



RENATO COELHO DE CASTRO VASCONCELLOS

**SELEÇÃO RECORRENTE E EXPRESSÃO DA FAMÍLIA
GÊNICA *P_vPGIP* VISANDO RESISTÊNCIA AO MOFO
BRANCO EM FEJJOEIRO**

**LAVRAS – MG
2017**

RENATO COELHO DE CASTRO VASCONCELLOS

**SELEÇÃO RECORRENTE E EXPRESSÃO DA FAMÍLIA GÊNICA *PvPGIP*
VISANDO RESISTÊNCIA AO MOFO BRANCO EM FEIJOEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador:
Prof. Dr. João Bosco dos Santos

**LAVRAS – MG
2017**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Vasconcellos, Renato Coelho de Castro.

Seleção recorrente e expressão da família
gênica *PvPGIP* visando resistência ao mofo branco em feijoeiro /
Renato Coelho de Castro Vasconcellos. - 2017.

66 p.

Orientador(a): João Bosco dos Santos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. *Sclerotinia sclerotiorum*. 2. qPCR. 3. Progresso Genético. I.
dos Santos, João Bosco. II. Título.

RENATO COELHO DE CASTRO VASCONCELLOS

**SELEÇÃO RECORRENTE E EXPRESSÃO DA FAMÍLIA GÊNICA *PvPGIP*
VISANDO RESISTÊNCIA AO MOFO BRANCO EM FEIJOEIRO**

**RECURRENT SELECTION AND *PvPGIP* FAMILY GENE EXPRESSION FOR
RESISTANCE TO WHITE MOLD IN COMMON BEAN**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2017.

Dr. Welison Andrade Pereira

Dr. Helton Santos Pereira

Dra. Paula Pereira Torga

Dr. Adriano Teodoro Bruzi

Orientador:
Dr. João Bosco dos Santos

**LAVRAS – MG
2017**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, pelo amor incondicional, pela fé e paciência, por todo apoio e incentivo aos meus sonhos. Por nunca medirem esforços para que eu chegasse até aqui.

A Camila, por toda paciência, ajuda e carinho até mesmo estando longe. Por me ajudar a crescer e por apoiar todas as minhas ideias e decisões, por mais malucas que fossem.

Ao meu orientador João Bosco, pela oportunidade e confiança de realizar o doutorado, pelos ensinamentos e orientação.

A todos os amigos que de alguma forma, estiveram presentes na minha vida durante esses anos.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Genética Molecular de Plantas, pelos ótimos momentos vividos e por todas as experiências compartilhadas, em especial a Thaísa, Monik e Juliana, pela ajuda e companheirismo.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas por terem contribuído de alguma forma na minha formação.

Ao Lamartine e Gisele, pela disposição, pelos ensinamentos, amizade e confiança.

A Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de cursar o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.

Aos amigos do GEN pela amizade e convivência, em especial ao Rafael, Dayane, Raoni, Jhonathan e Luiz Paulo.

A Washington State University e ao Dr. Phil Miklas, pela confiança e aprendizado no meu doutorado sanduíche.

Aos amigos Eninka, Alvaro e Madhu. Amigos que fiz no período do doutorado sanduíche e que pretendo levar para o resto da vida.

À CAPES e CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

A todos aqueles, que de alguma forma, estiveram presentes e contribuíram para que tudo isso se concretizasse.

MUITO OBRIGADO

RESUMO GERAL

O mofo branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, é uma doença de grande impacto sobre a cultura do feijoeiro, pois limita o potencial de produção e reduz a qualidade das sementes e vagens. Os mecanismos de resistência das plantas são devidos a resistência fisiológica e a mecanismos de escape, que incluem a morfologia, arquitetura ereta, porosidade do dossel e precocidade da planta. Os objetivos deste trabalho foram obter progênies de feijoeiro com maiores níveis de resistência fisiológica ao mofo branco, grãos do tipo carioca e porte ereto, por meio da seleção recorrente; verificar a eficiência na seleção destes caracteres; e validar a expressão de genes da família *PvPGIP* para a resistência ao mofo branco. Na seleção recorrente a recombinação foi realizada pelo esquema dialélico parcial ou cônico, a seleção foi massal em S_0 e as progênies foram avaliadas e selecionadas até às gerações $S_{0:3}$ (ciclo X) e $S_{0:2}$ (ciclo XI), juntamente com as mais resistentes do ciclo IX para se estimar o ganho com a seleção. Os caracteres avaliados foram resistência ao mofo branco pelo método do *Straw test*, porte e tipo de grãos. A seleção recorrente possibilitou ganho na resistência ao mofo branco de aproximadamente 6% por ciclo de seleção e foi eficiente para obtenção de progênies com alto nível de resistência ao mofo branco, grãos do tipo carioca e porte ereto adaptadas às condições de cultivo do Sul de Minas Gerais. Para a análise de expressão dos quatro genes da família *PvPGIP* foram avaliados 4 linhagens de feijão, sendo 2 linhagens do programa de seleção recorrente para mofo branco (50/5 e 84/6), 1 linhagem resistente e não adaptada às condições brasileiras (Cornell 605) e uma linhagem suscetível (Corujinha). Foram utilizados dois isolados de mofo branco, sendo a expressão destes genes avaliada em 0, 1, 2, 3 e 5 dias após a inoculação. Plantas inoculadas com o isolado menos agressivo (UFLA 03) não apresentaram diferença significativa da expressão relativa de nenhum dos genes analisados, sendo considerado pouco eficiente na discriminação dos genótipos. Já com o isolado mais agressivo (UFLA 116) todos os genes da família foram diferencialmente expressos, mostrando relação com a resistência ao mofo branco e apresentaram um incremento até o terceiro dia após a inoculação. As duas progênies selecionadas apresentaram nível de resistência semelhante à Cornell 605. Portanto, a incorporação desses genes pode contribuir para melhorar ainda mais os níveis de resistência das linhagens derivadas da seleção recorrente e podem ser utilizados para o desenvolvimento de marcadores moleculares visando a seleção assistida para resistência do feijoeiro ao mofo branco.

Palavras-chave: *Sclerotinia sclerotiorum*. qPCR. Progresso Genético. *Phaseolus vulgaris*.

GENERAL ABSTRACT

The white mold, caused by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, is a disease with a great impact on the common bean crop, because it limits the production potential and reduces the quality of the seeds and pods. Plant resistance mechanisms are due to physiological resistance and escape mechanisms, which include morphology, upright architecture, canopy porosity and plant precocity. The objectives of this work were to obtain bean progenies with higher levels of physiological resistance to white mold, carioca grain type and upright habit, through recurrent selection; verify the efficiency in the selection of these characters and validate the gene expression of the *PvPGIP* family for white mold resistance. In the recurrent selection the recombination was performed by the partial or conical diallel scheme, the massal selection was in S_0 and the progenies were evaluated and selected until the generations $S_{0:3}$ (cycle X) and $S_{0:2}$ (cycle XI), together with the most resistant of the IX cycle to estimate the gain with selection. The evaluated characters were resistance to white mold by the straw test method, plant habit and grain type. Recurrent selection allowed gains in the resistance to white mold of approximately 6% per cycle and was efficient to obtain progenies with high resistance to white mold, grains of the carioca type and upright habit, adapted to the conditions of South of Minas Gerais. For the expression analysis of the *PvPGIP* gene family, 4 lines of common bean were evaluated, 2 lines from the recurrent selection program for white mold (50/5 and 84/6), 1 resistant line not adapted to the Brazilian conditions (Cornell 605) and a susceptible line (Corujinha). Two white mold isolates were used and the expression of these genes being evaluated at 0, 1, 2, 3 and 5 days after inoculation. The less aggressive isolate (UFLA 03) did not present significant difference in the relative expression of any of the analyzed genes, being considered inefficient in discriminating the genotypes. With the most aggressive isolate (UFLA 116) all the genes of the family were differentially expressed, they are related to resistance to white mold and showed an increase up to the third day after inoculation. The two progenies selected presented resistance level similar to the Cornell 605. Therefore, the incorporation of these genes can contribute to further improve the resistance levels of the lines derived from recurrent selection and can be used for the development of molecular markers aiming the assisted selection for common bean resistance to white mold.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*. qPCR. Genetic Progress. *Phaseolus vulgaris*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	8
2 REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1 A cultura do feijão.....	10
2.2 Mofo Branco	10
2.3 Avaliação da resistência ao mofo branco	12
2.4 Seleção recorrente	13
2.5 Outros caracteres de relevância para a seleção no melhoramento do feijoeiro.....	15
2.6 Família gênica <i>PGIP</i>	17
2.7 qPCR	18
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
CAPÍTULO 1	26
SELEÇÃO RECORRENTE VISANDO RESISTÊNCIA AO MOFO BRANCO EM FEIJOEIRO	26
1 INTRODUÇÃO	29
2 MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1 Local	30
2.2 Obtenção da população base	30
2.3 Avaliação das progênies segregantes	32
2.4 Preparo do inóculo e avaliação da resistência ao mofo branco.....	33
2.5 Avaliação do porte e tipo de grãos.....	34
2.6 Análise genético-estatística das progênies segregantes	35
2.7 Estimativa dos parâmetros genéticos e fenotípicos	36
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.1 Avaliação sequencial do ciclo X	37
3.2 Avaliação do ciclo XI.....	39
3.3 Avaliação das melhores progênies dos ciclos IX, X e XI.....	41
4 CONCLUSÕES	45
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
6 APÊNDICE	48
CAPÍTULO 2	49

EXPRESSION AND VALIDATION OF <i>PVPGIP</i> GENES FOR RESISTANCE TO WHITE MOLD (<i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i>) IN COMMON BEANS (<i>PHASEOLUS VULGARIS</i> L.)	49
1 INTRODUCTION	51
2 MATERIAL AND METHODS	53
3 RESULTS	55
4 DISCUSSION	61
5 REFERENCES	63

1 INTRODUÇÃO GERAL

A cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é altamente influenciada pela ação de organismos fitopatogênicos que podem causar perdas consideráveis na produtividade e consequente inviabilização da cultura em determinadas regiões e períodos do ano. Entre as doenças que mais tem limitado a obtenção de alta produtividade, destaca-se o mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary).

O uso integrado de estratégias para conter o avanço do mofo branco no cultivo do feijão deve contar com a combinação de diversas técnicas, como o uso de fungicidas, baixa densidade populacional de plantas, redução no uso de irrigação e fertilizantes e o uso de cultivares com arquitetura mais ereta e dossel mais aberto. Estas medidas embora úteis no controle da doença, podem causar diminuição na produtividade. Assim, o uso de cultivares com resistência parcial ao fungo deve contribuir para maior redução nos custos de produção (SCHWARTZ; SINGH, 2013).

Plantas com maiores níveis de resistência podem apresentar diversos mecanismos que as permitam se defender das agressões deste inimigo natural. Dentre estes mecanismos estão a resistência fisiológica e os mecanismos de escape. A resistência fisiológica é determinada pela capacidade da planta de se defender impedindo, restringindo ou retardando a penetração do patógeno em seus tecidos e diminuindo os danos potenciais. Já os mecanismos de escape são determinados por características morfológicas da planta que propiciam ambiente desfavorável para proliferação do patógeno, como arquitetura ereta das plantas, dossel aberto e maturidade precoce (KOLKMAN; KELLY, 2003).

Como a resistência ao mofo branco é de herança complexa e altamente influenciada pelo ambiente, e altos níveis são encontrados apenas em fontes não adaptadas, a transferência de alelos favoráveis relacionados a esta característica para cultivares adaptadas é indispensável. A forma mais eficiente de aumentar a frequência de alelos/QTL favoráveis provenientes de diferentes genitores é a seleção recorrente (RAMALHO et al., 2012).

A seleção recorrente permite utilizar vários parentais resistentes ao mofo branco em sucessivos ciclos de inter cruzamento, seleção e avaliação. Ela permite melhorar um ou mais caracteres ao mesmo tempo, especialmente quando alelos/QTL dos diferentes caracteres forem encontrados em diferentes genitores, uma vez que o processo é cíclico e dinâmico (GERALDI, 2005). A associação da resistência fisiológica a mecanismos de escape, como o porte ereto, permite maior resistência das plantas ao patógeno (ENDER; KELLY, 2005) e a seleção

recorrente permite essa associação, se nos genitores a serem cruzados existirem alelos favoráveis para ambos os caracteres. Assim, pode-se ainda realizar o melhoramento simultâneo para outros caracteres de importância agrônômica como o tipo de grão.

Sabe-se que a resistência do feijoeiro ao mofo branco é quantitativa e já foram identificados mais de 36 QTLs relacionados a características que influenciam a resistência a este patógeno (MIKLAS et al., 2013). Os numerosos QTLs, amplamente distribuídos ao longo do genoma, comprovam a complexidade da resistência ao mofo branco em feijoeiro comum. Melhoristas e geneticistas estão tentando identificar QTLs de efeito maior para serem usados na seleção assistida por marcadores e discriminar aqueles relacionados à resistência fisiológica dos relacionados a mecanismos de escape da planta.

É amplamente aceito que os patógenos produzem substâncias ativas durante a infecção, entre estas estão as endopoligalacturonases (PGs), que são as primeiras enzimas a serem liberadas durante a infecção e são responsáveis pela degradação da parede celular (KALUNKE et al., 2011). As plantas hospedeiras produzem proteínas inibidoras da poligalacturonases (*PGIP*) que reconhecem enzimas PGs liberadas pelos patógenos durante a infecção impedindo a ação enzimática durante a invasão e liberação de nutrientes necessários para o crescimento do patógeno (D'OVIDIO et al., 2004). Estudar a interação desses genes (PGs vs *PGIPs*) e suas expressões diferenciais durante a defesa dos genótipos resistentes, comparado com os genótipos suscetíveis quando inoculados com isolados que diferem em níveis de agressividade, permitirá entender as bases fisiológicas e moleculares dos mecanismos de defesa, bem como identificar genes candidatos para mapeamento de QTL que poderão ser usados no melhoramento assistido por marcadores moleculares.

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram: selecionar progênies com maiores níveis de resistência ao mofo branco, com grãos do tipo carioca e porte ereto, utilizando a seleção recorrente; Verificar se a seleção recorrente foi eficiente na obtenção de progênies com alto nível de resistência ao mofo branco; determinar a variação na expressão da família gênica *PvPGIP* de diferentes genótipos (origem andina e mesoamericana) e a sua relação com a resistência ao mofo branco; verificar o nível de expressão dos genes *PvPGIP* em diferentes tempos após a inoculação; e verificar se há diferença na expressão dos genes *PvPGIP* induzidos por dois isolados de mofo branco com diferentes níveis de agressividades.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do feijão

O feijão, *Phaseolus vulgaris*, é o membro mais cultivado do gênero *Phaseolus*, sendo uma espécie diplóide ($2n = 22$), com uma taxa muito baixa de cruzamento já que a autofecundação ocorre antes da abertura do botão floral (cleistogamia) (WATTS, 1980).

Esta espécie é uma das leguminosas mais amplamente cultivadas no mundo e é a leguminosa mais consumida nas Américas. O feijão é uma boa fonte de proteína, cálcio, ferro e tiamina. Estas propriedades fazem dele uma importante fonte alimentar, especialmente nos países em desenvolvimento onde os habitantes têm pouco acesso à proteína animal. Essa leguminosa possui em média 20-30 % do seu peso em forma de proteína e 60-65% em carboidratos. O principal componente protéico do feijão é a faseolina, enquanto que o principal carboidrato desta leguminosa é o amido (NWOKOLO, 1996).

O Brasil é um dos maiores produtores desta leguminosa no mundo, com produção que corresponde a 12,41% da produção mundial (FAO, 2014). Cultivado em todo o território brasileiro, o feijão possui como principais estados produtores Paraná, Minas Gerais, Goiás e Santa Catarina. Considerando as três safras do ano agrícola 2015/16, espera-se que a área total de feijão poderá chegar a 2.837,4 mil hectares, retração de 6,2% em relação à safra passada e que a produção nacional de feijão deverá ficar em 2.515,8 mil toneladas, 21,6% menor que a produção do último ano agrícola (CONAB, 2016).

2.2 Mofo Branco

O mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, também conhecido por murcha-de-esclerotínia ou podridão aquosa, tem despertado grande interesse na área agrícola, pois é o responsável pela ocorrência de significativas perdas em colheitas de vários países (SILVA; BOLTON; NELSON, 2009). Em condições favoráveis, o mofo branco pode causar perdas de até 100% na produção de feijão em cultivares suscetíveis ao fungo. Esta doença está dispersa nos países de América do Sul e do norte, principalmente nos Estados Unidos, Canadá, Argentina e Brasil (SCHWARTZ; SINGH, 2013).

O mofo branco é uma das doenças mais destrutiva nas áreas irrigadas do Brasil, principalmente nos plantios realizados nas safras de outono-inverno-primavera (PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIM, 2006). Este fungo pertence à família Sclerotiniaceae, a qual inclui

espécies que produzem ascos de cor marrom, apotécios que surgem a partir de um estroma e escleródios associados a uma planta hospedeira (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). O fungo *S. sclerotiorum* apresenta ampla gama de hospedeiros, que compreendem plantas de 75 famílias, 278 gêneros e 408 espécies. Entre eles, destacam-se soja, girassol, canola, ervilha, feijão, alfafa, fumo, tomate e batata (BOLAND; HALL, 1994).

S. sclerotiorum é um patógeno necrotrófico que infecta, geralmente, na região da junção do pecíolo com a haste, aproximadamente 10 a 15 cm acima da linha do solo, onde flores, pétalas e folhas desprendidas, geralmente, ficam retidas (OLIVEIRA, 2005). O fungo usualmente causa lesões aquosas que se expandem rapidamente nos tecidos do hospedeiro. O patógeno causa necrose foliar invadindo os pecíolos e posteriormente a haste da planta. As hastes desenvolvem uma lesão escura e úmida e posteriormente pode ocorrer formação de aglomerados de hifas com aspecto cotonoso que é um dos sinais mais característicos da infecção pelo fungo (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

Seus danos manifestam-se com maior severidade em áreas com temperaturas amenas, associado à alta umidade relativa do ar. Porém, para que o fungo possa se desenvolver e provocar uma epidemia torna-se necessária que a umidade adequada do solo seja mantida por certo período de tempo, variando em função do local e do tipo de solo (NAPOLEÃO et al., 2005). A ocorrência de epidemias de mofo branco é agravada devido às estruturas de resistência formadas por esse patógeno, os escleródios, que permanecem viáveis por vários anos no solo mesmo em ambientes desfavoráveis (OLIVEIRA, 2005).

Depois de instalada no hospedeiro, a infecção pode se espalhar para plantas adjacentes por meio do contato planta a planta (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). Porém, o auge da disseminação é após o florescimento, quando as flores caem, pois estas são uma importante fonte primária de energia, servindo de alimento para o fungo iniciar a infecção (OLIVEIRA; CRISTOFANI; MACHADO, 2005). A redução da doença a níveis aceitáveis pode ser realizada através de medidas como: uso de sementes livres do patógeno; evitar o tráfego de pessoas e equipamentos provenientes de áreas infestadas; rotação de cultura com gramíneas; plantio direto; eliminação de resíduos culturais infectados; solarização do solo quando possível para diminuir a viabilidade dos escleródios; controle da água de irrigação, evitando o encharcamento; uso de fertilizantes nitrogenados com moderação; redução da densidade de semeadura; e aplicação foliar de fungicidas (VIEIRA et al. 2005).

O controle químico em geral é pouco eficaz, no entanto, a densidade de inóculo no solo determina a sua eficiência na redução da doença (PAULA JUNIOR; ZAMBOLIM, 2006). Embora essas práticas culturais reduzam a severidade da doença, pode-se contribuir para um

menor rendimento quando a doença não estiver presente em alto nível de agressividade (SOULE et al. 2011). Além dos mecanismos de controle citados, a obtenção de cultivares com resistência é de grande importância para o controle integrado da doença no Brasil, especialmente considerando que as cultivares brasileiras possuem baixos níveis de resistência a esse fitopatógeno e que esta estratégia fornece resultados mais duradouros.

S. sclerotiorum é capaz de produzir quantidades muito baixas (milimolares) de oxalato em tecidos vegetais infectados (FERRAR; WALKER, 1993). Este oxalato serve como fator de virulência importante para o *S. sclerotiorum*, já que mutantes deste fungo são incapazes de produzir oxalato e são menos virulentos que os tipos selvagens (GODOY et al., 1990). A excreção de ácido oxálico leva à acidificação do tecido infectado (DUTTON; EVANS, 1996), provocando murchamento foliar através da desregulação das células-guarda e interferindo com a função normal dos estômatos (GUIMARÃES; STOTZ, 2004). Além da produção de ácido oxálico, *S. sclerotiorum* altera o pH da planta hospedeira e excreta enzimas patogênicas tais como, endo e exopectinases, celulasas, hemicelulasas, glicosidasas, xilanases e proteases, facilitando a colonização das células do hospedeiro devido à degradação de parede celulares (CALLAHAN; ROWE, 1991).

Existe atualmente pouca diversidade genética para a resistência ao mofo branco no *pool* genético de *P. vulgaris* e o controle genético para esse caráter tem se mostrado como complexo ou quantitativo com herdabilidade de magnitude baixa a moderada (KELLY et al., 2003; MIKLAS et al., 2001; PARK et al., 2001; ANTONIO et al., 2009; LEITE, 2016; SOULE et al., 2011). A resistência genética do hospedeiro está restrita a algumas cultivares de feijão branco de origem mesoamericana e feijões de origem andina (ANTONIO et al., 2009), as quais, embora com potencial de uso nos programas de melhoramento, não apresentam possibilidades de utilização direta pelos produtores. Algumas linhagens e cultivares adaptadas às condições do Centro-Oeste e Sudeste do Brasil também possuem resistência parcial (SANTOS, 2010).

2.3 Avaliação da resistência ao mofo branco

Uma vez que existem apenas níveis parciais de resistência ao mofo branco em feijão bem como a presença de múltiplos mecanismos fisiológicos e morfológicos para esta resistência, há grande dificuldade de se fazer fenotipagem que seja confiável e barata.

As metodologias de avaliação da patogenicidade do mofo branco, podem ser classificadas em abordagens diretas ou indiretas. Existem várias metodologias de avaliação por meio da inoculação artificial do patógeno, sendo que na maioria desses testes, utiliza-se o

micélio nas avaliações, o que acaba influenciando os resultados devido à variabilidade dos isolados e sensibilidade do patógeno a altas temperaturas e baixa humidade. Quando se escolhe utilizar micélio, é de grande importância avaliar se há variação na agressividade do isolado, optando-se pelo mais agressivo, para assegurar uma correta avaliação do nível de resistência dos genótipos. Assim, problemas relacionados à avaliação e ao melhoramento para resistência a doenças podem ser, em parte, devidos a desconsideração da variabilidade na agressividade do patógeno (SOUZA, 2009).

Entre os métodos que utilizam micélio nas avaliações, destaca-se o *straw test* ou teste do canudo. Este método é eficiente para auxiliar na identificação, caracterização e seleção de genótipos resistentes ao mofo branco, sendo o mais utilizado em programas de melhoramento (SINGH; TÉRAN, 2008). Possui como vantagem, o fato de ser um método não destrutivo, que facilita o avanço de programas de melhoramento para a obtenção de progênies resistentes. Este método é considerado mais eficiente pois, é inoculado o próprio micélio no ápice do caule com um canudo ou ponteira plástica de micropipeta e se avalia o progresso da doença na planta (PETZOLDT; DICKSON, 1996; SINGH; TERÁN, 2009; SCHWARTZ; SINGH, 2013).

Já entre os métodos indiretos, a reação ao ácido oxálico é o mais utilizado e existem evidências experimentais mostrando, tanto em testes de laboratório, quando confrontado com reações de cultivares ao patógeno no campo, em vários ambientes, que os genótipos que absorvem o ácido mais lentamente são os mais resistentes (KOLKMAN; KELLY, 2000; KOLKMAN; KELLY, 2003).

2.4 Seleção recorrente

A escolha do método de melhoramento adequado é de fundamental importância para o sucesso do programa de melhoramento, principalmente quando o caráter alvo da seleção é considerado como quantitativo e de baixa herdabilidade (MELO; SANTOS; FERREIRA, 2004). A identificação de um indivíduo que contemple todos os alelos favoráveis em apenas um ciclo de seleção pode ser considerada uma tarefa quase impossível de ser realizada, exigindo a avaliação de um número enorme de progênies, o que inviabilizaria a realização da seleção. Deste modo, a melhor alternativa de reunir ao maior número de alelos favoráveis em uma linhagem é por meio de sucessivos ciclos de seleção e recombinação das melhores famílias (RAMALHO et al., 2012).

A seleção recorrente é um processo cíclico de seleção de indivíduos ou progênies superiores de uma população, seguida pela recombinação dos(as) selecionados(as) para formar

uma nova população (RAMALHO et al., 2012). Esse método foi originalmente proposto na década de 1940, nos programas de melhoramento de milho. Posteriormente, foi adotado para culturas autógamas. Desde então, houve uma aceitação progressiva do método no melhoramento de plantas autógamas e tem sido utilizado com sucesso no melhoramento de diversas culturas, como por exemplo o arroz (CORDEIRO; RANGEL, 2011), trigo (JIANG et al., 2010) e feijão (LEITE et al., 2016; LIMA et al., 2013; MENEZES JÚNIOR; RAMALHO; ABREU, 2008; REZENDE et al., 2014; SILVA et al., 2015; PIRES et al., 2014, SOUZA et al., 2014; TERÁN; SINGH, 2010).

A seleção recorrente é realizada em três etapas básicas: obtenção da população base, avaliação e recombinação das progênes selecionadas para formar o próximo ciclo. O que se deseja obter da população base é uma grande variabilidade (que os genitores se complementem) e que possuam uma média alta para a(s) característica(s). Se o número de genitores for grande, a probabilidade de encontrar todos os genitores com boa expressão do caráter é baixa. Além disso, mesmo que isso fosse viável, a contribuição dos alelos de cada parental seria tão pequena, que a maioria seria perdida após os primeiros ciclos seletivos. Por outro lado, se o número de genitores for muito pequeno, a probabilidade de se associar a maioria dos alelos favoráveis para a característica, em um único indivíduo ou progênie, é também baixa. Para plantas autógamas, é aconselhável utilizar entre 10 e 20 genitores para a formação da população base (VIEIRA et al., 2005).

Geraldi (1997) cita como principais vantagens da seleção recorrente a obtenção de maior variabilidade genética pelo intercruzamento de múltiplos genitores, maior oportunidade de recombinação genética, devido aos sucessivos ciclos de cruzamentos, maior eficiência no acúmulo de alelos favoráveis, devido ao processo repetitivo de seleção e viabilidade de incorporação de germoplasma exótico na população. O método ainda permite a obtenção de linhagens superiores a cada ciclo seletivo e a inclusão de novas linhagens no processo de recombinação. Deve-se considerar também que os ciclos sucessivos de seleção recorrente com cruzamentos repetitivos possibilitam a quebra de ligação entre blocos gênicos o que permite separar alelos responsáveis por características desejáveis daqueles indesejáveis (BERNARDO, 2010).

Utilizando-se hibridações manuais podem-se realizar cruzamentos múltiplos e direcionados, como os dialelos com os genitores combinados 2 a 2. Um procedimento de intercruzamento foi proposto por Bearzoti (1997) e descrito por Ramalho, Abreu e Santos (2001), sendo nomeado de dialelo circulante. Nesse caso sempre um dos pais é cruzado com dois outros. As populações híbridas são obtidas e as melhores são identificadas e recombinadas

para se obter o ciclo seguinte, sempre priorizando genitores não comuns. Este processo é repetido até que todos os genitores sejam representados em cada população e cada genitor contribuirá igualmente com o número de alelos.

Na seleção recorrente a seleção pode ser realizada no âmbito de indivíduo, denominada de seleção fenotípica ou massal, e seleção no âmbito de progênes, onde se utiliza a população estruturada em progênes, S_1 , S_2 , etc. (RAMALHO; SANTOS; ZIMMERMANN, 1993). A seleção baseada na avaliação de progênes permite que as avaliações sejam feitas em experimentos com repetições e em locais diferentes. Este tipo de avaliação é preferida, já que se pode estimar com maior precisão os valores genotípicos, pois os efeitos ambientais, residuais e das interações genótipos x ambientes são reduzidas (ALVES, 2012).

A estimativa periódica do progresso genético com a seleção recorrente é importante para se avaliar as estratégias de condução do programa e propor alterações, se necessário. Para isso, uma alternativa é guardar as sementes das progênes $S_{0:1}$ e/ou $S_{0:2}$ de cada ciclo seletivo e posteriormente realizar um experimento para avaliação conjunta. Isto só é viável se o número de ciclos e, principalmente, se o número de progênes a serem avaliados não forem muito grandes. Outra opção é utilizar os dados das avaliações das progênes $S_{0:1}$ e/ou $S_{0:2}$, ao longo do tempo. Para se proceder a avaliação do progresso, entretanto, é necessário a utilização de testemunhas comuns nas diferentes avaliações para que se possa realizar uma análise de variância combinada.

2.5 Outros caracteres de relevância para a seleção no melhoramento do feijoeiro

Além da resistência ao mofo branco, o porte das plantas bem como a qualidade e tipo de grãos devem ser levados em consideração para o melhoramento do feijoeiro.

A obtenção de plantas de porte ereto e que também sejam tolerantes ao acamamento tem sido um dos objetivos de vários programas de melhoramento por facilitar a colheita e tratos culturais, reduzir as perdas caso ocorram chuvas durante a colheita e também reduzir os danos causados por doenças, por permitir que o ar circule entre as plantas, promovendo uma condição menos favoráveis aos patógenos, em especial o mofo branco e promovendo uma maior qualidade dos grãos (MENDES; RAMALHO; ABREU, 2009; MENEZES JÚNIOR; RAMALHO; ABREU, 2008; SILVA; ABREU; RAMALHO, 2007).

Dentro do conceito de porte da planta estão envolvidos vários caracteres, tais como: o hábito de crescimento, comprimento de internódios, número de ramificações laterais e sua

orientação, entre outros. Todos esses caracteres em conjunto estabelecem o que se denomina de porte ou arquitetura da planta (COLLICCHIO; RAMALHO; ABREU, 1997).

O hábito de crescimento é um caráter morfoagronômico que é definido, dentre outras características, pelo crescimento do caule, determinado e indeterminado, e o hábito de florescimento da planta (SANTOS et al. 2015). Nas plantas de hábito de crescimento determinado, o florescimento ocorre de cima para baixo e o crescimento cessa após o aparecimento das primeiras flores. Nas plantas de hábito indeterminado, o florescimento inicia-se na parte inferior da planta e essa continua a crescer após o florescimento (TEIXEIRA; RAMALHO; ABREU, 1999).

O porte do feijoeiro é um caráter de difícil seleção, principalmente em condições de alta umidade e temperatura e com alto teor de matéria orgânica no solo, pois nestas condições, a planta tende a vegetar mais, tornando-se facilmente prostradas (MENEZES JÚNIOR; RAMALHO; ABREU, 2008), com isso, deve-se tomar cuidado com a época de avaliação das linhagens, uma vez que a safra de avaliação pode interferir nos resultados obtidos.

Já o tipo de grãos do feijoeiro tem sido um dos principais requisitos em um programa de melhoramento, pois é um dos grandes limitantes na recomendação de novas cultivares, sendo o mercado consumidor exigente quanto aos padrões comerciais.

Os grãos mais consumidos no Brasil são do tipo carioca, que correspondem a aproximadamente 70% do feijão consumido no país (PEREIRA et al., 2012), possuindo tegumento de cor creme com rajadas marrons claras e peso de 100 grãos variando de 23 a 25 g (RAMALHO; ABREU, 2006). Outros caracteres relacionados ao grão, tais como tamanho, forma, brilho e presença de halo também afetam a aceitação da cultivar. Portanto, o desafio é desenvolver cultivares com boas características de interesse agrônomo, porém associados à qualidade visual e nutricional dos grãos.

O maior problema para obter grãos dentro do padrão comercial carioca é o grande número de genes envolvidos. Há genes responsáveis pela tonalidade da cor creme, da presença das rajadas e sua tonalidade, cor do halo e presença ou não de brilho. Só em relação à cor já foram identificados 18 genes. Esse fato evidencia a dificuldade de se obter linhagens com grãos cuja cor atenda aos anseios dos consumidores.

Este caráter é também muito influenciado pelo ambiente e pelas condições de manejo na colheita e pós-colheita. Após algum tempo de armazenamento a cor creme escurece, portanto, grãos que apresentam uma cor mais escura do tegumento são confundidos com grãos velhos pelos consumidores e são dificilmente aceitos.

Em geral, a seleção para a qualidade de grãos é praticada geralmente nas fases iniciais dos programas de melhoramento, eliminando-se os tipos de grãos indesejáveis e reduzindo o excesso de genótipos a serem avaliados em gerações futuras.

2.6 Família gênica *PGIP*

A superfamília *PGIP* (Polygalacturonase-Inhibiting Protein) pertence a um grupo de proteínas exoplasmáticas ricas em sequências repetitivas de leucina (LRRs) (JONES; JONES, 1997), e a sua importância contra patógenos foi demonstrada para fungos e bactérias (DE LORENZO; FERRARI, 2002; OESER et al., 2002). Além do seu papel na defesa do organismo, as *PGIPs* também atuam no florescimento de plantas e sua regulação se dá de tal forma a serem mais expressas em resposta a situações específicas, tais como estresse, ferimentos e ataques de fungos e insetos (DE LORENZO et al., 2001, LI et al., 2003, NDIMBA et al., 2003).

A superexpressão dos genes *PGIPs* em plantas transgênicas tais como trigo, tomate, tabaco e *Arabidopsis thaliana* limita a colonização fúngica (JANNI et al., 2008, POWELL et al., 2000, FERRARI et al., 2003, MANFREDINI et al., 2005), expondo o potencial de defesa dessas proteínas. Em *Arabidopsis*, foi demonstrado que essa superexpressão pode ocorrer por diversas vias de transdução e a interação molecular entre *PGIPs* e PGs (endopoligalacturonases), produzidos pelo fungo e principal responsável pela patogenicidade, se dá por meio do domínio LRR (FERRARI et al., 2003).

O domínio LRR é uma estrutura versátil, responsável por muitas interações proteína-proteína, e está envolvido em diversas funções celulares (BUCHANAN; GAY, 1996). Em feijão, há a formação de duas estruturas no formato de folhas beta-pregueadas os quais contém resíduos cruciais para o reconhecimento dos PGs (DI MATTEO et al. 2003). O domínio LRR está sempre relacionado com o reconhecimento, principalmente ligado a fatores de resistência (D'OVIDIO et. al., 2006) e a sua diversidade é que determina a especificidade do reconhecimento do patógeno. Logo, o mecanismo e o gene expresso para a inibição varia de acordo com a espécie infectada e com o patógeno, como mostram diversos trabalhos (FERRARI et al. 2003, HEGEDUS et. al., 2008, D'OVIDIO et. al., 2004, KALUNKE et al., 2011, POWELL et al., 2000, FERRARI et al., 2003, MANFREDINI et al., 2005, OLIVEIRA et al., 2010).

Devido a bibliotecas genômicas de alta qualidade e o progresso de ferramentas de análise, foi possível caracterizar a família *PGIP* em diversas espécies (HEGEDUS et al., 2008, FERRARI et al., 2003, OLIVEIRA et al., 2010). Em *P. vulgaris*, há pelo menos quatro genes

já identificados que codificam para o domínio dos genes *PGIPs*, medindo aproximadamente 1kpb cada (OLIVEIRA et al., 2010). Estes genes são subdivididos em dois grupos, *PvPGIP1 - PvPGIP2* e *PvPGIP3 – PvPGIP4*, e provavelmente cada grupo foi originado a partir de eventos de duplicação independente (D’OVIDIO et al., 2004; KALUNKE et al., 2011). *PvPGIP1* é transcrito somente quando há alguma injúria na planta, enquanto *PvPGIP3* é expresso sob injúria, ácido salicílico e oligogalacturonídeos que não são glucanos. *PvPGIP4* não é alterado por nenhum dos fatores citados acima. Por fim, *PvPGIP2*, o mais importante, codifica o inibidor de PGs de fungos mais eficiente e é ativado por todos esses fatores acima (D’OVIDIO et al., 2004). Além da regulação, os quatro genes também se diferenciam quanto à sua especificidade bioquímica do substrato (OLIVEIRA, 2011). Estudos mostram que cada um dos genes da família responde de uma forma única aos estímulos externos (D’OVIDIO et al., 2004).

2.7 qPCR

A quantificação da expressão gênica é uma análise crescente em várias áreas no campo da biologia. A avaliação dos padrões da expressão de genes chave para determinados processos fisiológicos é extremamente importante para a compreensão deste processo em si e na caracterização de genes relevantes com a mesma função biológica em espécies pouco estudadas (VANDESOMPELE et al., 2002). Várias técnicas foram desenvolvidas a fim de estudar estes padrões, destacando a RT-qPCR (Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction), um método amplamente utilizado para análise da expressão de genes devido a sua sensibilidade, rapidez, reprodutibilidade e alta precisão na quantificação (PFAFFL, 2004).

No entanto, para a acurácia e reprodutibilidade na quantificação da expressão de genes alvo, alguns fatores devem ser observados, como a quantidade e qualidade de material inicial, o desenho de primers, a extração de RNA, degradação do DNA genômico e a eficiência da reação da transcriptase reversa para a síntese de cDNA (ALMEIDA et al., 2010). Devido a esses fatores é fundamental a normalização dos dados obtidos, através da utilização de genes com expressão constante e estável em diferentes condições, tecidos e genótipos, para a aquisição de resultados confiáveis. Caso a normalização seja realizada por meio de genes não validados ou instáveis, isso implicará em um impacto significativo na quantificação da expressão gênica podendo levar a conclusões errôneas (GUENIN et al., 2009; GUTIERREZ et al., 2008; HUGGETT et al., 2005).

A técnica de qPCR (também conhecida como PCR em tempo real) permite a detecção, ciclo a ciclo, com elevada sensibilidade e especificidade da intensidade de fluorescência emitida

em decorrência da amplificação de cDNA, possibilitando a análise comparativa da expressão do gene entre as amostras logo no início da fase exponencial de amplificação, em que ainda não há uma saturação dos reagentes.

3 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. R., et al. Reference gene selection for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction normalization during in vitro adventitious rooting in *Eucalyptus globulus* Labill. **BMC molecular biology**, Porto Alegre v.11, n.1, p.1-12. 2010.
- ALVES, A. F. **Dois ciclos de seleção recorrente no melhoramento de feijão carioca**. 2012. 61 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa –MG, 2012.
- ANTONIO, R. P., et al. Genetic control of the resistance of common beans to white mold using the reaction to oxalic acid. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 733-740, 2009.
- ARAÚJO, L. C. A.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B. Estimates of genetic parameters of late seed-coat darkening of carioca type dry beans. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 2, p. 156-162, 2012.
- BEARZOTI, E. **Simulação de seleção recorrente assistida por marcadores moleculares em espécies autógamas**. 1997. 230 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. 2nd ed. Minnesota: Stemma, 2010.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 16, n. 2, p. 93-108, June 1994.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.
- BUCHANAN, S. G. S.; GAY, N. J. Structural and functional diversity in the leucine-rich repeat family of proteins. **Prog. Biophys. Mol. Biol.**, v. 65, p. 1–44, 1996.
- CALLAHAN, F. E., ROWE, D. E. Use of a Host-Pathogen Interaction System to test Whether Oxalic Acid is the sole Pathogenic Determinant in the Exudate of *Sclerotinia trifoliorum*. **Phytopath.** v. 81(12), p. 1546-1550, 1991.
- COLLICCHIO, E.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B. Associação entre o porte da planta do feijoeiro e o tamanho dos grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 297-304, mar. 1997.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira GRÃOS**, v. 3 – Safra 2015/16, n. 12 – Décimo Segundo Levantamento, set. 2016. Disponível em:
http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_09_09_15_18_32_boletim_12_sete_mbro.pdf

CORDEIRO, A. C. C.; RANGEL, P. H. N. Avaliação de populações de arroz irrigado conduzidas por seleção recorrente em várzea de Roraima. **Revista Agro@mbiente On-line**. Boa Vista, v. 5, n. 3, p. 182-187, set./dez. 2011.

D’OVIDIO, R.; CAPODICASA, C.; DEVOTO, A.; et al. Characterization of the complex locus of bean encoding polygalacturonase-inhibiting proteins reveals subfunctionalization for defense against fungi and insects. **Plant Physiol.** v. 135, p. 2424-2435, 2004.

D’OVIDIO, R., et al. The characterization of the soybean polygalacturonase-inhibiting proteins (*PGIP*) gene family reveals that a single member is responsible for the activity detected in soybean tissues. **Planta.** v. 224: 633-645, 2006.

DE LORENZO, G.; D’OVIDIO, R.; CERVONE, F. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (*PGIPs*) in defense against pathogenic fungi. **Annu Rev Phytopathol**, v. 39, p. 313–335, 2001.

DE LORENZO, G.; FERRARI, S. Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. **Curr Opin Plant Biol**, v. 5, p. 295–299, 2002.

DI MATTEO, A., et al. The crystal structure of polygalacturonase-inhibiting protein (*PGIP*), a leucine-rich repeat protein involved in plant defense. **Proc Natl Acad Sci**, v. 100, p. 10124–10128, 2003.

DUTTON, M. V., EVANS, C. S. Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. **Can. J. Microbiol**, v. 42, p. 881–895, 1996.

ENDER, M., KELLY, J. D. Identification of QTL associated with white mold resistance in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 6, p. 2482-2489, Nov. 2005.

FAO. Food and Agriculture Organization. **FAOSTAT**. Disponível em:
<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

FERRAR, P. H., WALKER, J. L. R. o-Diphenol oxidase inhibition an additional role for oxalic acid in the phytopathogenic arsenal of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia rolfsii*. **Physiol. Mol. Plant Path.** v. 43, p. 415-422, 1993.

FERRARI, S., et al. Tandemly duplicated *Arabidopsis* genes that encode polygalacturonase-inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection. **Plant Cell Online.** v. 15, p. 93-106, 2003.

GERALDI, I. O. Selección recorrente en el mejoramiento de plantas. In: GUIMARÃES, E. P. (Ed.). **Selección recorrente en arroz**. CIAT: Cali, p. 3-11. 1997

GERALDI, I. O. Por que realizar seleção recorrente? In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 9., 2005, Lavras. **Anais...** Lavras: Editora da UFLA, 2005. p. 1-8.

GODOY, G., et al. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 37, n. 3, p. 179-191, 1990.

GUENIN, S., et al. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. **Journal of Experimental Botany**. Amiens, v.60, n.2, p.487-493. 2009.

GUIMARÃES, R. L.; STOTZ, H. U. Oxalate Production by *Sclerotinia sclerotiorum* Deregulates Guard Cells during Infection. **Plant Physiology**, v. 136, p. 3703-3711, 2004.

GUTIERREZ, L., et al. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. **Plant Biotechnology Journal**. Umea, v.6, n.6, p.609-618. 2008.

HEGEDUS, D. D., et al. *Brassica napus* possesses an expanded set of polygalacturonase inhibitor protein genes that are differentially regulated in response to *Sclerotinia sclerotiorum* infection, wounding and defense hormone treatment. **Planta**. v. 228, p. 241-253, 2008.

HUGGETT, J., et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes and immunity**, London, v.6, n.4, p.279-284. 2005.

JIANG, H. et al. Genetic diversity of recurrent selection populations with *Ms2* gene assessed by gliadins in common wheat (*Triticum aestivum* L.). **Agricultural Sciences in China**, China, v. 9, n. 5, p. 615-625, May 2010.

JONES, D. A.; JONES, J. D. G. The role of leucine-rich repeat proteins in plant defenses. **Adv. Bot. Res.** v. 24, p 89-167, 1997.

KALUNKE, R. M. J., et al. Transcript analysis of the bean polygalacturonase-inhibiting protein gene family reveals that *PvPGIP2* is expressed in the whole plant and is strongly induced by pathogen infection. **J. Plant Pathol.** v. 93, p. 141-148, 2011.

KELLY, J.D., et al. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. **Field Crops Research**, v.82, p.135-154, 2003.

KOLKMAN, J. M.; KELLY, J. D. An indirect test using oxalate to determine physiological resistance to white mold in common bean. **Crop Science**, v. 40, p. 281-285, 2000.

KOLKMAN, J. M.; KELLY, J. D. QTL conferring resistance and avoidance to white mold in common bean. **Crop Science**, v. 43, p. 539-548, 2003.

LEITE, M. E., et al. Increasing the resistance of common bean to white mold through recurrent selection. **Scientia Agricola**, v. 73 (1), p. 71-78, 2016.

- LI, R., et al. Two *Brassica napus* polygalacturonase inhibitory protein genes are expressed at different levels in response to biotic and abiotic stresses. **Planta**, v. 217, p. 299–308, 2003.
- LIMA, J. G. et al. Reação de linhagens de feijoeiro de oito ciclos de seleção recorrente visando a resistência à pseudocercospora griseola a dois isolados do patógeno. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 7., 2013, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: Embrapa Arroz e Feijão, p. 1903-1906, 2013.
- MANFREDINI, C., et al. Polygalacturonase-inhibiting protein 2 of *Phaseolus vulgaris* inhibits BcPG1, a polygalacturonase of *Botrytis cinerea* important for pathogenicity, and protects transgenic plants from infection. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** v. 67, p. 108-115, 2005.
- MELO, L. C.; SANTOS, J. B.; FERREIRA, D. F. QTL mapping for common bean grain yield in different environments. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 4, p. 135-144, 2004.
- MENDES, F. F.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B. Índice de seleção para escolha de populações segregantes de feijoeiro comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1312-1318, 2009.
- MENEZES JÚNIOR, J. A. N.de; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B. Seleção recorrente para três caracteres do feijoeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 4, p. 833-838, 2008.
- MIKLAS, P. N., et al. QTL conditioning physiological resistance and avoidance to white mold in dry bean. **Crop Science**, v. 41, p. 309-315, 2001.
- MIKLAS, P. N. et al. Characterization of white mold disease avoidance in common bean. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 135, n. 3, p. 525–543, Jan. 2013.
- NAPOLEÃO, R., et al. Intensidade do mofo branco do feijoeiro em plantio convencional e direto sob diferentes lâminas d'água. **Fitopatologia Brasileira**. v. 30, n. 4, p. 374-379, 2005.
- NDIMBA, B. K., et al. Proteomic analysis of changes in the extracellular matrix of Arabidopsis cell suspension cultures induced by fungal elicitors. **Proteomics**, v. 3, p. 1047–1059, 2003.
- NWOKOLO, E. Common Bean. In: **Food and Feed from Legumes and Oilseeds**. E. NWOKOLO J. SMARTT. Chapman and Hall. 1996.
- OESER, B., et al. Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea* interaction. **Fungal Genet Biol**, v. 36, p. 176–186, 2002.
- OLIVEIRA, R. P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Integrated genetic map of citrus base on RAPD markers. **Fruits**, Montpellier, v. 60, n. 3, p. 187-193, 2005.
- OLIVEIRA, S. H. F. Manejo do mofo branco. **DBO Agrotecnologia**, São Paulo, v. 2, n. 4, p. 8-13, 2005.

OLIVEIRA, M. B., et al. Characterization of the dry bean polygalacturonase-inhibiting protein (*PGIP*) gene family during *Sclerotinia sclerotiorum* (*Sclerotiniaceae*) infection. **Genet. Mol. Res.** v. 9, p. 994-1004, 2010.

PAULA-JR, T. J.; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA-JR, T. J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão: Aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. 2ª Ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. p. 359-414.

PARK, S. O., et al. Mapping of QTL for resistance to white mold disease in common bean. **Crop Sci.** v. 41, p. 1253-1262, 2001.

PEREIRA, H. S. et al. BRS Notável – Cultivar de feijoeiro comum carioca semiprecoce com alto potencial produtivo e resistência a doenças. In: **Congresso brasileiro de melhoramento de plantas**, p. 1564-1568, 2012, EMBRAPA, n. 202, Santo Antônio do Goiás – GO, fevereiro, 2012.

PETZOLDT, R.; DICKSON, M. H. *Straw test* for resistance to white mold in beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 39, p. 142–143, 1996.

PFAFFL M.W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, Munich. v.26, n.6, p.509–515, 2004.

PIRES, L. P. M., et al. Recurrent mass selection for upright plant architecture in common bean. **Scientia Agricola**, v. 71 (3), p. 240-243, 2014.

POWELL, A. L. T., et al. (2000). Transgenic expression of pear *PGIP* in tomato limits fungal colonization. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v. 13, p. 942-950, 2000.

RAMALHO, M. A. P. et al. **Aplicações da genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas**. Lavras: Editora da UFLA, 2012.

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B. Cultivares. In: VIEIRA, C.; PAULA- JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Ed). **Feijão**. 2. ed. Viçosa: Editora da UFV, 2006. p. 415-436.

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B.; SANTOS, J. B. Melhoramento de espécies autógamas. In: NASS, L. L. et al. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento: plantas**. Rondonópolis: Editora da Fundação MT, 2001. p. 201-230.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; ZIMMERMANN, J. O. **Genética quantitativa em plantas autógamas: aplicação ao melhoramento do feijoeiro**. Goiânia – GO, Editora da UFG, p. 271, 1993.

REZENDE, B. A. et al. Severity evaluation methods in common bean recurrent selection programme for resistance to angular leaf spot. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 162, n. 10, p. 643–649, Oct. 2014.

SANTOS, J.B. dos. **Seleção assistida por marcadores moleculares visando resistência ao mofo branco em feijão**. Goiânia, palestra apresentada na 10ª CONAFE, In: Anais da 10ª CONAFE, 2010.

SANTOS, J. B. dos, et al. **Botânica**. In: Carneiro, JE; TJ de Paula Jr; A Borém. FEIJÃO do plantio à colheita. Viçosa, Editora da UFV, p. 37-66, jan. 2015.

SCHWARTZ, H. F.; SINGH, S. P. Breeding common bean for resistance to white mold: A review. **Crop Science**, v. 53, n. 5, p. 1832-1844, 2013.

SILVA, A. C. F et al. Recurrent selection program for angular leaf spot resistance in carioca seeded common bean. **Bean Improvement Cooperative Annual Report**, Oxford, v. 58, p. 23, 2015.

SILVA, H. D.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B. Seleção recorrente fenotípica para florescimento precoce de feijoeiro ‘Carioca’. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 10, p. 1437-1442, 2007.

SILVA, A. P.; BOLTON, M. D.; NELSON, B. D. Transformation of *Sclerotinia sclerotiorum* with the green fluorescent protein gene and fluorescence of hyphae in four inoculated hosts. **Plant Pathology**, v. 58, p. 487-496, 2009.

SINGH, P. S.; TERÁN, H. Evolution of screening methods for detection of physiological resistance to white mold in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**. v. 51, p. 40-41, 2008.

SOULE, M. et al. Comparative QTL Map for White Mold Resistance in Common Bean, and Characterization of Partial Resistance in Dry Bean Lines VA19 and I9365-31. **Crop Science**, Madison, v. 51, n. 1, p. 123-139, 2011.

SOUZA, T.P. **Procedimentos experimentais para avaliação da reação do feijoeiro ao mofo branco**. 2009. 25 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.

SOUZA, D. A. **QTLs de feijão de reação ao mofo branco e outros caracteres agrônômicos**. 2014. 159 p. Tese (Doutorado em genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2009.

TEIXEIRA, F. F.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B. Genetic control of plant architecture in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 4, p. 577-582, Dec. 1999.

TERÁN, H.; SINGH, S. P. Recurrent selection for physiological resistance to white mould in dry bean. **Plant Breeding**, New York, v. 129, n. 3, p. 327-333, 2010.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RTPCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, Ghent, v.3, n.7, p.1-12, 2002.

VIEIRA, C., et al. Melhoramento do feijão. In: Borém, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2005. p. 301-391.

WATTS, L. Beans. In: **Flower and Vegetable Breeding**. Grower Books. 1980.

CAPÍTULO 1

SELEÇÃO RECORRENTE VISANDO RESISTÊNCIA AO MOFO BRANCO EM FEIJOEIRO

RESUMO

O mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) é um fungo responsável por limitar a produtividade da cultura de feijão, causando perdas consideráveis e consequente inviabilização da cultura em determinadas regiões e períodos do ano. A melhor forma de controlar e reduzir o impacto da doença é o uso de cultivares com resistência parcial ao mofo branco, em conjunto com boas práticas culturais. Dentre a diversidade genética existente, poucas linhagens de feijoeiro possuem resistência ao mofo branco. A dificuldade em se desenvolver linhagens resistentes está ligada ao fato de a resistência ser parcial, quantitativa, com herdabilidade moderada a baixa e a avaliação da doença em, muitos casos, ser imprecisa. Portanto, dando continuidade ao programa de seleção recorrente para resistência ao mofo branco em feijoeiro, o objetivo do trabalho foi obter progênies com níveis de resistência ainda maiores que os obtidos nos primeiros ciclos, com grãos do tipo carioca e porte ereto e verificar se a seleção recorrente continua sendo eficiente após dez e onze ciclos de seleção. A recombinação foi realizada pelo esquema dialélico cônico, a seleção foi massal em S_0 e as progênies foram avaliadas e selecionadas até às gerações $S_{0:3}$ (ciclo X) e $S_{0:2}$ (ciclo XI), juntamente com as mais resistentes do ciclo IX para se estimar o ganho com a seleção. Os caracteres avaliados foram resistência ao mofo branco pelo método do *Straw test*, porte e qualidade de grãos. As progênies mais resistentes foram selecionadas, com base na nota média de resistência ao mofo branco, sendo posteriormente, avaliadas quanto ao tipo de grãos e porte. A seleção recorrente possibilitou ganho na resistência ao mofo branco de aproximadamente 6% por ciclo de seleção. A seleção recorrente foi eficiente para obtenção de progênies com alto nível de resistência ao mofo branco, grãos do tipo carioca e porte ereto adaptadas às condições de cultivo do Sul de Minas Gerais.

Palavras-chave: Progênies segregantes. Porte. Tipo de grão.

ABSTRACT

The white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) is a fungus responsible for limiting the productivity of the common bean crop, causing considerable losses and consequent unfeasibility of the crop in certain regions and periods of the year. The best way to control and reduce disease impact is the use of partially resistant white mold cultivars and the use good cultural practices. Among the existing genetic diversity, few common bean lines have good resistance to white mold. The difficulty in developing resistant lines is linked to the fact that the resistance is partial, quantitative, with moderate to low heritability, and the evaluation of the disease is often imprecise. Therefore, continuing the recurrent selection program for resistance to white mold in common bean, the objective of this work was to obtain progenies with levels of resistance even higher than those obtained in the first cycles, with grains of the carioca type and upright habit, and to verify if the selection remains efficient after ten and eleven selection cycles. The recombination was carried out by the conical diallel scheme, the massal selection was in S_0 and the progenies were evaluated and selected until the generations $S_{0:3}$ (cycle X) and $S_{0:2}$ (cycle XI), together with the most resistant progenies of the IX cycle to estimate the gains with the selection. The evaluated characters were resistance to white mold by the straw test method, plant habit and grain type. The most resistant progenies were selected based on the average score of resistance to white mold, after which they were evaluated for grain type and plant habit. Recurrent selection allowed gain in white mold resistance of approximately 6% per selection cycle. The recurrent selection was efficient to obtain progenies with a high level of resistance to white mold, grains of the carioca type and upright habit, adapted to the growing conditions of the South of Minas Gerais.

Keywords: Segregant Progenies. Growth habit. Grain Type.

1 INTRODUÇÃO

O mofo branco, causado pelo fungo necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, é uma doença com potencial devastador nos cultivos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Esta doença limita o potencial de produção e reduz a qualidade das sementes e vagens. Em condições ambientais favoráveis ao patógeno (umidade prolongada e temperaturas moderadas) e cultivares susceptíveis, o mofo branco pode causar até 100% de perda de produção (SCHWATRZ; SINGH, 2013).

Estratégias integradas para impedir o avanço do mofo branco em culturas de feijão combinam várias técnicas que incluem a rotação de culturas, o uso de fungicidas, a irrigação e uso de fertilizantes de forma otimizada para diminuir a biomassa e o uso de cultivares menos suscetíveis com hábitos de crescimento eretos e com dossel mais aberto que contribuem para evitar a doença. Estas medidas de controle, no entanto, podem limitar o potencial de produção e/ou aumentar os custos de produção, por isso há o esforço dos melhoristas em continuar a desenvolver cultivares com níveis mais altos de resistência parcial ao fungo.

A maioria das fontes conhecidas de resistência parcial ao mofo branco são de origem andina e níveis mais elevados de resistência são observados apenas em pool genético secundário, como *Phaseolus coccineus* L. (GILMORE; MYERS; KEAN, 2002; CHIPPS et al., 2005; SINGH et al., 2009; VITERI et al., 2014). A falta de altos níveis de resistência parcial fisiológica em cultivares de feijões comerciais e a herdabilidade baixa ou moderada para a característica, tem limitado o progresso no desenvolvimento de cultivares de feijoeiro com uma maior resistência à doença (SCHWATRZ; SINGH, 2013). Além disso, é difícil discernir mecanismos de resistência fisiológica no campo, devido à forte influência do ambiente e de características que contribuem para evitar a doença como a maturidade precoce e a arquitetura da planta (SCHWARTZ; STEADMAN; COYNE, 1978). De fato, a maioria dos estudos não mostra uma forte correlação entre os experimentos de resistência em casa de vegetação e em campo, o que sugere que fatores adicionais que estão sendo expressos no campo não são detectados em testes em casa de vegetação (MIKLAS et al., 2013).

Os mecanismos de escape e de resistência fisiológica são características quantitativas e controladas por um grande número de QTLs (MIKLAS et al., 2013; SOULE et al., 2011). Dessa forma, uma alternativa para acumular de forma gradual um maior número de alelos de resistência ao mofo branco é por meio da seleção recorrente. Esse método é um processo cíclico e dinâmico que envolve a obtenção de progênies, avaliação e recombinação das melhores

plantas visando aumentar a frequência dos alelos favoráveis e, por consequência, melhorar a expressão do caráter (RAMALHO et al., 2012).

O que se espera com a seleção recorrente é o progresso do caráter sob seleção, mantendo a variabilidade genética para progressos futuros (HALLAUER, 1992). Para isso, é necessário ter uma população com variabilidade genética e uma estratégia de seleção e recombinação que permita ter progresso sem exaurir a variabilidade.

O programa de seleção recorrente para mofo branco vem sendo desenvolvido na Universidade Federal de Lavras (UFLA) desde a safra das águas de 2009/2010, com nove ciclos de seleção já estabelecidos. O programa tem possibilitado um incremento significativo na resistência ao patógeno, e as progênes selecionadas ainda possuem grãos comerciais do tipo carioca. Além disso, as populações continuaram com variabilidade suficiente para se realizar a seleção, e os níveis de resistência obtidos podem ainda ser incrementados (CARNEIRO 2012; LEITE et al, 2016; DIAS 2015). Os objetivos deste trabalho foram selecionar progênes no décimo e décimo primeiro ciclos de seleção recorrente com maiores níveis de resistência ao mofo branco em campo, porte ereto e grão tipo carioca, além de verificar se ainda há ganhos significativos com a seleção para a continuidade do programa de seleção.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local

Os experimentos foram conduzidos na área experimental da Universidade Federal de Lavras (UFLA). O município de Lavras situa-se na região sul do estado de Minas Gerais, a 918 metros de altitude, 21°58' de latitude Sul e 42°22' de longitude Oeste.

2.2 Obtenção da população base

Na safra das águas de 2009/2010 iniciou-se com Carneiro (2012) o programa de seleção recorrente para mofo branco na Universidade Federal de Lavras. O programa iniciou-se com o inter cruzamento entre 12 linhagens/cultivares com resistência parcial ao mofo branco, sendo inserida no segundo ciclo de seleção a linhagem A195 (Tabela 1). A linhagem A195 é uma fonte exótica, de origem andina, sementes grandes e resistente ao mofo branco, oriunda do programa de melhoramento do CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) (TERÁN; SINGH, 2009). As linhagens/cultivares de número 1 a 8 são adaptadas à região Sul de Minas

Gerais. As de número 9 a 12 são progênes derivadas de retrocruzamento em que o doador da resistência ao mofo branco foi a fonte G122 ou Ex Rico 23 (também conhecido como ICA Bunsu) (TU; BEVERSDORF, 1982; McCOY et al., 2011) e os genitores recorrentes foram as linhagens M20 ou Madrepérola. A linhagem G122 tem grãos grandes tipo pintado e hábito de crescimento tipo I (SCHWARTZ; SINGH, 2013), a Ex Rico 23 tem grãos pequenos e brancos e hábito de crescimento tipo II e ambas têm resistência fisiológica parcial ao mofo branco. A M20 é portadora dos alelos de resistência à antracnose (*Co-5* e *Co-4²*), resistência parcial à mancha angular, hábito de crescimento tipo II e grãos tipo carioca (SILVA; SANTOS; ABREU, 2006) e a Madrepérola possui o hábito de crescimento tipo III, tem excelente tipo de grãos carioca, escurecimento tardio dos grãos, além de apresentar resistência ao vírus do mosaico comum do feijão e alta produtividade.

Tabela 1 - Linhagens e cultivares com resistência parcial ao mofo branco, utilizadas no intercruzamento do programa de seleção recorrente da Universidade Federal de Lavras, e suas características.

Cultivar/linhagem	Tipo/ peso 100 grãos (g)	Hábito de crescimento	Alelo- Resistência à antracnose	Reação à mancha angular
1- RP-2	Carioca/25	II	-	-
2- MA-IV-18-266	Carioca/23	II	-	Resistente
3- BRS – Cometa	Carioca/23	II	-	-
4- VC-16	Carioca/25	III	-	-
5- BRSMG – Majestoso	Carioca/25	III	-	-
6- CNFRJ10564	Pintado/42	I	-	-
7- ESAL 550	Jalo/45	III	-	Intermediária
8- BRSMG – Talismã	Carioca/22	II	-	Suscetível
9- RC2-G122-67	Carioca/25	II	Co.4 ²	Resistente
10- RC2-G122-72	Carioca/23	II	Co.4 ²	Resistente
11- RC1-ExRico-26	Carioca/23	II	-	Suscetível
12- RC1-ExRico-97	Carioca/20	II	-	-
13- A195**	Bege/54	I	-	Resistente
14- RCII M20 x G122*	Carioca/24	II	-	-
15- OPNS x VC3-41*	Carioca	III	-	Suscetível
16- EBM 9*	Carioca	II	-	-
17- CNFC 10722*	Carioca	II	-	Intermediária
18- BRS vereda*	Rosinha/26	II	Co.5	Intermediária

* Linhagens/cultivares incluídas no ciclo VII de seleção recorrente e eliminadas três progênes menos promissoras.

** Linhagem incluída no segundo ciclo de seleção recorrente.

Para obtenção do ciclo zero cada genitor foi cruzado com dois outros. Nas populações F_2 (geração S_0) obtidas a partir dos cruzamentos, todas as plantas foram inoculadas, avaliadas e as mais resistentes ao mofo branco foram selecionadas. As plantas selecionadas de cada população foram inter cruzadas com as selecionadas de duas outras populações para a obtenção do ciclo I. Nos outros ciclos as plantas S_0 , agora segregantes, foram inoculadas, avaliadas e selecionadas um pouco antes do florescimento e inter cruzadas. Este procedimento permitiu a redução do tempo de obtenção de cada ciclo da seleção recorrente em apenas uma safra, sendo realizados três ciclos por ano.

As linhagens/cultivares de 1 a 13 (Tabela 1) foram utilizadas para gerar a população base no programa de seleção recorrente para resistência ao mofo branco e foram inter cruzadas no esquema dialelo circulante para obtenção das progênies até o ciclo VI, sendo os ciclos 0, I e II obtidos por Carneiro (2012) e os demais por Leite et al., (2016). Após o ciclo VI foram inseridos cinco novas fontes de alelos de resistência no programa e retiradas três progênies menos promissoras, totalizando 15 inter cruzadas (Tabela 1). A linhagem CNFC 10722 e a progênie derivada de RCII M20xG122, além de terem exibido resistência ao mofo branco pelo método de inoculação em casa de vegetação (*straw test*), também mostraram bons resultados na avaliação em campo, juntamente com a OPNSxVC3-41, EBM 9, cultivar BRS Vereda, com resistências semelhantes à linhagem A195 que é conhecida por sua alta resistência à doença (BONICONTRO et al., 2014).

Para obtenção da população S_0 do ciclo X, cerca de 20 plantas S_0 mais resistentes do ciclo IX, de cada uma das 15 progênies, foram inter cruzadas no esquema dialelo circulante ou cônico. A avaliação e seleção das plantas S_0 nas populações base dos ciclo X e XI foram feitas antes do florescimento e as progênies foram selecionadas a partir da nota média de duas inoculações por planta. Portanto, as plantas selecionadas foram inter cruzadas no campo, acelerando assim o processo de seleção recorrente, uma vez que cada ciclo foi obtido em uma safra.

2.3 Avaliação das progênies segregantes

As melhores progênies $S_{0:1}$ identificadas foram autofecundadas até a geração $S_{0:3}$ (ciclo X) e $S_{0:2}$ (ciclo XI), para estabelecer um maior nível de homozigose em seus locos, sendo selecionadas em cada geração as progênies mais resistentes. Em todos os experimentos a cultivar Corujinha foi utilizada como testemunha suscetível à doença.

A seleção das progêneses segregantes foi realizada priorizando a resistência ao mofo branco. Dentre as progêneses selecionadas para resistência ao mofo branco foi realizada a seleção para tipo de grãos e porte. No caso de tipo de grãos, houve eliminação das progêneses com grãos muito fora do padrão carioca, mesmo que elas apresentassem maiores níveis de resistência.

As progêneses $S_{0:1}$ do ciclo X foram avaliadas na safra das secas de 2014 utilizando-se um delineamento em látice simples 12 x 12 e as progêneses $S_{0:2}$ foram avaliadas na safra de inverno do mesmo ano em um látice triplo 7 x 7. Já as progêneses $S_{0:1}$ do ciclo XI foram avaliadas na safra de inverno de 2014 também utilizando-se um látice simples 12 x 12. Posteriormente, foram avaliados na safra da seca de 2015, em um látice triplo 8 x 8, as 24 melhores progêneses selecionadas do ciclo X ($S_{0:3}$), as 34 melhores do ciclo XI ($S_{0:2}$), as 4 melhores oriundas do ciclo IX ($S_{0:4}$) (DIAS, 2015) e as testemunhas Corujinha (suscetível) e Cornell 605 (com alta resistência parcial). As parcelas consistiram em uma linha de um metro e foram inoculadas com micélio do fungo e avaliadas 10 plantas por parcela, além das avaliações visuais para porte e, depois da colheita, para qualidade de grão.

Em todos os experimentos foram utilizados os mesmos tratamentos culturais, que se consistiram em: adubação na semeadura de 300 kg/ha do formulado 8-28-16 (N-P₂O₅-K₂O, respectivamente) e, 20 dias após a emergência, 150kg/ha de sulfato de amônio. A irrigação foi realizada por aspersão, sendo esta aumentada após a inoculação do fungo, e os demais tratamentos culturais foram os recomendados para a cultura do feijoeiro na região.

2.4 Preparo do inóculo e avaliação da resistência ao mofo branco

O fungo foi multiplicado em placas de Petri contendo meio de batata dextrose e ágar (BDA) com cloranfenicol (1 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de meio BDA) e incubado a 22°C, por três dias e fotoperíodo de 12 horas. O inóculo foi multiplicado mais uma vez, utilizando os mesmos protocolos, a fim de se obter maior uniformidade. Três dias após a segunda multiplicação, foram realizadas as inoculações, pelo método do *Straw test* (PETZOLDT; DICKSON, 1996). O método consiste no corte do ápice caulinar a cerca de 2,5cm do nó, onde se encaixa uma ponteira de micropipeta de 200 μl , com disco de meio de cultura BDA contendo o micélio de *S. sclerotiorum*.

As plantas foram inoculadas com o micélio do patógeno aproximadamente aos 28 dias após a semeadura, utilizando o método do *Straw test* (PETZOLDT; DICKSON, 1996; TERÁN; SINGH, 2009). Todas as plantas S_0 dos ciclos X e XI (cerca de 900 por ciclo) foram inoculadas em dois ramos principais, como sugerido por Terán e Singh (2009) utilizando o isolado UFLA

27 (SILVA et al., 2014). Nas progênies segregantes de cada ciclo foi inoculado apenas o ramo principal de dez plantas por parcela.

Sete dias após a inoculação realizou-se a avaliação da reação do feijoeiro ao mofo branco por meio de uma escala de diagramática de 1 a 9 (PETZOLDT; DICKSON, 1996), em que: 1 - plantas sem sintomas; 2 - invasão do fungo além do sítio de inoculação; 3 - invasão do fungo próximo ao primeiro nó; 4 - quando o fungo atinge o primeiro nó; 5 - invasão do fungo além do primeiro nó; 6 - invasão do fungo próximo ao segundo nó; 7 - quando o fungo atinge o segundo nó; 8 - invasão do fungo além do segundo nó e 9 – invasão do fungo próximo ao terceiro nó ou morte da planta.

2.5 Avaliação do porte e tipo de grãos

As avaliações do porte foram realizadas utilizando-se uma escala diagramática de 1 a 9 (MENDES; RAMALHO; ABREU, 2011). Nesta, a nota 9 - refere-se a plantas de hábito tipo I ou II, eretas, com uma haste e alta inserção das primeiras vagens; 8 – plantas com hábito I ou II, eretas e com guia curta; 7 – plantas com hábito I ou II, eretas e com algumas ramificações; 6 – plantas de hábito I ou II, eretas e com algumas guias longas; 5 – plantas de hábito II ou III, eretas, com muitas ramificações e tendência a prostrar; 4 – plantas de hábito II ou III, semieretas e pouco prostradas; 3 – plantas de hábito III, semieretas e mediamente prostradas; 2 – plantas de hábito III e prostrada; e a nota 1 à planta do tipo III, com entrenós longos e completamente prostrada.

As avaliações para tipo de grãos foram realizadas utilizando-se o tipo carioca como padrão, que consiste em grãos de coloração creme-clara, rajas marron-claro, halo creme, tamanho médio, com peso de 100 sementes entre 23 e 25 g e não achatados. Para isso, foi utilizada uma escala diagramática de 1 a 5 (RAMALHO; PIROLA; ABREU, 1998). Nesta, a nota 1 refere-se ao grão típico carioca, de cor creme com estrias marrom-claras, fundo claro, halo creme, peso médio de 100 sementes de 22 a 24g e não achatado; nota 2 ao grão tipo carioca com deficiência em uma das características mencionadas no padrão; nota 3 ao grão tipo carioca com deficiência em duas características mencionadas no padrão; nota 4 ao grão tipo carioca com deficiência em características mencionadas no padrão e nota 5, refere-se ao grão de cor creme com estrias marrom-escuras, fundo escuro, com halo não creme, peso médio de 100 sementes menor que 22g e achatado.

2.6 Análise genético-estatística das progênes segregantes

Para as análises de variância individuais dos experimentos foi utilizado o seguinte modelo:

$$Y_{ijl} = \mu + p_i + r_j + b_{l(j)} + e_{ijl} \quad (1)$$

No qual: Y_{ijl} refere-se à observação da parcela que recebeu o tratamento i , no bloco l , dentro da repetição j ; μ é média geral do experimento; p_i é o efeito aleatório do tratamento i , sendo $i = 1, 2, 3, \dots, n$, sendo n o número de progênes avaliadas em cada experimento e $p \sim N(0, \sigma_p^2)$, σ_p^2 é a variância entre progênes; r_j é o efeito da repetição j , sendo $j = 1$ e 2 na geração $S_{0:1}$ dos ciclos X e XI e $j = 1, 2$ e 3 nas gerações $S_{0:2}$ do ciclo X e no experimento final com os 3 ciclos; $b_{l(j)}$ é o efeito aleatório do bloco l dentro da repetição j e $b \sim N(0, \sigma_b^2)$, σ_b^2 é a variância entre blocos; e e_{ijl} é o efeito aleatório do erro experimental associado à observação Y_{ijl} e $e \sim N(0, \sigma_e^2)$, σ_e^2 é a variância residual.

Para o experimento final com os 3 ciclos foi utilizado o mesmo modelo, mas o efeito de tratamento (p_i) foi considerado fixo, devido ao menor número de progênes já selecionadas dos ciclos IX, X e XI, além da inclusão do efeito dos diferentes ciclos (c_i).

Foi realizada também a análise pelo procedimento sequencial recuperando informação das gerações avaliadas ($S_{0:1}$ e $S_{0:2}$ do ciclo X). Foi utilizado o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + p_i + r_{j(k)} + q_k + b_{l(jk)} + (pq)_{ik} + e_{ijk} \quad (2)$$

Onde: Y_{ijk} é referente à observação obtida do tratamento i , no bloco l , dentro da repetição j , dentro da geração k ; μ é a média geral do experimento; p_i é o efeito aleatório do tratamento i , sendo $i = 1, 2, 3, \dots, n$, sendo n o número de progênes avaliadas em cada geração e $p \sim N(0, \sigma_p^2)$, σ_p^2 é a variância entre progênes; $r_{j(k)}$ é o efeito da repetição j dentro da geração k , sendo $j = 1, 2$ e 3 na geração $S_{0:1}$ e $j = 1$ e 2 na geração $S_{0:2}$; q_k é o efeito da geração k , sendo $k = 1$ e 2 ; $b_{l(jk)}$ é o efeito aleatório do bloco l , dentro da repetição j dentro da geração k e $b \sim N(0, \sigma_b^2)$, σ_b^2 é a variância entre blocos; $(pq)_{ik}$ é o efeito aleatório da interação entre o tratamento i e a geração k e $pq \sim N(0, \sigma_{pq}^2)$, σ_{pq}^2 é a variância da interação entre o tratamento i e a geração k ; e e_{ijk} é o efeito aleatório do erro experimental associado à observação Y_{ijk} e $e \sim N(0, \sigma_e^2)$, σ_e^2 é a variância residual.

A abordagem para análise dos dados foi a de modelos mistos (HENDERSON et al., 1959), na qual a estimação dos efeitos fixos BLUE (Best Linear Unbiased Estimator – melhor estimador linear não tendencioso) e aleatórios BLUP foi realizada via resolução de sistema de equações de Henderson (1975). Os componentes de variância (σ_p^2 , σ_r^2 , σ_b^2 , σ_q^2 , σ_{pq}^2 e σ_e^2) e seus intervalos de confiança (IC) foram estimados pela metodologia da máxima verossimilhança residual ou restrita (REML) (PATTERSON; THOMPSON, 1971). As análises foram realizadas utilizando-se o PROC MIXED do programa SAS 9.0 (Statistical Analysis System Institute-SAS, 2007).

2.7 Estimativa dos parâmetros genéticos e fenotípicos

A herdabilidade no sentido amplo (h_a^2) foi estimada para as análises individuais de acordo com a equação:

$$h_a^2 = \frac{\hat{\sigma}_p^2}{\hat{\sigma}_p^2 + \frac{\hat{\sigma}_e^2}{r}} \quad (3)$$

Sendo: r o número de repetições.

Já a herdabilidade no sentido amplo estimada na análise sequencial do ciclo X, foi utilizada a equação:

$$h_a^2 = \frac{\hat{\sigma}_p^2}{\hat{\sigma}_p^2 + \frac{\hat{\sigma}_{pq}^2}{k} + \frac{\hat{\sigma}_e^2}{kr}} \quad (4)$$

Onde: k é o número de gerações (k = 2) e r é a média harmônica das repetições nas duas gerações.

Foi estimado a acurácia seletiva ($r_{\hat{g}g}$) para as características avaliadas utilizando a seguinte expressão de Resende e Duarte (2002):

$$r_{\hat{g}g} = \sqrt{1 - \frac{\overline{PEV}}{\hat{\sigma}_g^2}} \quad (5)$$

Em que: \overline{PEV} é a média das variâncias do erro de predição dos valores genotípicos; e $\hat{\sigma}_g^2$ é a variância genética do caráter.

Para o experimento com as melhores progênies de cada ciclo e que a variável tratamento foi considerada como fixa, a acurácia seletiva ($r_{\hat{g}g}$) foi estimada utilizando a expressão (RESENDE; DUARTE, 2007):

$$r_{\hat{g}g} = \sqrt{1 - \frac{1}{F_p}} \quad (6)$$

Em que: F_p é valor do teste F de Snedecor para o efeito de progênies na ANAVA.

Foram estimados o progresso genético obtido com os ciclos de seleção recorrente para os caracteres avaliados entre as gerações $S_{0:1}$ dos ciclos X e XI e entre as gerações no experimento com os 3 ciclos.

O progresso genético entre as gerações $S_{0:1}$ dos ciclos X e XI foi estimado a partir do desvio genético das médias das progênies em relação à testemunha Corujinha para a resistência ao mofo branco, visando atenuar o efeito ambiental uma vez que as progênies foram avaliadas em safras diferentes.

Já para o experimento com os 3 ciclos foi estimada a média para cada característica e a nota média das 4 melhores progênies de cada ciclo foram utilizadas para se obter uma equação de regressão linear entre o número de ciclos, variável independente (x), e o desvio genético, variável dependente (y). O progresso genético percentual foi obtido pela expressão:

$$PG (\%) = (b_1/b_0) \times 100 \quad (7)$$

Onde: b_1 é o coeficiente angular estimado ou ganho absoluto; e b_0 é o valor fenotípico médio no ciclo IX.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação sequencial do ciclo X

Pela análise sequencial, os experimentos foram conduzidos com alta precisão experimental para resistência ao mofo branco e tipo de grãos com acurácia seletiva e herdabilidade altas ($r_{\hat{g}g} > 0,75$ e $h^2 > 0,76$), apenas a característica porte apresentou menor herdabilidade ($h_a^2 = 0,43$) e moderada acurácia ($r_{\hat{g}g} = 0,68$) (Tabela 2), resultados semelhantes

foram obtidos nas análises individuais (Apêndice -Tabela 1A e 2A). A acurácia seletiva refere-se à correlação entre o valor genotípico verdadeiro do tratamento e aquele estimado a partir das informações dos experimentos e, segundo Resende e Duarte (2007), as estimativas de acurácia superiores a 70% indicam alta precisão experimental. Estes resultados estão de acordo com os encontrados na literatura, que variaram entre 66 a 93% para resistência ao mofo branco, entre 54 e 73% para porte e acima de 80% para grãos (LEITE et al., 2016; DIAS, 2015; CARNEIRO, 2012).

A herdabilidade para resistência ao mofo branco foi de alta magnitude (Tabela 2), algo que na literatura tem se mostrado ser de baixa a moderada em avaliações de campo (PARK, 2001; MIKLAS et al., 2013; SCHWARTZ; SINGH, 2013), embora haja grande variabilidade na estimativa. Um exemplo é o trabalho de Leite et al., (2016), que encontraram herdabilidades variando entre 59 e 86%. As grandes flutuações observadas se devem principalmente à grande influência do ambiente na expressão do caráter e da interação das progênes com o ambiente (DIAS, 2015; LEITE et al., 2016).

Para o porte, a herdabilidade foi baixa à moderada. Contudo, as progênes não apresentaram diferença significativa pelo teste de razão de verossimilhança a 0,05% não sendo possível realizar seleção para esta característica neste ciclo. Na literatura há relatos de grande variação da herdabilidade para o caráter, Pires et al., (2014) encontraram valores de herdabilidade entre 42% e 52%, mas Leite et al., (2016) encontrou herdabilidade de até 86%. As herdabilidade encontrada para grãos foi de 76%. Menezes Júnior, Ramanlho e Abreu (2008) relataram estimativas de herdabilidade variando de 34 a 86% e Dias (2015) de 73 a 92%, indicando que as três características tem uma ampla variação.

A avaliação da arquitetura da planta em um programa de seleção recorrente para o mofo branco é de grande importância, uma vez que o porte mais ereto e um dossel poroso tem a capacidade de evitar a doença, já que estas características proporcionam condições desfavoráveis para o desenvolvimento do patógeno (MIKLAS et al., 2013). Além disso, os tecidos das plantas em contato com o solo são vulneráveis às infecções micelares que podem estar presentes em flores e folhas senescentes colonizadas na superfície do solo (KOLKMAN; KELLY, 2003; MIKLAS et al., 2013).

Foi detectada diferença significativa entre as gerações para as três características na análise sequencial. Neste contexto, é importante enfatizar que o efeito de gerações pode ser confundido com o efeito de safras, já que as progênes $S_{0:1}$ e $S_{0:2}$ foram avaliadas em épocas diferentes. Não houve significância para a interação neste ciclo para porte e grão e uma variância de pequena magnitude para resistência ao fungo sendo a taxa $\sigma_{pq}^2 / \sigma_p^2 = 0.015$, isso

indica que as progênies se comportaram de maneira consistente entre as gerações (Tabela 2). Leite et al. (2016) também não encontraram diferença significativa para a interação genótipo x ambiente para três dos quatro ciclos de seleção recorrente. A presença da interação pode ser explicada pela sensibilidade dos genótipos às variações ambientais, especialmente, em temperatura e umidade. Segundo Terán e Singh (2010) o próprio método do *straw test* tende a reduzir a interação, quando comparado com avaliações em incidência natural.

Tabela 2 - Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos para os caracteres resistência ao mofo branco, porte e grãos avaliados na análise sequencial do X ciclo de seleção recorrente.

Parâmetro	Mofo Branco	Porte	Grãos
Média	3,8508	5,9724	3,8508
σ_p^2	0,2756	0,2632	0,1474
LI – LS	0,1842 – 0,4572	0,0652 - 6,3178	0,1113 – 0,2045
σ_{pq}^2	0,0042	0	0
LI – LS	0,0007 – 0,0176	-	-
σ_e^2	0,3604	1,4973	0,19884
LI – LS	0,3006 – 0,4402	0,7303 – 2,0111	0,0836 – 0,3187
h_a^2	0,7651	0,4344	0,7642
$r_{\hat{g}}$	0,8001	0,6802	0,7856

σ_p^2 : variância genética entre as progênies de Feijão. σ_{pq}^2 : variância da interação progênie x geração. σ_e^2 : variância residual. LI: limite inferior. LS: limite superior. h_a^2 : herdabilidade no sentido amplo. $r_{\hat{g}}$: acurácia seletiva.

3.2 Avaliação do ciclo XI

A análise individual da $S_{0:1}$ do ciclo XI foi realizado com alta precisão experimental ($r_{\hat{g}} > 0,70$) para todas as características e herdabilidades de moderada (porte) a altas (resistência ao mofo branco e qualidade de grãos) (Tabela 3). Houve melhora nos resultados de acurácia seletiva para o porte, se comparado com o ciclo X, e neste ciclo houve variação significativa entre as progênies, indicando que foi possível selecionar progênies para esta característica.

Os genótipos apresentaram variância genética significativamente diferente de zero para as três características avaliadas, uma vez que os limites inferiores dos intervalos de confiança (IC) foram sempre positivos.

Tabela 3 - Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos para os caracteres resistência ao mofo branco, porte e grãos avaliados na análise da $S_{0:1}$ do XI ciclo de seleção recorrente.

Parâmetro	Mofo Branco	Porte	Grãos
Média	3,5094	6,4181	2,6272
σ_p^2	0,2385	0,2178	0,0881
LI – LS	0,1682 – 0,3647	0,1407 – 0,3820	0,0636 – 0,1303
σ_e^2	0,2452	0,3583	0,07419
LI – LS	0,1939 – 0,3199	0,2827 – 0,4688	0,0584 – 0,0972
h_a^2	0,6604	0,5486	0,7038
$r_{\hat{g}g}$	0,7922	0,7248	0,8242

σ_p^2 : variância genética entre as progênies de Feijão. σ_e^2 : variância residual. LI: limite inferior. LS: limite superior. h_a^2 : herdabilidade no sentido amplo. $r_{\hat{g}g}$: acurácia seletiva.

O progresso genético entre os ciclos X e XI foi estimado a partir do desvio genético das médias das progênies selecionadas em relação à testemunha Corujinha. As notas médias de resistência ao mofo branco das progênies foi de 4,0226 para a $S_{0:1}$ do ciclo X e de 3,5094 para a $S_{0:1}$ do ciclo XI. Já as notas da testemunha Corujinha foram de 5,5057 e 5,6960 respectivamente. Logo, o progresso genético entre os dois ciclos foi de -17,49%. Este progresso se mostrou superior aos encontrados na literatura para a resistência ao mofo branco na cultura do feijoeiro. Leite et al., (2016) relataram progresso genético de 4% por ciclo de seleção, Téran e Singh (2010a, 2010b) obtiveram ganhos genéticos variando entre 5 e 12% em duas populações diferentes. Já Lyons, Dickson e Hunter (1987) identificaram resultados mais próximos aos obtidos neste trabalho (31%), mas após três ciclos de seleção recorrente e utilizando genótipos oriundos de cruzamentos interespecíficos entre *Phaseolus vulgaris* e *P. coccineus*, sendo que esta última espécie possui genótipos com altos níveis de resistência, o que deve ter possibilitado estes maiores ganhos.

Como só foram utilizados dois ciclos seletivos para a estimativa do progresso genético, avaliados em safras diferentes, e com apenas duas repetições para cada progênie em $S_{0:1}$, pode-se supor que esta estimativa encontra-se superestimada. Contudo, nota-se que os desvios da média das progênies em relação a testemunha suscetível foram de 1,48 no ciclo X e de 2,19 no ciclo XI. O desvio obtido no ciclo X foi superior a maioria dos desvios obtidos nos ciclos anteriores obtidos por Leite et al. (2016) e Dias (2015), sendo superior aos obtidos na geração $S_{0:1}$ de todos os ciclos anteriores e considerando a média dos ciclos (incluindo todas as gerações avaliadas) o desvio só não foi superior aos obtidos nos ciclos VI e VII. Já no ciclo XI, o desvio foi superior a todos os desvios das gerações e ciclos anteriores. Esse desvio superior indica um

aumento nos níveis de resistência das progênes destes ciclos em relação aos anteriores, devido a um acúmulo de alelos favoráveis pela seleção recorrente.

3.3 Avaliação das melhores progênes dos ciclos IX, X e XI

Como foram avaliadas apenas algumas progênes de cada geração no experimento com as melhores progênes dos três ciclos (IX, X e XI), 4 melhores progênes $S_{0:4}$ do ciclo IX, 24 melhores progênes $S_{0:3}$ do ciclo X e 34 melhores progênes $S_{0:2}$ do ciclo XI, a variável tratamento foi considerada como fixo, já que não representa bem as linhagens pertencentes a cada ciclo e, considerando esses aspectos, foi realizada a análise de variância (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise de variância das progênes selecionadas das gerações $S_{0:4}$ do ciclo IX, $S_{0:3}$ do ciclo X e $S_{0:2}$ do ciclo XI de seleção recorrente para resistência ao mofo branco, porte e qualidade de grãos.

Fonte de variação	GL	Mofo Branco		Porte		Grão	
		QM	$r_{\hat{g}g}$	QM	$r_{\hat{g}g}$	QM	$r_{\hat{g}g}$
Rep	2	0,3526 ^{NS}		0,4375 ^{NS}		0,0016 ^{NS}	
Bloco (Rep)	21	1,0018 ^{**}		0,6438 ^{NS}		0,2102 [*]	
Tratamentos	63	0,3223 ^{NS}	0,4435	1,2734 ^{**}	0,7899	0,782 ^{**}	0,7966
Tratamentos (Grupos)	59	0,2464 ^{NS}	0,4697	1,3296 ^{**}	0,8001	0,3323 ^{**}	0,8171
Prog. dentro do CIX	3	0,2466 ^{NS}		1,3969 ^{**}		0,3235 ^{**}	
Prog. dentro do CX	23	0,1663 ^{NS}		1,2702 ^{**}		0,2657 ^{**}	
Prog. dentro do CXI	33	0,2068 ^{NS}		1,3517 ^{**}		0,3715 ^{**}	
Grupos	4	1,2300 ^{**}		0,3694 ^{NS}		6,8468 ^{**}	
Test R vs Ciclos	1	0,4055 ^{NS}		0,1264 ^{NS}		8,3938 ^{**}	
Test S vs Ciclos	1	3,4072 ^{**}		0,2726 ^{NS}		14,199 ^{**}	
Entre Ciclos	2	0,8275 [*]		0,5827 ^{NS}		0,3320 ^{NS}	
Erro	104	0,2096		0,4787		0,1104	

*, **: Significativo a 5% e a 1% de Probabilidade; ^{NS}: Não significativo pelo teste F.

$r_{\hat{g}g}$: acurácia seletiva.

Na tabela 4 está apresentado o resumo da análise de variância para o experimento conduzido com as melhores progênes dos ciclos IX, X e XI. Observa-se alta precisão experimental, com valores de acurácia seletiva superiores a 75% para porte e qualidade de grãos. Já as acurácias seletivas para resistência ao mofo branco foram de moderada magnitude

e se aproximando mais aos encontrados na literatura. Entretanto, uma medida de precisão experimental muito usada é o coeficiente de variação e, no caso de reação ao mofo branco ele foi de 13,06%), um valor semelhante aos observados na maioria dos trabalhos de campo e que indica boa precisão experimental. Portanto, a menor acurácia deveu-se essencialmente à menor variação genética entre as progênes, o que é esperado, uma vez que elas constituem apenas as selecionadas nos três ciclos.

Houve diferença significativa entre os tratamentos e entre as progênes dentro de tratamentos para porte e qualidade de grãos, indicando que é possível identificar progênes superiores para estas características nestes grupos. O alto valor do quadrado médio entre grupos para a característica tipo de grão se deve às testemunhas, pois estas se desviam do padrão carioca e receberam nota 5 em todas as avaliações. Percebe-se que no contraste entre ciclos, em que não estão inseridos as testemunhas, há uma grande diminuição no valor do quadrado médio e não há diferença significativa entre estes grupos. Já para a resistência ao mofo branco, embora não se tenha observado variação entre os tratamentos e entre as progênes dentro de cada ciclo, pode-se observar que estas progênes não se diferenciaram da cultivar resistente Cornell 605, mas diferiram da linhagem suscetível Corujinha o que indica que estas progênes selecionadas possuem uma alta resistência parcial. Além disso, foi observado uma diferença significativa a 5% de probabilidade para as progênes entre ciclos, indicando que mesmo não havendo diferença entre os tratamentos em geral, é possível observar diferenças entre os ciclos de seleção (Tabela 4).

A alta precisão experimental e herdabilidade verificadas na maioria dos experimentos pode ser decorrente do melhor controle ambiental proporcionado pelo delineamento experimental. Por definição, a acurácia é a correlação entre o verdadeiro valor genético do indivíduo, ou progênie, e o índice utilizado na sua estimação (FALCONER; MACKAY, 1996). Dessa forma, nas avaliações genéticas, a acurácia e a herdabilidade são estimadas para prever o sucesso com a seleção, já que os ganhos genéticos são proporcionais à acurácia, e quanto maior a acurácia, maior a precisão na seleção (RESENDE et al., 1995). Portanto, pode-se inferir que a maioria dos experimentos foi possível ter uma alta precisão na seleção, ajudando a aumentar as estimativas de progresso genético.

Na tabela 5 estão apresentadas as médias das quatro melhores progênes dos três ciclos seletivos para a resistência ao mofo branco, porte e qualidade de grãos. Observa-se que em todos os ciclos foi possível obter progênes com médias para resistência ao mofo branco, inferiores à testemunha resistente Cornell 605, indicando a possibilidade de seleção de

progênies com níveis de resistência semelhantes aos encontrados em fontes não adaptadas às regiões de cultivo do Sul de Minas Gerais.

Tabela 5 - Média ajustada da reação média para resistência ao mofo branco, porte e qualidade de grãos das 4 progênies selecionadas dos ciclos IX, X e XI e das testemunhas suscetível (Corujinha) e resistente (Cornell 605).

Tratamento	Ciclo	Mofo branco	Porte	Grão
26\15	9	3.31	5.81	2.22
28\11	9	3.31	4.37	2.50
24\19	9	3.39	5.93	2.93
27\10	9	3.87	5.66	2.17
10\34	10	3.28	5.08	2.53
10\107	10	3.44	6.10	2.82
10\187	10	3.47	5.33	2.78
10\248	10	3.47	5.29	2.87
11\185	11	3.21	4.64	1.78
11\20	11	3.21	5.93	3.13
11\350	11	3.29	4.25	2.83
11\170	11	3.36	6.56	2.21
Cornell 605		3.58	5.41	5.11
Corujinha		4.87	5.89	5.04

O sucesso da seleção recorrente foi avaliado por meio da estimativa do progresso genético. No caso de plantas autógamas, uma das alternativas para se estimar este progresso é a avaliação das melhores linhagens obtidas após cada ciclo seletivo.

O progresso genético foi estimado considerando as 4 melhores progênies, de cada um dos 3 ciclos, para a resistência ao mofo branco. O progresso genético estimado foi de -6,07% por ciclo, com um R^2 ajustado de 96,79%, e o sinal negativo indica que houve uma diminuição das notas de progresso da doença e, conseqüentemente, melhora na resistência ao fungo. Estes ganhos foram de maior magnitude do que os obtidos por Leite et al. (2016) que avaliaram os ciclos III até o ciclo VI e observaram ganho de -3,17% por ciclo em campo, e Dias, (2015) que avaliou as melhores progênies dos ciclos 0 até o ciclo IX e obteve ganho de -3,27% por ciclo em campo. Este progresso genético observado se torna bastante satisfatório quando se considera que na cultura do feijão é possível realizar até três safras por ano e que cada ciclo é realizado em apenas uma safra.

Este aumento na magnitude do progresso em ciclos mais avançados de seleção recorrente pode ser explicado pelo número diferente de progênies avaliadas em cada ciclo e que se encontravam em gerações de seleção também diferentes dentro de cada ciclo. Além disso, as

cultivares/linhagens incorporadas a partir do ciclo VII certamente contribuíram para aumentar a quantidade de alelos de resistência que, ao longo dos ciclos foram sendo incorporados pelas progênes selecionadas. É importante enfatizar que nos dois primeiros ciclos após a inclusão das cinco novas fontes de resistência (Ciclos VII e VIII), houve pequena redução da resistência da população, certamente devido ao aumento na frequência de alelos de suscetibilidade. Contudo, com o passar dos ciclos os alelos indesejáveis foram sendo eliminados e o ganho foi novamente aumentado nos ciclos subsequentes, em taxas bem superiores às dos ciclos iniciais. Esse fato confirma que as fontes inseridas contribuíram também com alelos de resistência, alguns em locos diferentes da população original, em razão da boa capacidade de combinação que elas apresentaram. Além disso, o ganho em resistência que reiniciou no ciclo IX (DIAS, 2015), se acelerou de forma acentuada nos ciclos X e XI, confirmando mais uma vez a grande eficiência da seleção recorrente em promover a recombinação de genes, o aumento da frequência de alelos favoráveis com a consequente redução dos desfavoráveis e a manutenção da variabilidade genética. Adicionalmente, pode-se inferir também que a introdução de novas fontes de resistência contribuiu de forma muito significativa para aumentar o ganho com a seleção recorrente.

Um dos fatores determinantes para o contínuo progresso genético obtido ao longo dos ciclos de seleção recorrente é a natureza quantitativa do caráter de resistência ao mofo branco. Numerosos estudos de QTLs para resistência ao mofo branco e de mecanismos de escape têm sido conduzidos em diferentes populações de feijão. Miklas et al., (2013) usaram os resultados desses estudos para construir um mapa comparativo composto de 27 QTLs para resistência ao mofo branco e 36 QTLs de mecanismos de escape da doença, que se mostraram ser amplamente distribuído através do genoma do feijão, sendo a maioria desses QTLs classificados como de pequeno efeito.

A seleção recorrente tem permitido o acúmulo de alelos favoráveis que podem estar associados a alguns destes QTLs, e neste caso além da resistência, as progênes selecionadas neste trabalho possuem grãos comerciais e algumas delas também possuem porte ereto que tende a minimizar o crescimento do patógeno, aumentando ainda mais a resistência de campo. Além disso, a ausência de cultivares comerciais adaptadas, com boa resistência ao mofo branco e com grãos que atendam às exigências do consumidor mostram a relevância deste programa.

4 CONCLUSÕES

A seleção recorrente foi eficiente para obtenção de progênies com alto nível de resistência ao mofo branco com grãos do tipo carioca e porte ereto.

Existe a possibilidade de se obter progênies adaptadas às regiões de cultivo do Sul de Minas Gerais com médias para resistência ao mofo branco semelhantes às fontes não adaptadas e com porte ereto e grão tipo carioca.

Além disso, há possibilidade de se obter ganhos adicionais com a seleção para a resistência ao mofo branco, porte e qualidade de grãos, devido à presença de variabilidade genética, mesmo após 11 ciclos de seleção recorrente.

5 REFERÊNCIAS

BONICONTRO B. F., et al. Genótipos De Feijão Com Resistência De Campo Ao Mofo branco. In: **11º CONAFE**, Iapar: Londrina, 2014.

CARNEIRO, F. F. **Estratégias visando a seleção recorrente de linhagens de feijão resistentes ao mofo branco**. 2012. 148 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

CHIPPS, T. J., et al. Relationship Between Oxalate, Oxalate Oxidase Activity, Oxalate Sensitivity, and White Mold Susceptibility in *Phaseolus coccineus*. **Phytopathology**. v. 95(3), p. 292–299, 2005.

DIAS, J. A. **Seleção recorrente em feijoeiro visando a resistência ao mofo branco**. 2015. 81 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. London: Longman Malaysia, 1996. 464 p.

GILMORE, B.; MYERS, J. R.; KEAN, D. Completion of testing of *Phaseolus coccineus* plant introductions (PIs) for white mold, *Sclerotinia sclerotiorum*, resistance. **Annu Rep Bean Improv Coop**. v. 45, p. 64–65, 2002.

HALLAUER, A. R. Recurrent selection in maize. **Plant Breeding**. New York, v. 9, p. 115-179, 1992.

HENDERSON, C. R. Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. **Biometrics**, Arlington, v. 31, n. 2, p. 423-447, June 1975.

KOLKMAN, J. M.; KELLY, J. D. QTL conferring resistance and avoidance to white mold in common bean. **Crop Science**, v. 43, p. 539-548, 2003.

LEITE, M. E., et al. Increasing the resistance of common bean to white mold through recurrent selection. **Scientia Agricola**, v. 73 (1), p. 71-78, 2016.

LYONS, M. E.; DICKSON, M. H.; HUNTER, J. E. Recurrent selection for resistance to white mold in Phaseolus species. **Journal American Soc. Hort. Science**. v. 112, n.1 p. 149-152, 1987.

MCCOY, S.; HIGGINS, B.; STEADMAN, J. R. Use of multi site screening to identify partial resistance to white mold in common bean in 2010. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**. v. 54, p. 130-131, 2011.

MENDES, F. F.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, Â. F. B. Eficiência do sistema de nove covas na seleção de progênies de feijoeiro tipo carioca para arquitetura ereta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 46, p. 1029-1034, 2011.

MENEZES JÚNIOR, J. A. N.de; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B. Seleção recorrente para três caracteres do feijoeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 4, p. 833-838, 2008.

MIKLAS, P. N. et al. Characterization of white mold disease avoidance in common bean. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 135, n. 3, p. 525–543, Jan. 2013.

PARK, S. O., et al. Mapping of QTL for resistance to white mold disease in common bean. **Crop Science**. v. 41, p. 1253-1262, 2001.

PATTERSON, H. D.; THOMPSON, R. Recovery of inter-block information when block sizes are unequal. **Biometrika**, London, v. 58, n. 3, p. 545-554, Dec. 1971.

PETZOLDT, R.; DICKSON, M. H. *Straw test* for resistance to white mold in beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 39, p. 142–143, 1996.

PIRES, L. P. M., et al. Recurrent mass selection for upright plant architecture in common bean. **Scientia Agricola**, v. 71 (3), p. 240-243, 2014.

RAMALHO, M. A. P. et al. **Aplicações da genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas**. Lavras: Editora da UFLA, 2012.

RAMALHO, M. A. P.; PIROLA, L. H.; ABREU, A. F. B. Alternativas na seleção de plantas de feijoeiro com porte ereto e grão tipo carioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 33, p. 1989-1994, 1998.

RESENDE, M. D. V.; DUARTE, J. B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesq Agropec Trop**. v. 37, p. 182-194, 2007.

SCHWARTZ, H. F.; SINGH, S. P. Breeding common bean for resistance to white mold: A review. **Crop Science**, v. 53, n. 5, p. 1832-1844, 2013.

SCHWARTZ, H. F.; STEADMAN, J. R.; COYNE, D. P. Influence of Phaseolus vulgaris blossoming characteristics and canopy structure upon reaction to Sclerotinia sclerotiorum. **Phytopathology**. v. 68, p. 465–470, 1978.

SILVA, M. G. M.; SANTOS, J. B.; ABREU, A. F. B. Seleção de famílias de feijoeiro com resistência a antracnose e mancha angular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 10, p. 1499-1506, 2006.

SILVA, P. H., et al. Reaction of common bean lines and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates. **Genetic and Molecular Research**, v. 13(4), p. 9138-9151, 2014.

SOULE, M. et al. Comparative QTL Map for White Mold Resistance in Common Bean, and Characterization of Partial Resistance in Dry Bean Lines VA19 and I9365-31. **Crop Science**, Madison, v. 51, n. 1, p. 123-139, 2011.

STATISTICAS ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS® statistical package**. Cary, 2007. Software.

TERÁN, H.; SINGH, S. P. Gamete selection for improving physiological resistance to white mold in common bean. **Euphytica**. v. 167(3), p. 271–280, 2009.

TERÁN, H.; SINGH, S. P. Recurrent selection for physiological resistance to white mould in dry bean. **Plant Breeding**, New York, v. 129, n. 3, p. 327-333, 2010a.

TERÁN, H.; SINGH, S. P. Gamete and recurrent selection for improving physiological resistance to white mold in common bean. **Can. J. Plant Sci.** v. 90, p. 153–162 2010b.

TU, J. C.; BEVERSDORF, W. D. Tolerance to white mold (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary) in EX RICO 23, a cultivar of white bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Can J Plant Sci.** v. 69, p. 65–69, 1982.

VITERI, D. M., et al. A new common bacterial blight resistance QTL in VAX 1 common bean and interaction of the new QTL, SAP6, and SU91 with bacterial strains. **Crop Science**. v. 54(4), p. 1598–1608, 2014.

6 APÊNDICE

Tabela 1A - Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos para os caracteres resistência ao mofo branco, porte e grãos avaliados na análise da $S_{0:1}$ do X ciclo de seleção recorrente.

Parâmetro	Mofo Branco	Porte	Grãos
Média	4,0226	5,5208	2,7108
σ_p^2	0,2102	0,2139	0,1221
LI – LS	0,1317 – 0,3877	0,1188 – 0,4939	0,0862 – 0,1863
σ_e^2	0,4040	0,5925	0,1279
LI – LS	0,3208 – 0,5245	0,4687 – 0,7730	0,1017 – 0,1659
h_a^2	0,5099	0,4193	0,6562
$r_{\hat{g}g}$	0,6969	0,6333	0,8023

σ_p^2 : variância genética entre as progênies de Feijão. σ_e^2 : variância residual. LI: limite inferior. LS: limite superior. h_a^2 : herdabilidade no sentido amplo. $r_{\hat{g}g}$: acurácia seletiva.

Tabela 2A - Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos para os caracteres resistência ao mofo branco, porte e grãos avaliados na análise da $S_{0:2}$ do X ciclo de seleção recorrente.

Parâmetro	Mofo Branco	Porte	Grãos
Média	3,5119	6,8571	2,7448
σ_p^2	0,3153	0,2647	0,1343
LI – LS	0,1945 – 0,5973	0,1679 – 0,6126	0,0886 – 0,2271
σ_e^2	0,3005	0,6390	0,0583
LI – LS	0,2240 – 0,4242	0,4836 – 0,9242	0,0439 – 0,0811
h_a^2	0,7589	0,5541	0,7736
$r_{\hat{g}g}$	0,8523	0,6396	0,8619

σ_p^2 : variância genética entre as progênies de Feijão. σ_e^2 : variância residual. LI: limite inferior. LS: limite superior. h_a^2 : herdabilidade no sentido amplo. $r_{\hat{g}g}$: acurácia seletiva.

CAPÍTULO 2

Publicado na revista Genetics and Molecular Research

Expression and validation of *PvPGIP* genes for resistance to white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.)

Running title: *PvPGIP* expression for resistance to white mold

R.C.C. Vasconcellos*, T.F.C Lima, C.N.Fernandes-Brum, A.Chalfun-Junior and J.B. Santos

Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

*Correspondence author: Renato Coelho de Castro Vasconcellos, Rua Salim Mansur, 299, Vila Rica, Lavras, MG. CEP: 37200-000, Brazil; Tel.: (31) 9206-6906; Fax: (35) 3829-1341; E-mail: renatoccv@hotmail.com

ABSTRACT

The interaction between polygalacturonase-inhibiting proteins (*PGIPs*), produced by plants, and endopolygalacturonases (*PGs*), produced by fungi, limits the destructive potential of *PGs* and can trigger plant defense responses. This study aimed to i) investigate variation in the expression of different common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes and its relationship with resistance to white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*); ii) determine the expression levels of *PvPGIP* genes at different time points after inoculation with white mold; and iii) investigate differences in *PvPGIP* gene expression inoculated with two white mold isolates with different levels of aggressiveness. Four bean lines were analyzed, including two lines from a recurrent selection for white mold (50/5 and 84/6), one resistant line that was not adapted to Brazilian conditions (Cornell 605), and one susceptible line (Corujinha). Gene expression was investigated at 0, 1, 2, 3, and 5 days after inoculation. The isolate UFLA 03 caused no significant difference in the relative expression of any gene examined, and was inefficient in discriminating among the genotypes. For the isolate UFLA 116, all of the genes were differentially expressed, as they were associated with resistance to white mold, and the expressions increased until the third day after inoculation. The 50/5 line was not significantly different from the Corujinha line for all of the genes analyzed. However, this line had a resistance level that was similar to that of Cornell 605, according to the straw test. Therefore, the incorporation of *PvPGIP* genes can increase the resistance of lines derived from recurrent selection.

Key words: *Sclerotinia sclerotiorum*; Polygalacturonase-inhibiting protein; Endopolygalacturonase; qPCR.

1 INTRODUCTION

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is significantly affected by pathogens that can cause a considerable loss in yield, and should therefore not be planted in certain regions and at particular periods of the year. White mold (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary) is one of the most important diseases that limit high bean yield.

Under favorable conditions, white mold can cause losses of up to 100% in the production of bean cultivars susceptible to the fungus. White mold occurs in South and North American countries, mainly the United States, Canada, Argentina, and Brazil (Schwartz and Singh, 2013). Currently, it is the most destructive disease in irrigated areas of Brazil, particularly in crops planted in the fall, winter, or spring because the temperatures are lower, consequently increasing the growth and spread of the fungus.

The integrated use of strategies to stop the advance of white mold in bean crops must combine various techniques, such as the use of fungicides, low plant density, the reduced use of irrigation and fertilizers, and the use of erect cultivars with an open canopy. These measures are useful in controlling the disease, but can also cause a reduction in yield and increase production costs, so the use of cultivars with partial resistance to the fungus, good cultivation practices and the use of fungicides, have been considered the most suitable for controlling and reducing the impact of the disease (Schwartz and Singh, 2013).

The strategy of using resistant cultivars is difficult to implement, mainly due to a lack of sources of resistance, partial resistance has moderate to low heritability, inaccuracy in the assessment of the disease, and the difficulty of introgressing quantitative trait loci (QTL) into adapted cultivars (Miklas, 2007). Most known sources of resistance to white mold are of Andean origin, or from a secondary gene pool, such as *P. coccineus* L. (Singh et al., 2009). It is important to identify sources of resistance in the Mesoamerican gene pool that are adapted to crop conditions in Brazilian soils and are commercially acceptable.

Because high resistance is only found in non-adapted sources and adapted lines have relatively low resistance levels, the transfer of resistance QTLs is of great importance. Given the complexity of the trait, the most efficient method of obtaining resistant and adapted plants is through recurrent selection, as it allows the use of various sources of resistance as parents and allows the gradual transfer of favorable alleles to their progeny over successive selection cycles.

Resistance to white mold involves mechanisms that are related to physiological resistance and escape. Among the genes that are involved in physiological resistance, specific

ones have a large effect and general ones minimize the damage caused by the pathogen, and/or impede the pathogen's progress in plant tissues (Leite et al., 2014). The latter include a gene family that synthesizes polygalacturonase-inhibiting proteins (*PGIPs*).

White mold produces a large number of molecules during the infection and colonization of plant tissues to overcome barriers such as cell walls. Among these molecules, enzymes that degrade the cell wall (cell wall-degrading enzymes, CWDEs) represent an important pathogenicity factor, and endopolygalacturonases (PGs) are one of the first CWDEs released during the infection process (Kalunke et al., 2011). Host plants produce *PGIPs* that recognize PGs, and prevent enzymatic action during invasion and the release of nutrients required for the growth of the pathogen (D'Ovidio et al., 2004a). Besides the inhibition of PGs, the interaction between PGs and *PGIPs* promotes the formation of oligogalacturonides, which are elicitors of a variety of defense responses (Cervone et al., 1989; Ridley et al., 2001; Ferrari et al., 2013).

PGIPs are cell wall glycoproteins that belong to the extracytoplasmic LRR (leucine-rich repeat proteins) superfamily (Jones and Jones, 1997). Genes that encode these proteins have been characterized in both monocotyledons and dicotyledons. Genomic analyses have shown that *PGIP* genes may exist as a single gene, for example in diploid wheat species (Di Giovanni et al., 2008), or are organized into gene families whose members are tandem-arranged and may vary from two, as in *Arabidopsis thaliana* (Ferrari et al., 2003), to 16, as in *Brassica napus* (Hegedus et al., 2008). The overexpression of *PGIP* genes in transgenic plants such as wheat, tomato, tobacco, and *A. thaliana* limits fungal colonization (Powell et al., 2000; Ferrari et al., 2003; Manfredini et al., 2005; Janni et al., 2008).

In beans, this gene family consists of four genes in a cluster (*PvPGIP1*, *PvPGIP2*, *PvPGIP3*, and *PvPGIP4*) that covers a 50 kb region in linkage group Pv02, which have a nucleotide sequence similarity greater than 80%. In the soybean (*Glycine max*), *GmPGIP3*, which is the most highly expressed gene of this family in the species, is phylogenetically grouped with *PvPGIP1* and *PvPGIP2*, suggesting that the duplication that originated the ancestors of *PvPGIP1/PvPGIP2* and *PvPGIP3/PvPGIP4* occurred before the separation of *Glycine* and *Phaseolus* (Kalunke et al., 2014). Among these genes, *PvPGIP2* is the most efficient in inhibiting the largest number of fungal PGs (D'Ovidio et al., 2004b, 2006; Manfredini et al., 2005). In addition, the highly conserved nature of the nucleotide sequence of this gene in various lines and species of *Phaseolus* indicates high adaptive significance (Farina et al., 2009).

Because of the important role that the *PGIP* gene family plays in limiting fungal colonization in plant tissues, and the consequent positive impact on bean yield and quality, the

goals of this study were: i) to investigate variation in the expression of different Andean- and Mesoamerican-source genotypes and its relationship with white mold resistance; ii) to determine the expression levels of *PvPGIP* genes at different days after inoculation with white mold; and iii) to investigate differences in *PvPGIP* gene expression between two white mold isolates with different levels of aggressiveness.

2 MATERIAL AND METHODS

Four bean lines were used, including two resistant lines derived from a recurrent selection for white mold with a Carioca grain type of Mesoamerican origin and adapted to growing conditions in southeastern Brazil (Leite et al., 2016), one non-adapted source of resistance (Cornell 605; Griffiths, 2009), and one susceptible to white mold as a control (Corujinha; Silva et al., 2014).

Two *S. sclerotiorum* isolates were used: UFLA 116, a highly aggressive isolate from Ijaci County, Minas Gerais, Brazil, and UFLA 03, a less aggressive isolate from Lambari, Minas Gerais, Brazil (Leite et al., 2016). Both isolates were obtained from the mycology collection of the Laboratory of Plant Disease Resistance, Biology Department, Federal University of Lavras, Brazil.

The sclerotia were superficially disinfected by consecutive immersion in 70% ethanol for 1 min and 20% sodium hypochlorite for 3 min, and washed three times in demineralized and sterile water. Subsequently, the fungus was grown in Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA). Chloramphenicol was added to the PDA medium (100 μ L chloramphenicol to 100 mL medium) and maintained in growth B.O.D (Biological Oxygen Demand) type chamber at 22°C for three days. The inoculum was grown again to obtain greater uniformity under the same conditions. Petri dishes that were completely covered with mycelium were used for the preparation of 200 μ L micropipette tips for subsequent inoculation.

The experiment was conducted with a completely randomized design with three replications. Seeds of each line were sown in pots containing 3.5 L sterile substrate, kept in a greenhouse, and regularly watered and fertilized according to the recommendations for the crop. Inoculation of the fungus was performed using the straw test method described by Terán et al. (2006) 30 days after seedling emergence. Two stems per plant were inoculated.

Samples were collected 24, 48, 72, and 120 h after inoculation (1, 2, 3, and 5 days after inoculation, DAI) by cutting the stem 2.5 cm from the inoculation point, and collected tissues

contained both infected and healthy regions. Agar discs without mycelium were inserted in the control plants (0 DAI), and samples were collected 24 h later. Samples were placed in 2.0 mL microcentrifuge tubes, immersed in liquid nitrogen, and stored in a freezer at -80°C until RNA extraction. Mean values of disease severity (Terán et al., 2006) for each time point and isolate inoculated in each line were subjected to an analysis of variance.

Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen) was used to extract total RNA following the manufacturer recommendations, with modifications. The samples were washed twice with NaCl and chloroform in order to increase the quality of the RNA, and were subsequently treated with DNase using a Turbo DNA-free™ kit (Ambion) to eliminate DNA residues. RNA integrity was checked on a 1% agarose gel and the samples were quantified using NanoVue v2.0.4 4282. Samples with high integrity and purity were used for cDNA synthesis using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). After cDNA synthesis, the samples were stored at -20°C.

The primers used were as follows: *PvPGIP1* (F, 5'-CGCCTCACCGGG AAGAT; R, 5'-TGTTCCGAGACAAGTCAACGAA), *PvPGIP2* (F, 5'-TTCGACGGCAACCGAATC; R, 5'-TGGTCATCGACGTAAACAGCT T), *PvPGIP3* (F, 5'-TCCTTCCCGAAGCAT TTCAC; R, 5'-GCGTCGCCGGTATATTGC), and *PvPGIP4* (F, 5'-TCCTTCCCGAAGCATTTCAC; R, 5'-GCCAGCGTCGTCGGAATAT). The fragment sizes were 70, 76, 84, and 106 bp, respectively.

Gene expression was analyzed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) with reactions containing 40 ng cDNA, 1.5 mM each primer, 7.5 µL SYBR® Green UDG Master Mix with ROX (Invitrogen), and 3 µL autoclaved and double-distilled water, which yielded a final volume of 13.5 µL per sample; technical triplicates were performed for each sample. The qPCR cycling conditions were as follows: 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C using a Rotor-Gene Kit (Qiagen). The data were confirmed with a melting curve using Rotor-Gene q Series Software (v.2.1.0). Relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Pfaffl, 2001), with α -actin (F, 5'-TGCATACGTTGGTGATGAGG; R, 5'-AGCCTTGGGGTTAAGAGGAG) and *insulin-degrading enzyme* (F, 5'-GCAACCAACCTTTCATCAGC; R, 5'-AGAAATGCCTCAACCCTTTG) as reference genes.

3 RESULTS

The experiment was conducted with high selective accuracy ($r_{gg}=0.95$). There were significant differences between lines, isolates, and time points, and the interaction between isolate and time, in white mold severity ($P \leq 0.01$) (Table 1). These differences were expected, because both susceptible and resistant lines were included in the experiment, as well as highly aggressive and less aggressive isolates. The isolate \times time interaction was significant because of the difference in disease severity between the lines inoculated with a highly aggressive isolate (UFLA 116) and those inoculated with a less aggressive isolate (UFLA 03).

There were no significant interactions between line and time, line and isolate, and line and isolate and time. This indicates that the responses of the lines and isolates were consistent over time, i.e., lines that were more resistant and isolates that were less aggressive exhibited lower severity scores over time.

Table 1. Analysis of variance results (F-test) for severity of white mold.

Source of variation	d.f.	Mean squares
Isolate	1	18.3750**
Replication	2	0.1250 ^{NS}
Line	3	2.9167**
Time	3	37.6944**
Line \times Time	9	0.3333 ^{NS}
Line \times Isolate	3	0.0694 ^{NS}
Isolate \times Time	3	2.0694**
Line \times Isolate \times Time	9	0.0972 ^{NS}
Error	62	0.2862

UFLA 03 inoculation resulted in low relative expression levels of all of the *PvPGIP* genes in all of the genotypes and at all time points, without any significant difference according to the Scott-Knott test at the 5% probability level between treatments, and was therefore inefficient in discriminating between bean genotypes for this gene family. However, UFLA 116 was able to distinguish between at least one treatment for each gene, indicating that all of the *PvPGIP* genes were differentially expressed and were associated with resistance to white mold, and increased until the third day after inoculation. Cornell 605 exhibited significantly higher

PvPGIP1 expression levels at 3 DAI with UFLA 116 than the other lines; there were no other significant differences between the lines (Figure 1).

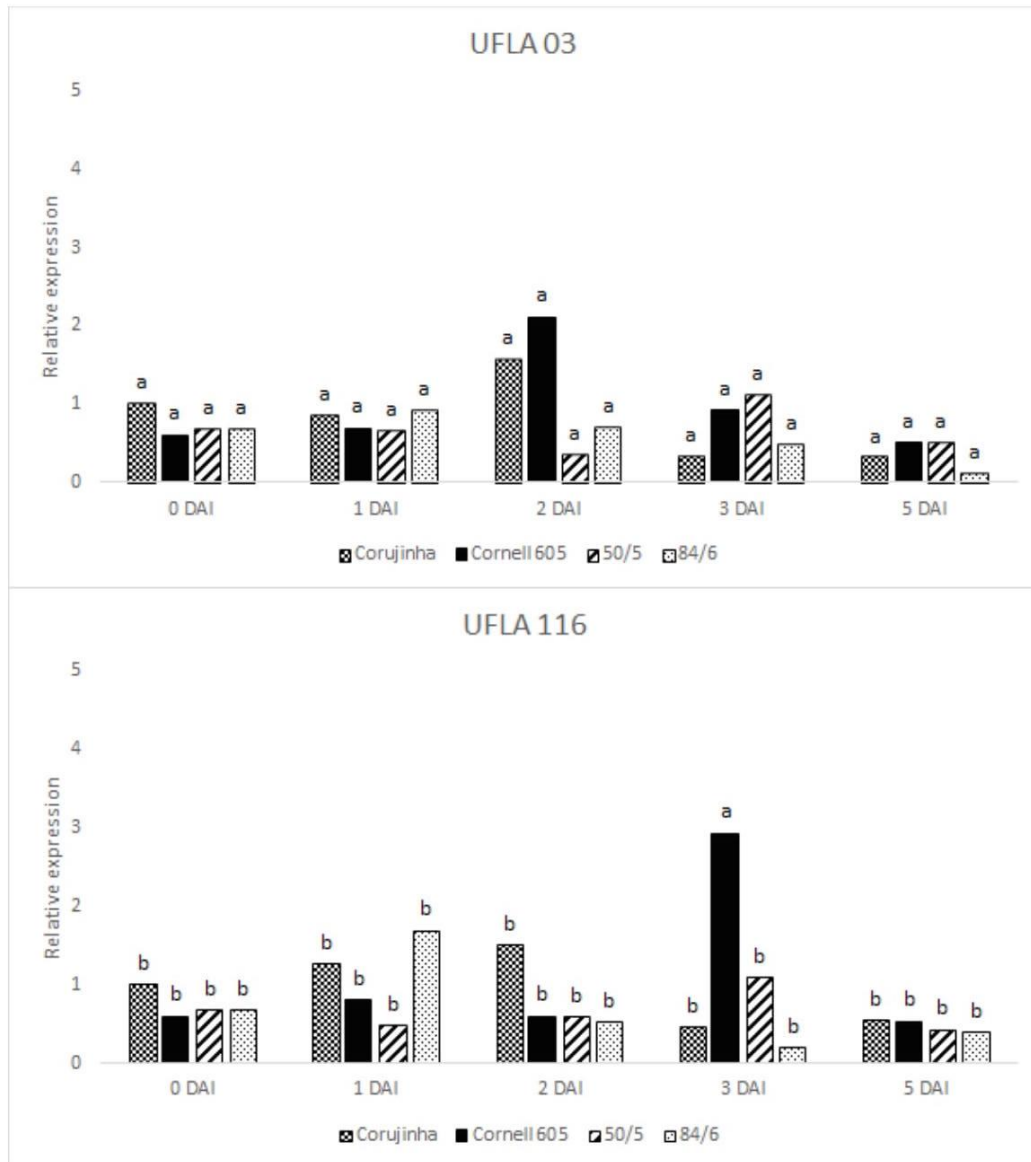


Figure 1. Relative expression levels of *PvPGIP1* in Corujinha, Cornell 605, 50/5, and 84/6 bean lines at 0, 1, 2, 3, and 5 days after inoculation (DAI) with UFLA 03 and UFLA 116 isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. Bean lines with different letters were significantly different at the 5% probability level according to the Scott-Knott test.

Cornell 605 also exhibited significantly higher *PvPGIP2* expression levels at 3 DAI with UFLA 116 than the other lines, with a relative expression level that was approximately

19-fold greater than that of the Corujinha line, which was the largest difference observed for all of the genes. The 84/6 line exhibited significantly higher *PvPGIP2* expression levels at 2 DAI with UFLA 116 than the other lines, but were lower than those observed in Cornell 605 at 3 DAI (Figure 2).

Cornell 605 exhibited significantly higher *PvPGIP3* expression levels at 3 DAI with UFLA 116 than the other lines, indicating that there was a peak in *PvPGIP1*, *PvPGIP2*, and *PvPGIP3* expression at 3 DAI and that Cornell 605 was superior to the other lines.

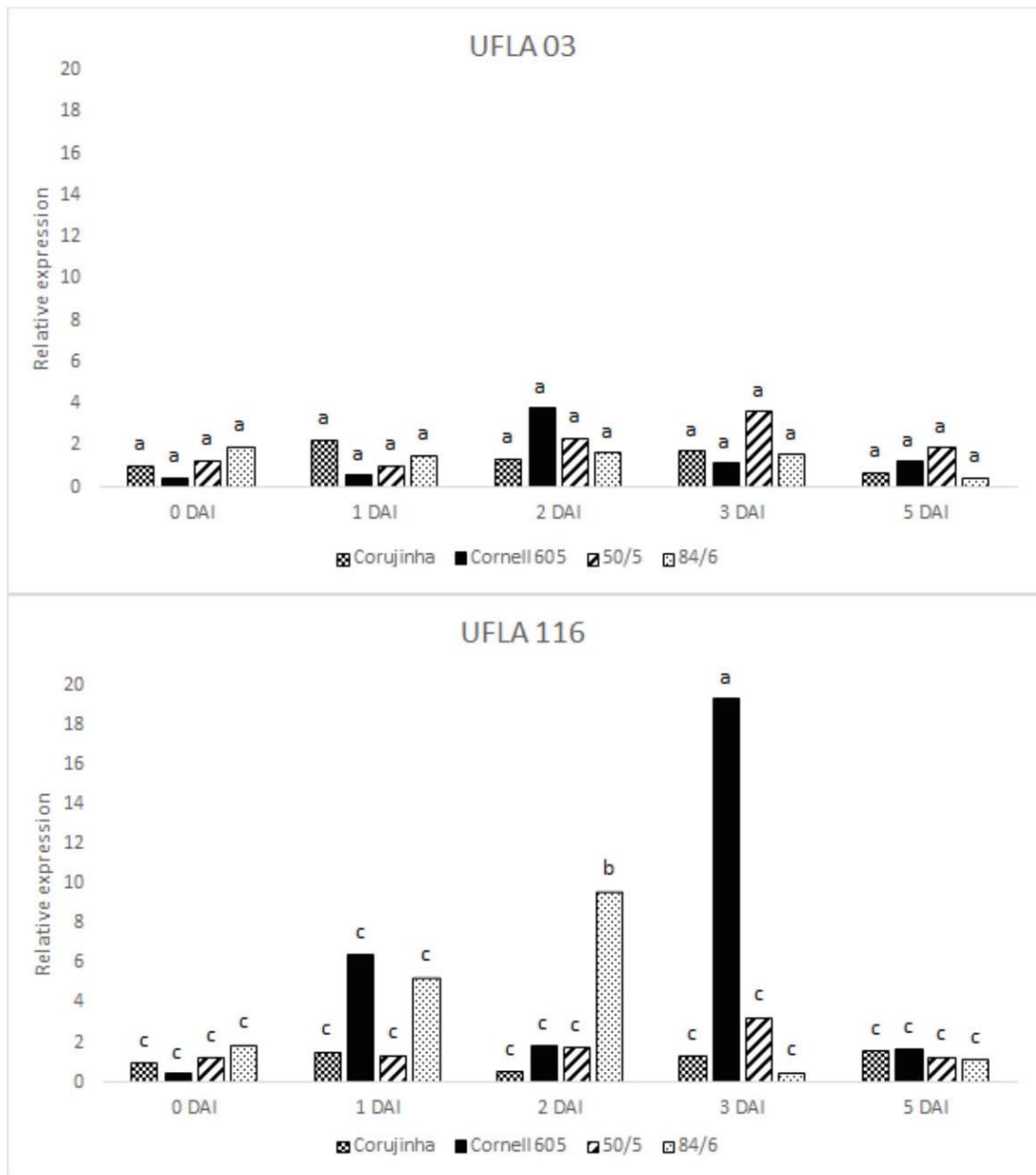


Figure 2. Relative expression levels of *PvPGIP2* in Corujinha, Cornell 605, 50/5, and 84/6 bean lines at 0, 1, 2, 3, and 5 days after inoculation (DAI) with UFLA 03 and UFLA 116 isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. Bean lines with different letters were significantly different at the 5% probability level according to the Scott-Knott test.

PvPGIP3 expression levels in Cornell 605 at 1, 2 and 3 DAI, and in 84/6 at 1 and 3 DAI, were also significantly higher than in the other lines (Figure 3).

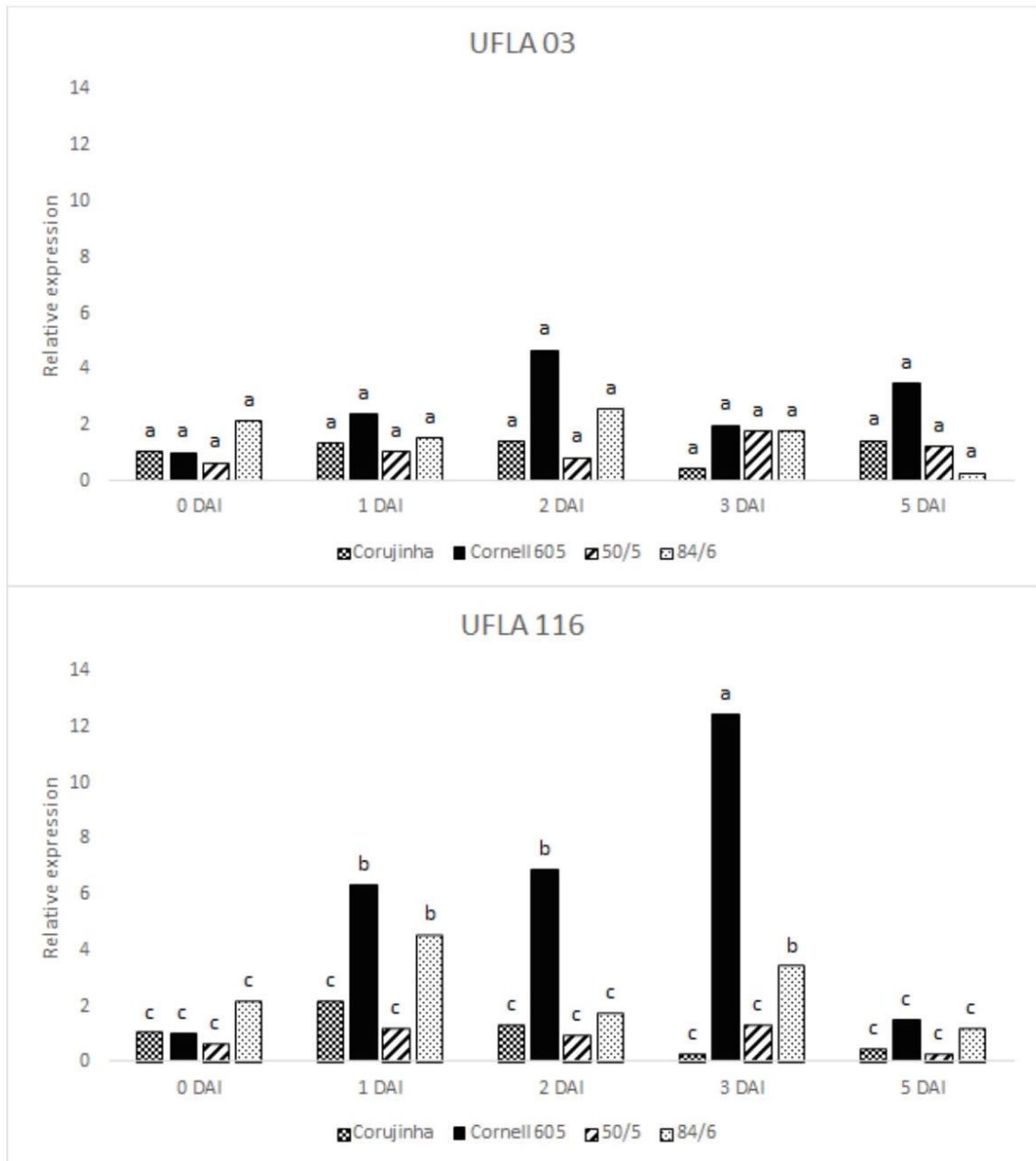


Figure 3. Relative expression levels of *PvPGIP3* in Corujinha, Cornell 605, 50/5, and 84/6 bean lines at 0, 1, 2, 3, and 5 days after inoculation (DAI) with UFLA 03 and UFLA 116 isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. Bean lines with different letters were significantly different at the 5% probability level according to the Scott-Knott test.

PvPGIP4 was more highly expressed in Cornell 605 at 1, 2, and 3 DAI with UFLA 116 than the other lines, confirming the superiority of this line in expressing genes of the *PvPGIP* family (Figure 4).

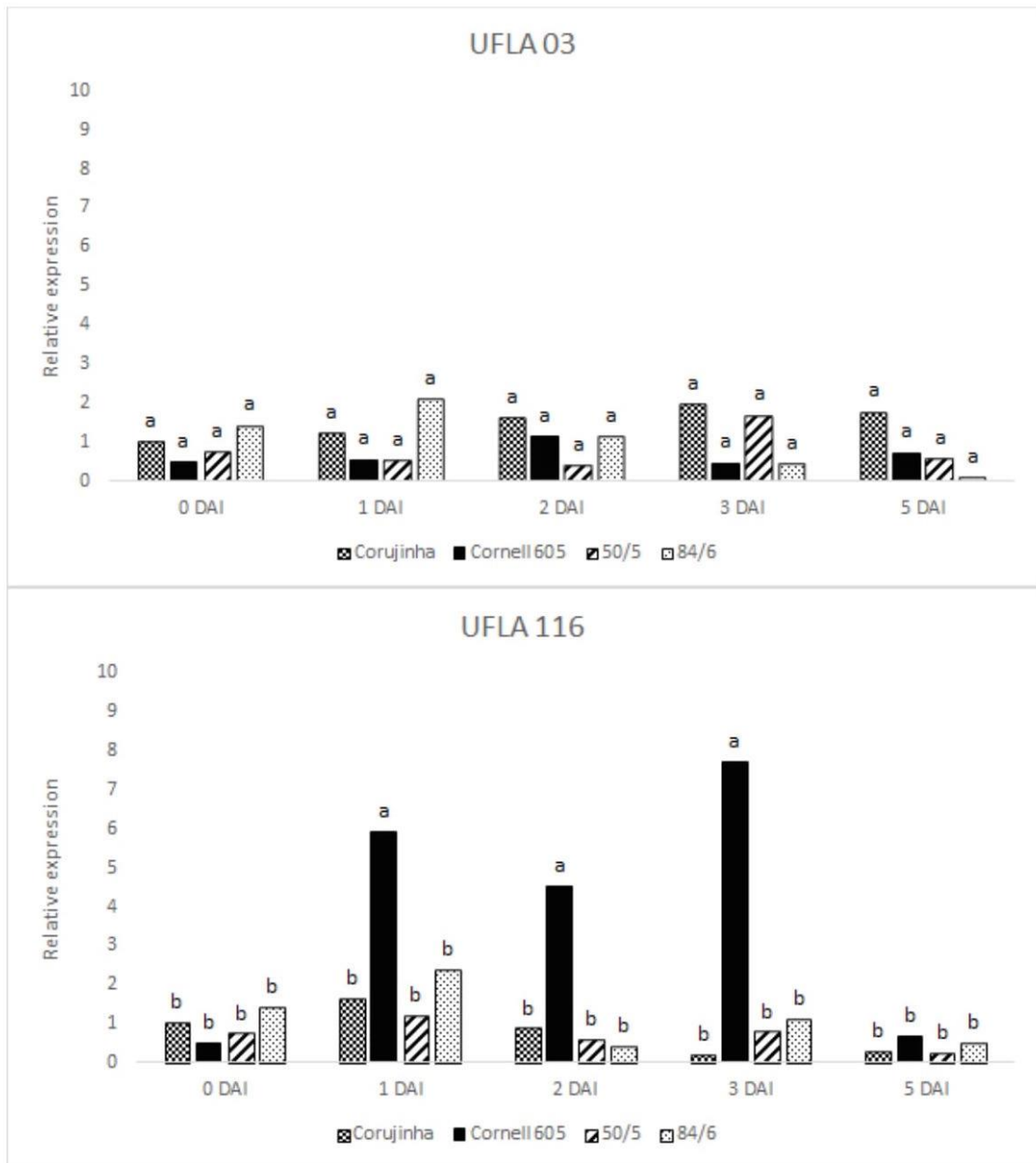


Figure 4. Relative expression levels of *PvPGIP4* in Corujinha, Cornell 605, 50/5, and 84/6 bean lines at 0, 1, 2, 3, and 5 days after inoculation (DAI) with UFLA 03 and UFLA 116 isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. Bean lines with different letters were significantly different at the 5% probability level according to the Scott-Knott test.

In all of the genotypes, there was a large reduction in relative gene expression at 5 DAI, with levels similar to those observed at 0 DAI, indicating that the genes of this family are only highly expressed during the early stages of disease development and plant defense.

For all of the genes analyzed, the 50/5 line was not significantly different from the susceptible line Corujinha, with low relative expression levels at all time points. The 50/5 line had an overall mean severity value of 2.70 and Corujinha had 3.08, which were not statistically different according to the Scott-Knott test at the 5% probability level. The lowest overall mean was obtained by line 84/6 (2.33), which was not statistically different to the non-adapted source of resistance, Cornell 605 (2.37), which had the highest relative expression level of all of the genes of the family, indicating that 84/6 may be considered a good source of resistance.

4 DISCUSSION

There is no full physiological resistance to white mold in beans, although some bean lines with partial resistance have been identified (Gonçalves and Santos, 2010). A few commercial lines have been developed by traditional breeding that have satisfactory partial resistance to white mold (Miklas, 2007). A high level of resistance has been reported in the secondary gene pool, such as in *P. coccineus* and some Andean lines of *P. vulgaris* (Myers et al., 2008).

Although four genes of the *PvPGIP* family exhibited high genotype sequence similarity (>80%), there was variation in the expression of these genes between the bean genotypes and days after inoculation, suggesting that each gene contributes differently and independently to plant defense. Indeed, there is evidence that these genes can differentially respond to elicitors such as salicylic acid and mechanical injury (D'Ovidio et al., 2004a). Therefore, at 0 DAI, they were probably already highly expressed, as they were collected 24 h after insertion of the agar disc, which caused mechanical damage in the collection region.

Differential expression of *PGIP* genes enables the plant to defend itself even under different environmental conditions, and against the attack of various types of PG produced by the pathogen. The effectiveness of *PGIP* genes in controlling diseases has been demonstrated in a wide variety of organisms, such as fungi, bacteria, and even insects (Kalunke et al., 2015).

PvPGIP2 is the most effective inhibitor of PGs (D'Ovidio et al., 2004a; Manfredini et al., 2005). This gene exhibited the highest relative expression level after inoculation in the present study. Oliveira et al. (2010) also reported high *PvPGIP2* expression in the Pérola bean

cultivar, but only at 2 DAI, and there was a decrease in its expression from 3 DAI. Transgenic plants that express *PvPGIP2* exhibit a reduction of about 35% in symptoms caused by *Botrytis cinerea* (Manfredini et al., 2005), and they exhibit reduced symptoms of *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, and *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina* attack (Borras-Hidalgo et al., 2012), suggesting that this gene plays a key role in plant innate immunity and contributes to basal resistance against different fungal species.

Tomato plants that express *PvPGIP1* do not exhibit any increase in resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *B. cinerea*, or *Alternaria solani*, possibly because of the inability of *PvPGIP1* to inhibit PGs that are secreted by these fungi (Desiderio et al., 1997).

Mkwaila et al. (2011) identified a QTL for the straw test method using a TW population (Tacana × PI318695) in the Pv02 linkage group near the BM143 marker. The authors suggest that this is the same QTL that was detected in Bunsu/Raven (Ender and Kelly, 2005) and G122/CO72548 populations (Maxwell et al., 2007), and designated it WM2.3^{BR,GC,TW}. According to Soule et al. (2011), this is the 10th QTL for disease resistance identified in this region, which also contains plant defense genes *PGIP*, chalcone synthase, and *PvPR-2*, which are proteins associated with plant defense responses, the genes of which are involved in plant defense against fungal pathogens, so they may be involved in host defense against *S. sclerotiorum*. Furthermore, QTLs for resistance to blight (*Thanatephorus cucumeris*) and common bacterial blight are found in the same region (Miklas et al., 2006).

Although the lines derived from recurrent selection (84/6 and 50/5) exhibit good resistance to white mold by the straw test method as observed in this study and by Leite et al. (2016), *PvPGIP* expression levels were still well below those demonstrated by Cornell 605, suggesting that the incorporation of lines with high expression levels of these genes in breeding programs can further improve the resistance levels of lines. Moreover, these genes were only expressed during the first days after inoculation with white mold, and from the fifth day after inoculation, all of the genes exhibited similar relative expression levels.

In general, both in the greenhouse and in the field, breeders perform only one assessment for white mold at 7 DAI, but Viteri et al. (2015) conducted analyses at 7, 14, 21, 28, and 35 DAI, and showed that until 21 DAI there are differences in the resistance of lines, suggesting that in addition to these genes, which are expressed during the early stages of plant defense, there must be genes that are expressed later. In addition, the two resistant lines derived from recurrent selection exhibit similar levels of resistance to that of Cornell 605 (Leite et al., 2016), although they express *PvPGIP* genes at a lower intensity. Therefore, other resistance mechanisms have been included in the phenotypic selection of these lines.

Although a high level of *PvPGIP* expression alone does not prevent white mold infection, it significantly limits the colonization of host tissue, and consequently improves grain yield and quality. Therefore, the cDNA sequences of these genes can be used for the development of molecular markers, which can subsequently be incorporated into recurrent selection programs for resistance to white mold.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have declared that no conflict of interest exists.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

5 REFERENCES

- Borras-Hidalgo O, Caprari C, Hernandez-Estevez I, De Lorenzo G, et al. (2012). A gene for plant protection: expression of a bean polygalacturonase inhibitor in tobacco confers a strong resistance against *Rhizoctonia solani* and two oomycetes. *Front. Plant Sci.* 3: 268.
- Cervone F, Hahn MG, De Lorenzo G, Darvill A, et al. (1989). Host-pathogen interactions: XXXIII. A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses. *Plant Physiol.* 90: 542-548.
- Desiderio A, Aracri B, Leckie F, Mattei B, et al. (1997). Polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) with different specificities are expressed in *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 852-860.
- Di Giovanni M, Cenci A, Janni M and D'Ovidio R (2008). A LTR copia retrotransposon and Mutator transposons interrupt *PGIP* genes in cultivated and wild wheats. *Theor. Appl. Genet.* 116: 859-867.
- D'Ovidio R, Mattei B, Roberti S and Bellincampi D (2004a). Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1696: 237-244.
- D'Ovidio R, Raiola A, Capodicasa C, Devoto A, et al. (2004b). Characterization of the complex locus of bean encoding polygalacturonase-inhibiting proteins reveals subfunctionalization for defense against fungi and insects. *Plant Physiol.* 135: 2424-2435.
- D'Ovidio R, Roberti S, Giovanni MD, Capodicasa C, et al. (2006). The characterization of the soybean polygalacturonase-inhibiting proteins (*PGIP*) gene family reveals that a single member is responsible for the activity detected in soybean tissues. *Planta* 224: 633-645.

Ender M and Kelly JD (2005). Identification of QTL associated with white mold resistance in common bean. *Crop Sci.* 45: 2482-2490.

Farina A, Rocchi V, Janni M, Benedettelli S, et al. (2009). The bean polygalacturonase-inhibiting protein 2 (PvPGIP2) is highly conserved in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm and related species. *Theor. Appl. Genet.* 118: 1371-1379.

Ferrari S, Savatin DV, Sicilia F, Gramegna G, et al. (2013). Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Front. Plant Sci.* 4: 49.

Ferrari S, Vairo D, Ausubel FM, Cervone F, et al. (2003). Tandemly duplicated *Arabidopsis* genes that encode polygalacturonase-inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection. *Plant Cell Online* 15: 93-106.

Gonçalves PRC and Santos JB dos (2010). Physiological resistance of common bean cultivars and lines to white mold based on oxalic acid reaction. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* 53: 236-237.

Griffiths PD (2009). Release of Cornell 601–606: common bean breeding lines with resistance to white mold. *Hortscience* 44: 463-465.

Hegedus DD, Li R, Buchwaldt L, Parkin I, et al. (2008). *Brassica napus* possesses an expanded set of polygalacturonase inhibitor protein genes that are differentially regulated in response to *Sclerotinia sclerotiorum* infection, wounding and defense hormone treatment. *Planta.* 228: 241–253.

Janni M, Sella L, Favaron F, Blechl AE, et al. (2008). The expression of a bean PGIP in transgenic wheat confers increased resistance to the fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21: 171-177.

Jones DA and Jones JDG (1997). The role of leucine-rich repeat proteins in plant defenses. *Adv. Bot. Res.* 24: 89-167.

Kalunke RM, Cenci A, Volpi C, O’Sullivan DM, et al. (2014). The PGIP family in soybean and three other legume species: evidence for a birth-and-death model of evolution. *BMC Plant Biol.* 14: 189.

Kalunke RM, Janni M, Sella L, David P, et al. (2011). Transcript analysis of the bean polygalacturonase-inhibiting protein gene family reveals that PvPGIP2 is expressed in the whole plant and is strongly induced by pathogen infection. *J. Plant Pathol.* 93: 141-148.

Kalunke RM, Tundo S, Benedetti M, Cervone F, et al. (2015). An update on polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein that protects crop plants against pathogens. *Front. Plant Sci.* 6: 146.

- Leite ME, Santos JB, Ribeiro Junior PM, Souza DA, et al. (2014). Biochemical responses associated with common bean defense against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 138: 391-404.
- Leite ME, Dias JA, Souza DAD, Alves FC, et al. (2016). Increasing the resistance of common bean to white mold through recurrent selection. *Sci. Agric.* 73: 71-78.
- Manfredini C, Sicilia F, Ferrari S, Pontiggia D, et al. (2005). Polygalacturonase-inhibiting protein 2 of *Phaseolus vulgaris* inhibits BcPG1, a polygalacturonase of *Botrytis cinerea* important for pathogenicity, and protects transgenic plants from infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 67: 108-115.
- Maxwell JJ, Brick MA, Byrne PF, Schwartz HF, et al. (2007). Quantitative trait loci linked to white mold resistance in common bean. *Crop Sci.* 47: 2285-2294.
- Miklas PN (2007). Marker-assisted backcrossing QTL for partial resistance to *Sclerotinia* white mold in dry bean. *Crop Sci.* 47: 935-942.
- Miklas PN, Kelly JD, Beebe SE and Blair MW (2006). Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical to MAS breeding. *Euphytica* 147: 105-131.
- Mkwaila W, Terpstra KA, Ender M and Kelly JD (2011). Identification of QTL for agronomic traits and resistance to white mold in wild and landrace germplasm of common bean. *Plant Breeding* 130: 665-672.
- Myers JR, Gilmore BS and Haggard JE (2008). Progress in characterization and transfer of white mold resistance from runner to common bean. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* 51: 80-81.
- Oliveira MB, Nascimento LB, Junior ML and Petrofeza S (2010). Characterization of the dry bean polygalacturonase-inhibiting protein (*PGIP*) gene family during *Sclerotinia sclerotiorum* (*Sclerotiniaceae*) infection. *Genet. Mol. Res.* 9: 994-1004.
- Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: e45.
- Powell ALT, van Kan J, ten Have A, Visser J, et al. (2000). Transgenic expression of pear *PGIP* in tomato limits fungal colonization. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 942-950.
- Ridley BL, O'Neill MA and Mohnen D (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57: 929-967.
- Schwartz HF and Singh SP (2013). Breeding common bean for resistance to white mold: a review. *Crop Sci.* 53: 1832-1844.
- Silva PH, Santos JB, Lima IA, Lara LA, et al. (2014). Reaction of common bean lines and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates. *Genet. Mol. Res.* 13: 9138-9151.
- Singh SP, Terán H, Schwartz HF, Otto K, et al. (2009). White mold-resistant interspecific common bean germplasm lines VCW 54 and VCW 55. *J. Plant Regist.* 3: 191-197.

Soule M, Porter L, Medina J, Santana GP, et al. (2011). Comparative QTL map for white mold resistance in common bean, and characterization of partial resistance in dry bean lines VA19 and I9365-3. *Crop Sci.* 51: 123-139.

Terán H, Lema M, Schwartz HF, Duncan R, et al. (2006). Modified Petzoldt and Dickson scale for white mold rating of common bean. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* 49: 115-116.

Viteri DM, Otto K, Terán H, Schwartz HF, et al. (2015). Use of four *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different aggressiveness, three inoculations per plant, and delayed multiple evaluations to select common beans with high levels of white mold resistance. *Euphytica* 204: 457-472.