 1429 e UENF 1432
IV	UENF 1445, UENF 1445 x UENF 1442 e UENF 1442
V	UENF 1448

0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

**Figura 1.** Dendrograma da dissimilaridade genética entre cinco genótipos<sup>1</sup> de feijão-de-vagem, obtido pelo Método Hierárquico do Vizinho mais Próximo, com base em sete características, utilizando-se a Distância Generalizada de Mahalanobis ( $D_{ii}^2$ ).

<sup>1</sup> 1 = UENF 1429; 2 = UENF 1432; 3 = UENF 1442; 4 = UENF 1445; e 5 = UENF 1448

0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

**Figura 2.** Dendrograma da dissimilaridade genética entre 15 genótipos<sup>1</sup> de feijão-de-vagem, obtido pelo Método Hierárquico do “Vizinho mais Próximo”, com base em sete características, utilizando-se a Distância Generalizada de Mahalanobis ( $D_{ii}^2$ ).

<sup>1</sup> 1 = UENF 1429; 2 = UENF 1432; 3 = UENF 1442; 4 = UENF 1445; 5 = UENF 1448; 6 = UENF 1432 x UENF 1429; 7 = UENF 1442 x UENF 1429; 8 = UENF 1445 x UENF 1429; 9 = UENF 1448 x UENF 1429; 10 = UENF 1442 x UENF 1432; 11 = UENF 1445 x UENF 1432; 12 = UENF 1448 x UENF 1432; 13 = UENF 1445 x UENF 1442; 14 = UENF 1448 x UENF 1442; e 15 = UENF 1448 x UENF 1445

As variâncias acumuladas pelas Variáveis Canônicas, demonstradas na Tabela 7, para as sete características avaliadas entre os cinco genitores, explicaram o acúmulo necessário de 80% da variação total nas duas primeiras Variáveis Canônicas, para permitir o estudo da divergência genética dos genitores, no espaço bidimensional (Figura 3).

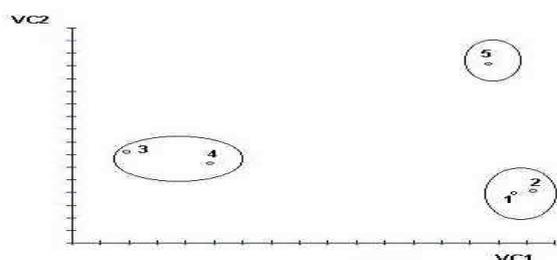
Analisando a distribuição dos genótipos na Figura 3, nota-se a formação de três grupos, sendo que o acesso UENF 1448 apresentou-se como o único representante de um dos grupos, evidenciando a distância deste em relação aos demais. Os acessos UENF 1429 e UENF 1432 formaram outro grupo, com os acessos UENF 1442 e UENF 1445 compondo o terceiro.

**Tabela 7.** Variâncias acumuladas (%) para Variáveis Canônicas das sete características avaliadas entre genitores.

Variância acumulada (%)	Vci						
	VC1	VC2	VC3	VC4	VC5	VC6	VC7
	69,0123	95,4773	98,8257	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000

Esses resultados apresentaram completa identidade com os dados obtidos pelo agrupamento de Tocher (Tabela 5) e com o método Hierárquico do “Vizinho mais Próximo” (Figura 1).

Em relação à análise das Variáveis Canônicas, incluindo genitores e híbridos, percebe-se, pela Tabela 8, que as variâncias acumuladas para as sete características avaliadas explicaram o acúmulo necessário de 80% da variação total nas duas primeiras Variáveis Canônicas, dessa forma, permitiu-se o estudo da divergência genética entre eles em gráfico de dispersão bidimensional (Figura 4).



**Figura 3.** Dispersão gráfica dos escores, em relação aos dois eixos representativos das duas primeiras Variáveis Canônicas (VC1 e VC2), de sete características avaliadas em 5 genótipos<sup>1</sup> de feijão-de-vagem

<sup>1</sup> 1 = UENF 1429; 2 = UENF 1432; 3 = UENF 1442; 4 = UENF 1445; e 5 = UENF 1448

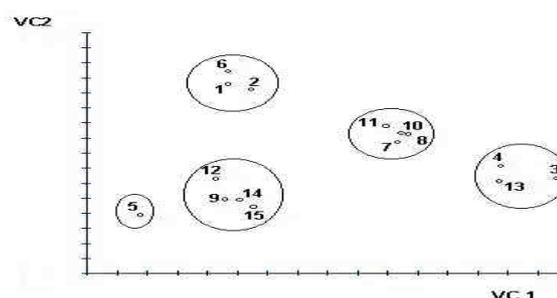
**Tabela 8.** Variâncias acumuladas (%) para Variáveis Canônicas das sete características avaliadas entre genitores e híbridos dialélicos.

Variância a Cumulada (%)	Vci						
	VC1	VC2	VC3	VC4	VC5	VC6	VC7
	62,2480	95,2128	97,8515	98,8416	99,5068	99,8833	100,0000

Depreende-se, pela Figura 4, a formação de cinco grupos. Todos apresentam uma certa dissimilaridade, caracterizando a divergência existente entre eles. Há dois grupos com quatro genótipos cada, sendo que, em um deles, estão presentes os híbridos UENF 1448 x UENF 1429, UENF 1448 x UENF 1432, UENF 1448 x UENF 1442 e UENF 1448 x UENF 1445, ou seja, esse grupo é formado excepcionalmente por híbridos que contêm o genótipo UENF 1448 como receptor de pólen, e os demais genitores como doadores nos cruzamentos dialélicos. O outro grupo com quatro

genótipos é representado pelos híbridos UENF 1442 x UENF 1429, UENF 1445 x UENF 1429, UENF 1442 x UENF 1432 e UENF 1445 x UENF 1432. Outros dois grupos estão representados por dois genitores e um híbrido cada, sendo que, em um deles, estão os genótipos UENF 1442, UENF 1445 e o híbrido obtido do cruzamento entre ambos, ou seja, UENF 1445 x UENF 1442. Os genótipos UENF 1429, UENF 1432 e seu híbrido, UENF 1432 x UENF 1429, completam os grupos representados por dois genitores e um híbrido. Por fim, encontra-se o único grupo com apenas um genótipo, UENF 1448. Esses dados asseguram a eficiência do modelo, por agrupar genótipos com características bastante semelhantes, e proporcionar ao mesmo indivíduo receptor de pólen, ou ao híbrido resultante do cruzamento dos demais participantes, alocarem-se no mesmo grupo.

Para a análise conjunta entre genitores e híbridos, foi observada total coerência com os métodos de Tocher (Tabela 6) e com o “Vizinho mais Próximo” (Figura 2).

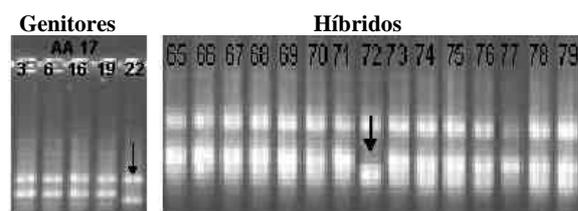


**Figura 4.** Dispersão gráfica dos escores, em relação aos dois eixos representativos das duas primeiras Variáveis Canônicas (VC1 e VC2), de sete características avaliadas em quinze genótipos<sup>1</sup> de feijão-de-vagem.

<sup>1</sup> 1 = UENF 1429; 2 = UENF 1432; 3 = UENF 1442; 4 = UENF 1445; 5 = UENF 1448; 6 = UENF 1432 x UENF 1429; 7 = UENF 1442 x UENF 1429; 8 = UENF 1445 x UENF 1429; 9 = UENF 1448 x UENF 1429; 10 = UENF 1442 x UENF 1432; 11 = UENF 1445 x UENF 1432; 12 = UENF 1448 x UENF 1432; 13 = UENF 1445 x UENF 1442; 14 = UENF 1448 x UENF 1442; e 15 = UENF 1448 x UENF 1445.

Identificados os “primers” polimórficos, foram selecionados aqueles que apresentavam as melhores “bandas” para distinção dos genitores, quais sejam: OPAA 11, OPAA 17, OPAA 04, OPAB 08, OPAC 01, OPAC 05, e OPAA 11.

Como exemplo, na Figura 5, o “primer” OPAA 17 apresentou polimorfismo entre o genitor UENF 1448 e os demais, possibilitando a identificação de todos os cruzamentos em que esse genitor participava. Pela mesma figura, observa-se que a combinação UENF 1448 X UENF 1442 apresentou ausência de fragmento em um dos indivíduos,



**Figura 5.** Análise de marcadores RAPD entre genitores e híbridos. A seta no genitor 22 (UENF 1448) indica a presença de banda diferencial entre os demais; a seta no genótipo 72 indica a ocorrência de autofecundação.

caracterizando autofecundação do mesmo e hibridação dos demais. O mesmo princípio foi utilizado para confirmação de 139 indivíduos, em um total de 150. Para o estudo da diversidade genética entre os genitores, foram utilizados 72 “primers”, que possibilitaram a obtenção de 264 marcas, sendo 88 polimórficas, utilizadas para a confecção de uma matriz de dados binários, a qual possibilitou gerar a matriz de dissimilaridade genética baseada no Complemento Aritmético do Índice de Jaccard (Cruz e Carneiro, 2003).

Na Tabela 9, encontram-se os dados obtidos pelo Complemento Aritmético do Índice de Jaccard para os cinco genitores. Verifica-se que os pais UENF 1429 e UENF 1432 foram os mais similares, por registrarem a menor distância (0,1528). De forma contrária, os genitores UENF 1445 e UENF 1448 foram os mais dissimilares, com valor de distância igual a 0,2040.

Esses resultados não são iguais aos obtidos com a Distância de Mahalanobis (Tabela 3); porém apresentam certa concordância no que diz respeito aos caracteres agrônômicos da cultura. Pelo método de Mahalanobis, os genitores mais similares foram UENF 1442 e UENF 1445, ou seja, genótipos com vagem do tipo “Manteiga”, e, por sua vez, o método realizado pelo Complemento Aritmético do Índice de Jaccard atribuiu similaridade aos genitores que apresentam vagem do tipo “Macarrão”, identificados como UENF 1429 e UENF 1432, os quais também foram considerados, pelo método de Mahalanobis, com alta similaridade, constituindo o segundo par com menor valor de  $D_{ii}^2$  (Tabela 3). De forma análoga, apresentaram-se os genitores mais

divergentes, sendo que um apresenta vagem tipo “Manteiga” e o outro, tipo “Macarrão”, denotando que houve congruência entre as distâncias moleculares e o tipo de vagem dos genótipos.

O agrupamento obtido pelo Método de Tocher, realizado pelo Complemento Aritmético do Índice de Jaccard (Tabela 10), revelou a formação de três grupos, sendo o grupo I composto pelos genitores UENF 1429 e UENF 1432. Os genitores UENF 1442 e UENF 1448 formaram o grupo II. E, por fim, apresentou-se o grupo III com o genitor, UENF 1445. Esses resultados foram, de certa forma, concordantes com o Método de Tocher (Tabela 5), no qual foram registrados três grupos, sendo que o grupo I foi correspondente ao grupo II presente na Tabela 5, diferenciando-se os grupos II e III, em que o genitor UENF 1445 assumiu um grupo isoladamente, trocando de posição com UENF 1448.

**Tabela 10.** Agrupamento pelo Método de Tocher, de cinco genótipos de feijão-de-vagem, com base no Complemento Aritmético do Índice de Jaccard.

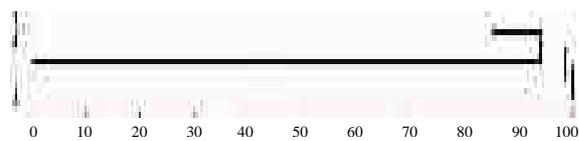
Grupo	Genótipos
I	UENF 1429 e UENF 1432
II	UENF 1442 e UENF 1448
III	UENF 1445

Pela análise de agrupamento utilizando o Método Hierárquico do “Vizinho mais Próximo”, de acordo com o Complemento aritmético de Jaccard (Figura 6), foi possível estabelecer a formação de quatro grupos.

Visualiza-se um grupo com os genitores UENF 1429 e UENF 1432, sendo que os demais grupos apresentaram um único genitor cada, caracterizados pelos genótipos UENF 1445, UENF 1448 e UENF 1442, respectivamente. Em relação à Figura 1, na qual se avaliaram os agrupamentos por meio de características morfoagrônômicas, houve certa relação, devido à concordância na detecção de um grupo composto pelos genitores UENF 1429 e UENF 1432, e de um grupo formado apenas pelo genitor UENF 1448. Entretanto, os demais genitores, UENF 1442 e UENF 1445 compartilharam o mesmo grupo.

**Tabela 9.** Medidas de Dissimilaridade entre cinco genótipos de feijão-de-vagem, com base no Complemento Aritmético do Índice de Jaccard.

Genótipos	UENF 1432	UENF 1442	UENF 1445	UENF 1448
UENF 1429	0,1528	0,1821	0,1687	0,1769
UENF 1432		0,1935	0,2024	0,1885
UENF 1442			0,1795	0,1951
UENF 1445				0,2040



**Figura 6.** Dendrograma da dissimilaridade genética entre cinco genótipos<sup>1</sup> de feijão-de-vagem, obtido pelo Método Hierárquico do “Vizinho mais Próximo”, utilizando-se o Complemento Aritmético do Índice de Jaccard.

<sup>1</sup> 1 = UENF 1429; 2 = UENF 1432; 3 = UENF 1442; 4 = UENF 1445; e 5 = UENF 1448.

A estimativa da correlação de Pearson entre a diversidades molecular e morfoagronômica dos cinco genitores (Tabela 11) revelou diferença significativa em 5 % de probabilidade pelo teste t.

**Tabela 11.** Valor da correlação entre a diversidade molecular e morfoagronômica, e análise de significância pelo teste t.

Correlação	R	Alfa (5 %)
Jaccard		
X	0,6315	4,8706 *
Mahalanobis		

## Conclusão

A presença de valor positivo e significativo nessa correlação permite argumentar que a avaliação molecular possibilita inferir a respeito da diversidade genética existente entre os genitores presentes neste trabalho. Também é possível argumentar que as características morfoagronômicas não apresentaram variação proeminente em relação ao que era esperado em nível molecular, ou seja, houve pouco efeito ambiental no comportamento dos genitores. Conclui-se, pois, que é possível, em nível molecular ou morfoagronômico, inferir a respeito da divergência genética dos cinco genitores utilizados neste trabalho.

## Referências

ABREU, F.B. *Aplicação de técnicas de análise multivariada em acessos de feijão-de-vagem (Phaseolus vulgaris L.) de crescimento indeterminado do banco de germoplasma da UENF*. 2001. Tese (Mestrado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes. 2001.

AMARAL JÚNIOR, A.T. *Análise dialélica de betacaroteno, vitamina C, sólidos solúveis e produção e variabilidade em*

*cultivares de tomateiro (Lycopersicon esculentum Mill.) via marcadores RAPD*. 1996. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.

BARROS, L.M. *Caracterização morfológica e enzimática do cajueiro (Anacardium occidentale L.), tipos comum e anão precoce, por meio de técnicas multivariadas*. 1991. Tese (Doutorado)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1991.

CRUZ, C.D. *Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística*. Viçosa: Editora UFV, 2001.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. v. 2. Viçosa: Editora UFV, 2003.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. 2. ed. rev. Viçosa: Editora UFV, 2001.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, Rockville, v. 12, p. 13-15, 1990.

FALCONER, D.S. *Introdução à genética quantitativa*. Tradução: SILVA. M. A.; SILVA. J. C. Viçosa: Imprensa Universitária. 1987.

FERREIRA, M.E; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3. ed., Brasília: Embrapa-Cenargen. 1998.

FRANK, T. *et al. Testing snap beans for fiber content*. St. Louis: Keystone Seeds,. 1961.

GONZALES, S.N. Estudios de algunos factores que afectan el cruzamiento artificial em fíjol común *Phaseolus vulgaris* L. de riego. *Agricultura Técnica em México*, México, v. 7, n. 2, p. 83-95, 1981.

MIRANDA, J.E.C. *et al. Análise de trilha e divergência genética de cultivares e clones de batata-doce*. *Rev. Bras. Gen.*, Ribeirão Preto, v. 11, n. 4, p. 881-892, 1988.

RODRIGUES, R. *Análise genética da resistência ao crestamento bacteriano comum e outras características agronômicas em Phaseolus vulgaris L.* 1997. Tese (Doutorado)-Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 1997.

RODRIGUES, R. *et al. Análise dialélica de seis características agronômicas em Phaseolus vulgaris L.* *Bragantia*, Campinas, v. 57, n. 2, p. 241 – 250, 1998.

SING, S.P. *et al. Genetic diversity in cultivated common bean – II: marker based analysis of morphological and agronomic traits*. *Crop Sci.*, Madison, v. 31, p. 23-29, 1991.

Received on December 07, 2004.

Accepted on July 04, 2005.