



FERNANDA SOUZA LOPES

**SELEÇÃO RECORRENTE EM FEIJÃO VISANDO
RESISTÊNCIA AO MOFO BRANCO EM CASA DE
VEGETAÇÃO**

Lavras – MG

2017

FERNANDA SOUZA LOPES

**SELEÇÃO RECORRENTE EM FEIJÃO VISANDO RESISTÊNCIA
AO MOFO BRANCO EM CASA DE VEGETAÇÃO**

Dissertação 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 Mestre.

Professor Dr. João Bosco dos Santos
Orientador

**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).**

Lopes, Fernanda Souza.

Seleção recorrente em feijão visando resistência ao mofo
branco em casa de vegetação / Fernanda Souza Lopes. - 2017.
51 p. : il.

Orientador(a): João Bosco dos Santos.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Phaseolus vulgaris L. 2. Sclerotinia sclerotiorum. 3. Ganho
com a seleção. I. Santos, João Bosco dos. . II. Título.

FERNANDA SOUZA LOPES

**SELEÇÃO RECORRENTE EM FEIJÃO VISANDO RESISTÊNCIA AO MOFO
BRANCO EM CASA DE VEGETAÇÃO
RECURRENT SELECTION IN COMMON BEAN AIMING RESISTANCE TO
WHITE MOLD IN GREENHOUSE**

Dissertação 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 Mestre.

APROVADA em 20 de março de 2017.
Dr. Hudson Teixeira - EPAMIG
Dr. Welison Andrade Pereira - UFLA

Prof. Dr. João Bosco dos Santos
Orientador

**LAVRAS - MG
2017**

Aos meus pais e à toda minha família, que não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo amor, carinho, compreensão e apoio em todos os momentos.

Ao Gustavo pelo companheirismo, paciência e muito amor durante todos esses anos que estamos juntos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia.

Ao professor João Bosco, pelos ensinamentos transmitidos, paciência e por estar sempre presente e ajudando em todos experimentos realizados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas e todos os professores pelo conhecimento adquirido.

A todos os funcionários do DBI (Zélia, Rafa, Iron e o pessoal da limpeza, Lilian) e todos àqueles que contribuíram de certa forma.

Ao pessoal do laboratório que está sempre disposto a ajudar, tanto no laboratório quanto em experimentos de campo. Em especial ao Lama e a Gisele, que colocam ordem na “bagunça” e tornam nossa vida muito mais fácil.

Aos Apáticos e agregados, pelas risadas, pelo companheirismo e amizade, deixando nossos finais de semana de estudos mais leves.

Ao pessoal do GEN que está sempre disposto a ajudar e a contribuir para o nosso crescimento acadêmico.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos vocês, meus sinceros agradecimentos.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação.”

Simone de Beauvoir

RESUMO

O trabalho foi realizado com o objetivo de estimar o ganho com a seleção fenotípica em casa de vegetação no décimo segundo ciclo de seleção recorrente além de comparar a eficiência da seleção assistida por marcadores moleculares em relação à seleção fenotípica para a resistência do feijão ao mofo branco. Foi realizado o plantio de 900 plantas em casa de vegetação. Após quatro semanas, foi inoculado um isolado agressivo (isolado 27) de *Sclerotinia sclerotiorum* identificado em ensaios experimentais realizados na UFLA. Foram feitos dois inóculos por planta a 2,5 cm do nó, pelo método straw test. Uma semana após a inoculação, as plantas foram avaliadas por meio de uma escala diagramática de nove notas e as mais suscetíveis foram eliminadas. Em seguida as 79 progênies $S_{0:1}$ mais resistentes foram semeadas no campo juntamente com duas testemunhas, Corujinha (suscetível) e Cornell 605 (resistente), utilizando um delineamento látice simples 9 x 9 e foram inoculadas pelo método straw test e avaliadas novamente. As 21 melhores progênies $S_{0:2}$ foram semeadas no campo, juntamente com as progênies selecionadas dos ciclos IX, X, XI e as duas testemunhas em um látice triplo 6 x 6. A partir da avaliação em $S_{0:2}$, foi realizada uma análise de regressão linear e o progresso genético adquirido foi de 6,67% por ciclo, entre o ciclo IX e o ciclo XII. O ganho entre os ciclos XI e XII foi de 12,17% indicando maior eficiência da inoculação em casa de vegetação das plantas S_0 para se realizar a seleção massal. O ganho tanto com a seleção fenotípica quanto com a seleção assistida por marcadores foi calculado em $S_{0:1}$, sendo estes 16,15% e 5,05% respectivamente, indicando que a seleção fenotípica em condições controladas é mais eficiente. Foi estimada a eficiência da seleção assistida proposta por Hamblim e Zimmermann (1986), sendo esta 4,76%. Para os caracteres porte da planta e tipo de grão, a acurácia estimada foi mediana, porém o coeficiente de variação foi baixo, indicando que provavelmente a reduzida variabilidade genética entre as progênies, pode ter subestimado a acurácia e conseqüentemente a precisão experimental. A alta uniformidade genética não permitiu distinguir as progênies quanto à produtividade de grãos, no entanto, a avaliação do porte, peso e tipo de grãos, permitiu a seleção de progênies promissoras, com grãos tipo carioca, porte arbustivo e boa produtividade, aliado à acentuada resistência ao mofo branco.

Palavras-Chave: *Phaseolus vulgaris* L. *Sclerotinia sclerotiorum*. Ganho com a seleção. Seleção fenotípica. QTL. Seleção assistida por marcadores.

ABSTRACT

The research aims to estimate the selection gain of cycle XII of recurrent selection in greenhouse and to compare the efficiency of markers assisted selection (MAS) with phenotypic selection for white mold resistance. 900 plants were grown in greenhouse and in four weeks, the most aggressive isolate (isolate 27) of *Sclerotinia sclerotiorum* was inoculated. Two inocula were made per plant at 2.5 cm from the node, by the straw test procedure. One week after inoculation, the plants were evaluated by a diagrammatic scale and the most susceptible were eliminated. The 79 most resistant $S_{0:1}$ progenies were seeded in the field together with two controls, Corujinha (susceptible) and Cornell 605 (resistant), using a simple 9x9 lattice design and were inoculated by the straw test and evaluated again. The best 21 $S_{0:2}$ progenies were seeded in the field together with the best progenies of the cycles IX, X, XI and the two controls in a 6 x 6 triple lattice design. Considering the best progenies of the four cycles the genetic gain was 6.67% per cycle, although between the cycles XI and XII it was 12.17% indicating greater efficiency of the mass selection of the plants S_0 in greenhouse. The gain of phenotypic selection among the $S_{0:1}$ progenies of the cycle XII was 16.15% and using the marker assisted selection it was 5.05%, indicating that phenotypic selection is more efficient. Therefore, the efficiency of MAS was only 4.76%. Considering the plant architecture and grain type, the estimated accuracy was average, but the coefficient of variation was low, indicating that probably the low genetic variability among the progenies may have underestimated the accuracy and consequently the accuracy. The high genetic uniformity did not allow to distinguish the progenies for grain yield, however, the evaluation of the architecture, weight and type of grains allowed the selection of promising progenies, with carioca grain type, up right architecture, good productivity and high resistance to white mold.

Key words: *Phaseolus vulgaris* L. *Sclerotinia sclerotiorum*. Gain with the selection. Phenotypic selection. QTL. Selection assisted by markers.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 A cultura do feijão	13
2.2 Porte e Tipo de Grão	13
2.3 Mofo Branco	14
2.4 Avaliação para resistência ao mofo branco pelos métodos de straw test e ácido oxálico	16
2.5 Seleção Recorrente	17
2.6 Controle genético da resistência ao Mofo Branco	19
2.7 Marcadores moleculares para resistência de plantas	20
2.8 Seleção assistida por marcadores para resistência ao mofo branco	21
3 MATERIAL E MÉTODO	23
3.1 Local	23
3.2 Material Genético	23
3.3 Preparo do inóculo, inoculação e avaliação das plantas S ₀	24
3.4 Inoculação e avaliação das progênies no campo	25
3.5 Extração de DNA	26
3.6 Análises Estatísticas	27
3.7 Validação dos marcadores	28
3.8 Estimativa do Ganho com a Seleção	28
3.9 Eficiência da seleção assistida por marcadores	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Avaliação da resistência ao mofo branco de progênies S _{0:1} pelo straw test	31
4.2 Avaliação da resistência ao mofo branco de progênies S _{0:2} pelo straw test	31
4.3 Eficiência da seleção assistida por marcadores	35
4.4 Avaliação do porte, tipo de grão e peso	39
5 CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICE	50

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (BARBOSA; GONZAGA, 2012). Além da importância econômica, o cultivo do feijoeiro apresenta importância social, uma vez que o seu cultivo é feito em grande parte por pequenos produtores. A cultura do feijão é altamente influenciada pela ação de organismos fitopatogênicos que causam grandes danos. Entre as doenças que mais têm limitado a produção nas áreas irrigadas, está o mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*).

Para conter o avanço desse patógeno, é necessário a utilização de fungicidas combinados a técnicas de manejo, tais como: diminuição na densidade populacional de plantas e redução no uso de irrigação e fertilizantes. Plantas com arquitetura mais ereta e um dossel mais aberto também auxiliam na contenção do mofo branco. Contrariando o pensamento comum, segundo Vieira et al. (2012) a aplicação de fungicida aliada à baixa densidade populacional de plantas e a utilização de espaçamento entre fileiras de 0,50 m maximiza a produtividade.

Um método bastante utilizado para realizar o melhoramento do feijão para esse tipo de patógeno é a seleção recorrente, baseada em ciclos sucessivos de inter cruzamentos, avaliação e seleção de indivíduos superiores. Adicionalmente, a seleção assistida por marcadores moleculares pode aumentar o ganho com a seleção, especialmente a seleção massal em S_0 , pois evita os problemas associados à seleção fenotípica.

A resistência parcial do feijão ao mofo branco é um caráter quantitativo com moderada a baixa herdabilidade, além de sofrer expressiva influência ambiental nos caracteres morfológicos, portanto, o melhoramento convencional sozinho apresenta falhas, devido à dificuldade de identificar as plantas que contenham o maior número de alelos desejados. Usando seleção fenotípica convencional, cada característica deve ser avaliada separadamente e muitas vezes é necessária uma fenotipagem destrutiva das amostras. Assim, marcadores de DNA podem facilitar a seleção, por serem não-destrutivos e marcar vários genes (QTLs – Quantitative Trait Loci). Além disto, os marcadores podem ser testados usando uma única amostra de DNA, na fase jovem da planta e sem necessidade de várias avaliações. Entretanto, a interação de QTLs por ambientes e ineficiência de identificação dos mesmos pelos marcadores podem tornar a seleção assistida pouco útil. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi comparar a eficiência da seleção assistida por marcadores moleculares em relação à seleção

fenotípica para a resistência do feijão ao mofo branco, além de estimar o ganho com a seleção fenotípica em casa de vegetação no décimo segundo ciclo de seleção recorrente.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do feijão

O feijão é a leguminosa mais importante no fornecimento de nutrientes diretamente consumidos, além de participar da dieta proteica em países da América Latina, África, Oriente Médio e do Mediterrâneo. Essa leguminosa geralmente é cultivada em áreas mais chuvosas, apesar de estar sendo produzida igualmente em regiões onde a seca é endêmica e a irrigação é escassa, como no Nordeste do Brasil, litoral do Peru, planalto central e norte do México, em baixas altitudes do leste da África, bem como nas planícies do oeste dos Estados Unidos e no Canadá (CORTÉS et al., 2012).

O cultivo do feijão no Brasil é realizado ao longo do ano e em várias regiões do país. A produtividade do grão no país, embora crescente, ainda é pequena, devido a inúmeros fatores que contribuem para esta redução. De acordo com Miklas et al. (2006) essa diminuição está relacionada aos estresses bióticos e abióticos sofridos pelo feijoeiro. Entre os estresses bióticos a ocorrência de pragas e doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides são os principais exemplos sofridos pela cultura (BARBOSA; GONZAGA, 2012). Entre as várias condições de cultivo há aquelas que favorecem o desenvolvimento do mofo branco, doença causada por um fungo que permanece no solo em estrutura de resistência por longo tempo e causa sérios danos à cultura.

Em relação à resistência às doenças, o mofo branco se destaca principalmente nas áreas irrigadas (ANTONIO, 2008). Para se realizar o melhoramento do feijão, além de transferir alelos de resistência, deve-se observar a superioridade da cultivar em vários aspectos, tais como: porte, produtividade e tipo de grão.

2.2 Porte e Tipo de Grão

O porte é considerado uma das características mais importantes da planta, pois ele é essencial na descrição das cultivares e na escolha da forma mais adequada para o plantio nas mais variadas condições de cultivo. A arquitetura da planta é um caráter complexo e um conjunto de caracteres contribui para que a planta seja ereta ou prostrada e estão intimamente relacionados no controle de vários estresses bióticos: altura da planta, tamanho dos grãos, hábito de florescimento, comprimento da haste principal, número e comprimento dos entrenós na haste principal, *Stay Green* entre outros (LEITE, 2014).

Outra importante característica que está associada à arquitetura da planta é a produção de grãos e em geral, plantas eretas também são menos produtivas que cultivares prostradas, sendo recomendado o plantio mais adensado das cultivares eretas (CARVALHO et al., 2001). Porém, com a utilização dessa prática, uma das principais vantagens do porte ereto, que é a redução da severidade de doenças é perdido (MIKLAS et al. 2013). Então a melhor alternativa é a obtenção de cultivares eretas e produtivas.

O tipo de planta do feijoeiro depende principalmente do hábito de crescimento, do comprimento dos internódios e da capacidade ou não de emitir guias. Em relação ao hábito de crescimento as plantas são classificadas em quatro tipos: as plantas do tipo I, que caracterizam-se pelo hábito de crescimento determinado, arbustivo, com ramificações eretas e fechadas e possuem internódios mais curtos; as plantas do tipo II possuem hábito de crescimento indeterminado, arbustivo, o caule é ereto, as ramificações são mais fechadas e em menor número e apresentam guia curta; o tipo III tem hábito de crescimento indeterminado, prostrado ou semiprostrado com ramificações bem desenvolvidas abertas e guia longa; e o tipo IV tem hábito de crescimento indeterminado e com grande capacidade trepadora e forte dominância apical (VIEIRA et al., 2001).

Outro caráter de grande importância no melhoramento do feijão é o tipo de grão. Sabe-se, que o feijoeiro apresenta uma alta variabilidade para cor do grão devido à alta complexidade da herança do caráter, existindo mais de 20 genes envolvidos na cor do tegumento segundo Bassett (2004). O feijão carioca é o preferido pelos consumidores, o que representa cerca de 79% dos grãos consumidos no Brasil (CARNEIRO et al., 2012b). De acordo com Mendes; Abreu (2012) as linhagens mais recentes do tipo Carioca, possuem uma série de características favoráveis, além de alta produtividade.

2.3 Mofo Branco

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é o causador da doença conhecida como mofo branco. É um patógeno habitante do solo, que afeta muitas culturas, incluindo o *Phaseolus vulgaris* L. Esse fungo possui estruturas de resistência que garantem a sua sobrevivência em ambientes desfavoráveis chamadas de escleródios. Os escleródios sobrevivem no solo até oito anos e variam de forma e tamanho (ADAMS e AYERS, 1979).

Existem três fases de desenvolvimento do escleródio: (I) a iniciação (agregação de hifas de modo a formar uma massa branca), (II) desenvolvimento (crescimento de hifas aumentando o tamanho de agregação), e (III) maturação (delimitação da superfície, deposição de melanina

em células periféricas da casca, e consolidação interna). Há uma grande lista de fatores ambientais e nutricionais que influenciam no desenvolvimento dos escleródios, tais como: os nutrientes do substrato no qual o escleródio é formado, a idade e tamanho dos escleródios, os fatores ambientais (umidade, temperatura, luz, pH do solo e aeração), a profundidade na qual o escleródio se encontra no solo e o tipo de solo (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

Clima com alta umidade e temperaturas amenas são favoráveis ao crescimento do mofo branco. Uma lavoura de feijão com o clima favorável ao fungo, pode sofrer perdas de 30% ou até mesmo 100 %, caso nenhuma medida seja tomada. A flor morta é a fonte primária de energia, servindo de alimento para o fungo no início da infecção (OLIVEIRA, 2005). Após se instalar no hospedeiro, a infecção pode se espalhar para outras plantas por meio do contato planta a planta (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

O fungo usualmente causa lesões aquosas que se expandem rapidamente nos tecidos do hospedeiro. O patógeno causa necrose foliar invadindo os pecíolos e posteriormente as hastes 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).

Os métodos de controle do mofo branco são limitados e por essa razão, precisam ser tomados em conjunto para aumentar sua eficiência. Primeiro, deve-se evitar a entrada do patógeno em áreas não infestadas, pois, uma vez presente, é muito difícil erradicá-lo. É necessário utilizar sementes sadias e tratadas com fungicidas. Deve-se também realizar a limpeza dos equipamentos agrícolas utilizados, principalmente no caso de terem sido usados em áreas onde a doença já tenha sido constatada (BARBOSA; GONZAGA, 2012). Outra medida de controle é o uso de fungicidas quando a doença já está presente na área, porém, além de oneroso, apresenta a desvantagem do risco à saúde, principalmente do agricultor, além de nem sempre ser eficiente. Adicionalmente, o uso de cultivares resistentes tem sido considerado uma das medidas preferidas por praticamente não onerar o custo de produção. Embora a resistência sozinha, em geral, não consiga controlar a doença, principalmente nas áreas mais infestadas pelo fungo, ela torna o controle da doença mais eficiente, quando utilizada em conjunto com outras medidas.

Existe 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 (MIKLAS et al., 2001 a; SOULE et al., 2011). A resistência genética está restrita a algumas cultivares de feijão

mesoamericano, como a cultivar Ex-Rico 23 e cultivares andinas como A 195, G 122 e Cornell 605 (MIKLAS et al., 2001b).

Os níveis mais altos de resistência são encontrados apenas em pool gênico secundário, como *P. coccineus* L. (SINGH et al., 2014). Porém, estas fontes de resistência não estão adaptadas às condições climáticas brasileiras, além de não apresentarem as características aceitas pelo mercado nacional. Já se sabe que algumas cultivares/linhagens com grãos do tipo carioca e adaptadas às condições do centro sul do Brasil, apresentam nível baixo de resistência (GONÇALVES; SANTOS, 2010).

A resistência ao mofo branco é devida não só a características intrínsecas do genótipo, denominada de resistência fisiológica, como também às características da planta como hábito de crescimento arbustivo, que reduzem o desenvolvimento da doença e correspondem aos mecanismos de escape (MIKLAS et al., 2013).

2.4 Avaliação para resistência ao mofo branco pelos métodos de straw test e ácido oxálico

Existem vários métodos para identificar a resistência fisiológica do feijão ao fungo, como: (I) utilização de campos com histórico da doença, (II) métodos de inoculação direta em planta intacta, (III) métodos de inoculação direta em órgãos isolados da planta e (IV) métodos indiretos. O método direto em planta intacta consiste em infectar a planta inteira com o fungo. Para este método direto, existe o Straw test ou teste do canudo, que é considerado o mais eficiente para a avaliação da resistência fisiológica, além de não ser destrutivo, permitindo o avanço de programas de melhoramento para obtenção de progênies resistentes (PETZOLDT & DICKSON, 1996). Neste método, um disco de agar com micélio do fungo crescido é inserido na haste cortada da planta, de três a cinco semanas após a semeadura, com auxílio de ponteiros plásticas de micropipetas, para que o fungo infecte a planta e após um período de seis a oito dias realiza-se a avaliação (SINGH; TERÁN, 2008). De acordo com Miklas et al. (2001a), o método de straw test é um procedimento simples para avaliar a resistência fisiológica no campo ou em casa de vegetação (principalmente no tecido do caule).

Outro método utilizado para verificar a resistência ao mofo branco é o que utiliza uma solução de ácido oxálico. Observou-se que *S. sclerotiorum* produz ácido oxálico durante o crescimento *in vitro* e *in planta*. Esse fator de virulência varia de acordo com os diferentes isolados de *S. sclerotiorum* produzindo diferentes níveis de oxalatos. Os mutantes deficientes na capacidade de produzir ácido oxálico não são patogênicos e não conseguem produzir escleródios (ROLLINS; DICKMAN, 2001). A evidência de que *S. sclerotiorum* utiliza ácido

oxálico para invadir a planta de feijão levou ao desenvolvimento desse método de avaliação indireta de resistência com base na reação da planta quando colocada em solução de ácido oxálico sem a raiz (KOLKMAN; KELLY, 2000). Uma vantagem deste procedimento é a identificação da resistência fisiológica, sem interferência de outros mecanismos de resistência (ANTONIO et al., 2008). Além desta vantagem, observa-se outros pontos positivos deste método, tais como: determinação da resistência fisiológica em experimentos realizados em casa de vegetação; germoplasmas fotossensíveis não adaptados podem ser testados para a resistência fisiológica; um grande número de linhas pode ser avaliado em um período relativamente curto; a imersão das mudas cortadas em uma solução comum de oxalato reduz a variabilidade que pode ser observada quando se usa micélio de *S. sclerotiorum*; a variabilidade inerente ao uso de um único isolado para o teste é reduzida (KOLKMAN; KELLY, 2000).

Tem sido verificada uma ampla variabilidade de reação ao ácido oxálico em feijão (GONÇALVES e SANTOS 2010) e vários QTLs de resistência já foram identificados mediante a medição da severidade da doença, indiretamente, por meio do ácido oxálico (LARA et al. 2015).

De acordo com Carvalho et al. (2013) os métodos de straw test e do ácido oxálico devem ser realizados em conjunto, pois podem selecionar progênies portadoras de diferentes mecanismos de resistência ao mofo branco, em razão dos resultados obtidos com os dois métodos apresentarem correlação baixa ou nula.

2.5 Seleção Recorrente

A maioria dos caracteres de interesse agrônomo com os quais os melhoristas trabalham é controlada por inúmeros genes. Dessa forma, encontrar um indivíduo com todos os alelos favoráveis torna-se uma tarefa quase impossível de ser realizada, sendo necessária a avaliação de um grande número de progênies, inviabilizando a realização da seleção (RAMALHO et al., 2012). Portanto, o melhoramento genético deve ser realizado por meio de sucessivos ciclos de seleção.

Segundo Geraldi (2005) a seleção recorrente é um processo cíclico de seleção de indivíduos e/ou progênies superiores de uma população, seguida pela recombinação dos selecionados para formar uma nova população. Esse processo visa aumentar a frequência de alelos favoráveis gradativamente.

O processo de seleção recorrente é constituído de três etapas: obtenção da população segregante, avaliação e seleção das progênies e recombinação das melhores progênies para

formar o próximo ciclo. A seleção recorrente possui vantagens tais como: a obtenção de maior variabilidade genética pelo intercruzamento de múltiplos genitores; a oportunidade para a ocorrência de recombinações, devido aos intercruzamentos sucessivos e o aumento acumulativo da frequência de alelos favoráveis além da facilidade para a incorporação de germoplasma exótico na população (GERALDI, 1997).

A seleção recorrente foi proposta inicialmente para as plantas alógamas na década de 1940, no melhoramento do milho (HALLAUER, 1992). Posteriormente, foi adotada para culturas autógamas. O que se espera ao realizar a seleção recorrente, é um aumento na média do caráter que está sofrendo a seleção, mantendo sua variabilidade genética para progressos futuros (HALLAUER, 1992). Na literatura são descritos alguns argumentos para se realizar a seleção recorrente, um deles apresentado por Bernardo (2002), que utilizou o exemplo da seleção recorrente para estudar o teor de óleo e proteína no milho iniciado em 1896. Após 90 ciclos seletivos, analisando 7000 espigas de milho, observou-se que o ganho para óleo foi de 22 desvios aditivos e de 26 para proteína. Se as 7000 espigas fossem avaliadas em C_0 e a melhor espiga selecionada, o ganho com a seleção seria de apenas 3,6 desvios aditivos em relação à média de C_0 , mesmo considerando a herdabilidade igual a 1. Através desses resultados pode-se observar o poder da seleção recorrente.

A seleção recorrente pode ser realizada através da seleção fenotípica ou massal, realizando uma seleção de indivíduos, sendo esta, aconselhável para caracteres de alta herdabilidade, pois a seleção recorrente fenotípica baseia-se apenas no fenótipo, com isso, indivíduos com genótipos não desejáveis podem ser selecionados, reduzindo a eficiência da seleção. Nesse método, os melhores indivíduos são selecionados e intercruzados após uma avaliação do fenótipo da população. As sementes dos indivíduos selecionados são colhidas e utilizadas para formar a população que será submetida a um novo ciclo de seleção. Os ciclos são repetidos até que seja obtido um comportamento desejado. A seleção recorrente também pode ser realizada através da avaliação de famílias, utilizando populações estruturadas em famílias de irmãos germanos, meios-irmãos ou endógamas (RAMALHO et al., 2012).

A seleção baseada na avaliação de progênes permite ao melhorista fazer as avaliações em experimentos com mais de uma repetição e em locais diferentes. Este tipo de avaliação estima com maior precisão os valores genotípicos, já que as contribuições dos efeitos ambientais, residuais e da interação genótipos por ambientes são reduzidas (ALVES, 2012).

No feijoeiro a seleção recorrente tem sido bastante utilizada na forma de dialelos circulantes, onde cada genitor participa de dois cruzamentos, reduzindo assim o número de cruzamentos realizados (BEARZOTI, 1997). A macho esterilidade também pode ser utilizada

para conduzir um programa de seleção, porém existem certas dificuldades, tais como: a não dispersão natural do pólen, além da dificuldade na identificação e a manutenção de plantas macho estéreis (FREITAS, 2012).

A seleção recorrente para mofo branco, tem sido bem-sucedida: os autores Lyon, Dickson e Hunter (1987), utilizando cultivares de espécies *Phaseolus vulgaris* e *Phaseolus coccineus*, obtiveram ganho de 31% do primeiro ao segundo ciclo de seleção. Já esta seleção dentro da espécie de *P. vulgaris*, realizada por Leite et al. (2014), obteve ganhos com a seleção para o mofo branco de 3,44% por ciclo considerando os ciclos III ao VI, sendo 10,32% ao ano.

2.6 Controle genético da resistência ao Mofo Branco

A resistência ao mofo branco tanto fisiológica, que consiste na resistência intrínseca da planta, como a evasão, que corresponde aos fenótipos de vários caracteres, principalmente os relacionados à arquitetura que desfavorecem o desenvolvimento da doença, implicam que o controle genético da resistência seja bastante complexo. Adicionalmente, as principais fontes de resistência genética ao patógeno estão restritas a algumas cultivares exóticas e não adaptadas ao Brasil, as quais, embora com potencial de uso nos programas de melhoramento, não apresentam possibilidades de utilização direta pelos produtores. Portanto, o uso dessas fontes de resistência não adaptadas, faz com que seja necessário realizar retrocruzamentos com as linhagens elites (CARNEIRO et al., 2011).

O controle genético da resistência tem sido verificado na maioria dos casos utilizando-se tanto a reação do feijão ao ácido oxálico, quanto a partir da inoculação por meio do straw test e é tipicamente um caráter quantitativo (ANTÔNIO et al. 2008; CARNEIRO et al. 2011; LARA, 2013).

O melhoramento de cultivares com uma arquitetura mais ereta e menor acamamento contribuem para criar um dossel mais aberto, dificultando o desenvolvimento da doença, pois permitem maior circulação do ar e insolação e o menor contato das folhas e das vagens com os restos de cultura na superfície do solo, amenizando o problema (MIKLAS et al., 2001a). Medidas como o plantio menos adensado das plantas, espaçamento entre fileiras normalmente utilizado (0,50 m) aliado à aplicação de fungicidas também são eficientes, além de maximizar a produtividade do feijão (VIEIRA et al., 2012).

A dificuldade em se desenvolver linhagens resistentes a este patógeno deve-se ao fato de a resistência parcial ser quantitativa com moderada a baixa herdabilidade, além de sofrer expressiva influência ambiental nos caracteres morfológicos que confundem a expressão e

detecção desse mecanismo (MIKLAS et al., 2004). Vários estudos foram realizados para se identificar QTLs para a resistência ao mofo branco. De acordo com Miklas et al. (2001), entre as dezenas de QTLs encontrados, o situado no grupo de ligação B7 e localizado próximo ao loco da proteína de semente Phs (phaseolina), presente em uma linhagem de feijão andina G122, explicou 38% da variação fenotípica da reação ao mofo branco, quando avaliada pelo método de straw test e 26% quando avaliada no campo. No entanto, a presença desse QTL no genótipo não implica maior nível de resistência, pois ele interage com o ambiente e por isso não se expressa sempre (CARNEIRO et al. 2010).

Soule et al. (2011) desenvolveram um mapa de ligação com 35 QTLs sendo que 4 desses QTLs foram encontrados a partir do cruzamento de uma linhagem parcialmente resistente ao mofo branco (VA19) com uma linhagem suscetível I9365-31. Já Miklas et al. (2013) utilizando um mapa de ligação comparativo com 79 QTLs, conseguiram separar estes QTLs em grupos, sendo que desses 27 foram considerados para resistência fisiológica ao mofo branco, 36 relativos a características para evitar a doença e 16 relativos a características de raiz.

É de fundamental importância compreender a interação entre os alelos de resistência do hospedeiro e os alelos de virulência dos patógenos para a definição de estratégias de melhoramento de plantas para resistência a fitopatógenos (MELO e SANTOS, 1999). No caso do melhoramento do feijão visando resistência ao mofo branco é importante identificar as linhagens portadoras de alelos de resistência visando reuni-los em único genótipo. Para se atingir esse objetivo, também é fundamental identificar os isolados mais agressivos que permitem identificar as linhagens promissoras (SILVA et al., 2014).

2.7 Marcadores moleculares para resistência de plantas

Durante a evolução, as plantas desenvolveram vários mecanismos de defesa contra doenças e parasitas. Um exemplo desses mecanismos, é o reconhecimento específico do patógeno, através da indução da expressão dos genes de defesa (alelos de resistência). A introgressão de alelos de resistência em cultivares elites através do melhoramento convencional pode levar muitos anos. Para auxiliar e acelerar este processo, a utilização de marcadores de DNA é uma ótima alternativa. Marcadores moleculares revelam polimorfismos de DNA entre indivíduos geneticamente relacionados. Um loco molecular que apresenta segregação mendeliana é considerado um marcador genético. Segundo Xu e Crouch (2008) o uso de marcadores auxilia na identificação, quantificação, e caracterização da variação genética de germoplasmas disponíveis, além de agilizar na identificação, clonagem e introgressão de alelos

e/ou QTLs úteis para o melhoramento de uma dada característica e manipular a variação genética em populações sujeitas ao melhoramento genético.

Dentre os marcadores mais utilizados, destacam-se aqueles à base da PCR como os microssatélites (SSR). Os SSRs possuem vantagens de serem codominantes e estarem distribuídos por todo o genoma. Sendo assim, os microssatélites são considerados um dos melhores marcadores genéticos para fins de mapeamento e eficientes para identificar os QTLs (OLIVEIRA et al., 2006).

Como prova da importância desse marcador, foi ele que identificou a maioria dos QTLs do feijão para resistência ao mofo branco (ANTONIO et al., 2012; LARA et al., 2015, 2014; SILVA et al., 2014; SOULE et al., 2011).

Diversos trabalhos foram desenvolvidos utilizando este marcador molecular. Antonio (2011) identificou e mapeou marcadores moleculares do tipo microssatélite (SSR) ligados a QTLs de resistência do feijoeiro ao mofo branco, destacando-se quatro (BM175, SSR-IAC159, ATA7 e ATA9) que foram estáveis nas condições de cultivo do Sul de Minas Gerais.

Lara (2013) identificou os marcadores microssatélites BM184, BM211 e PV-gaat001 próximos a QTLs através da análise realizada com o ácido oxálico. Além disso, Lara et al. (2014) identificaram os marcadores ME1 e BM211 também próximos a QTLs de resistência ao mofo branco pelo straw test com alta herdabilidade. Além desses QTLs, aqueles identificados em outros ambientes também podem ser validados para utilização em condições ambientais do Sul de Minas Gerais.

2.8 Seleção assistida por marcadores para resistência ao mofo branco

Os marcadores de DNA são uma importante ferramenta no processo de transferência de alelos de resistência, por anular o efeito do ambiente e permitir a seleção na ausência do patógeno, podendo ser usados na seleção assistida por marcadores (SAM). Além disso, os marcadores de DNA são livres de efeitos pleiotrópicos, permitindo o monitoramento de qualquer número de marcadores em uma única população. Quanto mais próximo o marcador molecular estiver do loco de interesse mais efetiva é a SAM, reduzindo a possibilidade de ocorrer uma recombinação entre os mesmos (SINGH et al., 2001).

A utilização de SAM no melhoramento é recomendada em casos onde a característica de interesse é difícil de ser avaliada utilizando métodos tradicionais de seleção fenotípica como é a seleção para resistência ao mofo branco. Assim em um programa de seleção recorrente,

onde se pratica a seleção massal para resistência ao mofo branco, a inclusão da informação de marcadores de QTLs pode contribuir para aumentar o ganho com a seleção.

De acordo com Lee (1995) a expectativa da maioria dos melhoristas de plantas é reduzir o tempo necessário na transferência de alelos de interesse utilizando a SAM. Neste caso, os marcadores podem ser utilizados para selecionar os indivíduos com o maior número de marcadores semelhantes àqueles dos genitores.

Muitos estudos têm sido realizados para detectar QTLs associados com características de importância econômica, mas, poucas aplicações dessa seleção têm sido relatadas em programas de melhoramento. A maioria dos estudos que empregam SAM são teóricos, feitos por meio de simulações de computador. Estudos com simulação de dados indicaram que a eficiência da seleção assistida por marcadores diminui em gerações avançadas, devido à recombinação entre os marcadores e os QTLs. Os resultados obtidos por Austin e Lee (1996) confirmaram as previsões feitas pelas simulações, acrescentando que QTLs detectados em gerações precoces (máximo desequilíbrio de ligação), podem representar QTLs múltiplos e ligados, capazes de serem separados posteriormente por recombinação, dissipando os efeitos e reduzindo o potencial de ganho com a seleção. Especificamente na seleção recorrente, a redução do desequilíbrio de ligação acontece após o ciclo 0 (BEARZOTI,1997).

A resistência ao mofo branco em feijão, por ser uma característica quantitativa, deve oferecer grande potencial para a utilização da SAM, já que a interação entre os efeitos ambientais e a arquitetura da planta podem atrapalhar a seleção direta no campo (MIKLAS et al., 2007). Como o custo para avaliar essas características é alto, o ganho de seleção pode ser maximizado através da seleção assistida por marcadores.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Local

O experimento foi conduzido na área experimental e laboratório de genética molecular do Departamento de Biologia (DBI) 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.

3.2 Material Genético

O programa de seleção recorrente para resistência do feijoeiro ao mofo branco iniciou-se na safra das águas de 2009/2010 com Carneiro (2012a), na Universidade Federal de Lavras. Inicialmente foram realizados os inter cruzamentos de 12 linhagens e / ou cultivares, sendo inserida no segundo ciclo a cultivar ESAL 550 (Tabela 1). Posteriormente, no ciclo VII, foram inseridas cinco novas fontes de resistência adaptadas à região (14,15,16,17,18) e retiradas as três progênes menos promissoras dos inter cruzamentos.

Nesse estudo foi utilizada a população S_0 do décimo segundo ciclo de seleção recorrente obtido do inter cruzamento entre as 15 progênes selecionadas no ciclo 11 para resistência ao mofo branco.

Tabela 1. Linhagens e cultivares com resistência parcial ao mofo branco utilizadas na obtenção da população base no Programa de Seleção Recorrente para resistência ao mofo branco.

Cultivar/Linhagem	Tipo/peso 100 grãos (g)	Hábito de crescimento
1-RP-2	Carioca/25	II
2-MA-IV-18-266	Carioca/23	II
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
8- BRSMG – Talismã	Carioca/22	II
9-RC2-G122-67	Carioca/25	II
10-RC2-G122-72	Carioca/23	II
11-RC1-ExRico-26	Carioca/23	II
12-RC1-ExRico-97	Carioca/20	II
13-A195	Bege/54	I

Continuação Tabela 1.

Cultivar/Linhagem	Tipo/peso 100 grãos (g)	Hábito de crescimento
14-RCII M20 xG122	Carioca/24	II
15-OPNS x VC3-41	Carioca	III
16-EMB9	Carioca	II
17- CNFC10722	Carioca	II
18- BRS Vereda	Rosinha/26	II

Fonte: Do autor (2017).

Todas as linhagens/cultivares inseridas no início deste programa de seleção recorrente são fontes de resistência fisiológica parcial ao mofo branco. A linhagem A195 de origem andina é fonte exótica de resistência e apresenta sementes grandes em comparação com genótipos americanos (TERÁN; SINGH, 2008). As linhagens/cultivares de número 1 a 8 são adaptadas ao Sul de Minas Gerais e as de número 9 a 12 são progênes derivadas de retrocruzamento entre as fontes de resistência não adaptadas às regiões de cultivo de Minas Gerais (G122 ou Ex Rico 23) e os genitores recorrentes, as linhagens M20 ou Madrepérola. A linhagem G122 possui níveis relativamente altos de resistência ao mofo branco, grãos grandes tipo pintado e hábito de crescimento tipo I. Já a Ex Rico 23 tem grãos pequenos, brancos, hábito de crescimento tipo II e resistência fisiológica parcial ao mofo branco (SCHWARTZ; SINGH, TERÁN, 2013).

3.3 Preparo do inóculo, inoculação e avaliação das plantas S₀

O inóculo de *S. sclerotiorum* foi obtido a partir de um isolado agressivo (isolado 27) identificado em ensaios experimentais realizados na UFLA (SILVA, 2013). O inóculo foi multiplicado duas vezes, a fim de obter maior uniformidade em meio BDA a 20±3 °C, em BOD, por três dias e fotoperíodo de 12 horas. Três dias após a segunda multiplicação, foi realizada a inoculação do micélio em plantas S₀ com aproximadamente 28 dias de idade utilizando ponteiros de micropipetas, em casa de vegetação com umidade em torno de 90%. Para a inoculação, o ápice de duas hastes da planta foi seccionado a cerca de 2,5 cm do nó e a ponteira com o disco de ágar contendo o micélio foi encaixado. Oito dias após a inoculação foi realizada a avaliação de cada planta quanto à reação ao mofo branco. Na geração S₀, foi realizada uma seleção massal fenotípica baseada na média da inoculação em dois ramos por planta e selecionadas as 79 progênes mais resistentes. As plantas S₀ selecionadas geraram as progênes S_{0:1}, que foram avaliadas em experimentos de campo, onde foram inoculadas 10 plantas por parcela na haste principal.

A avaliação foi realizada por meio de uma chave descritiva de notas proposta por Terán et al. (2006), cuja descrição é:

- 1 -Plantas sem infecção no caule ou ramo ao lado do ágar;
- 2 -Invasão do primeiro internódio menor que 2,5 cm;
- 3 - Invasão do primeiro internódio maior que 2,5 cm sem atingir o primeiro nó;
- 4 -Infecção no caule ou ramo atinge o primeiro nó sem ultrapassar;
- 5- Infecção ultrapassa o primeiro nó e invade o segundo internódio menor que 2,5cm;
- 6 - Invasão do segundo internódio maior que 2,5 cm sem atingir o segundo nó;
- 7 -Infecção no caule atinge o segundo nó sem ultrapassá-lo;
- 8 -Infecção ultrapassa o segundo nó e invade o terceiro internódio menor que 2,5cm;
- 9 -Invasão do terceiro internódio maior que 2,5 cm levando a planta a morte.

Essa chave atualmente é recomendada para avaliação em campo (SCHWARTZ et al., 2013). Em casa de vegetação as notas da escala de 3 a 8 são consideradas de 2 a 7 na nova escala. A nota 8 corresponde a invasão do terceiro nó. As notas 1 e 9 são as mesmas nas duas escalas e a nota 2 da escala de Terán et al. (2006) é eliminada.

3.4 Inoculação e avaliação das progênies no campo

As progênies $S_{0:1}$ e $S_{0:2}$ selecionadas, derivadas das plantas S_0 do ciclo XII foram avaliadas em experimentos de campo. Foram avaliadas juntamente com as progênies $S_{0:2}$ do ciclo XII, progênies selecionadas do ciclo IX, X e XI com o objetivo de estimar o ganho com a seleção recorrente, além de duas testemunhas, uma resistente e uma suscetível.

O delineamento experimental utilizado nas avaliações das progênies $S_{0:1}$ foi o látice simples 9×9 com 79 progênies e duas testemunhas (cultivares Corujinha e Cornell 605) e o látice triplo 6×6 com 21 progênies $S_{0:2}$, as mesmas duas testemunhas e 13 progênies selecionadas, sendo três progênies do ciclo IX, cinco do ciclo X e cinco do ciclo XI. Cada parcela foi representada por uma linha de um metro na geração $S_{0:1}$, onde foram semeadas 15 sementes e inoculadas 10 plantas por parcela. Em $S_{0:2}$ a parcela tinha uma linha de 2m e foram inoculadas o mesmo número de plantas da geração anterior.

Os demais tratos culturais foram os mesmos empregados para a cultura do feijão.

3.5 Extração de DNA

O DNA das plantas S₀ do ciclo XII foi extraído de acordo com o procedimento usado por Pereira et al. (2007).

Foram utilizadas amostras de cerca de 2 g de folhas jovens de cada planta, trituradas com 10 mL de tampão de extração e 20 µL de β- mercaptoetanol, em almofariz com nitrogênio líquido. O tampão de extração é constituído de 2% de CTAB, 100 mM de TRIS (pH 8,0), 20 mM EDTA (pH 8,0), 1,4 M de NaCl e 1% de polivinilpirrolidona (PVP). O material triturado permaneceu incubado por 30 minutos, em tubos de centrífuga, em banho-maria, a 65°C, sob agitação leve. Após o banho-maria, os ácidos nucleicos foram extraídos com 10 mL da solução clorofórmio:álcool isoamil (24:1) e, depois de centrifugados para separar a fase orgânica da aquosa, o sobrenadante, que contém os ácidos nucleicos, foi coletado. Estes foram precipitados pela adição de 30 mL da mistura de etanol 95%: acetato de amônio 7,5M (6:1) e mantidos em um freezer, a -20 °C, por uma noite. Após a precipitação, os ácidos nucleicos foram transferidos para tubos de microcentrífuga Eppendorf, centrifugados e secos. Em seguida, os ácidos nucleicos foram reidratados em tampão TE (1 mM de TRIS e 0,1 mM de EDTA). Foi realizada a segunda extração com clorofórmio:fenol:isoamílico (24:25:1) e os ácidos nucleicos do sobrenadante foram novamente precipitados pela adição de, pelo menos, três volumes de uma mistura de acetato de sódio 3M: etanol 95% (1:20). Os ácidos nucleicos precipitados foram reidratados em tampão TE. Alíquotas de DNA obtidas de cada linhagem foram quantificadas em gel de agarose 1%, ao lado de um padrão de concentração de DNA, construído a partir de DNA de fago λ, nas concentrações de 100, 200 e 300 ng/µL. Mediante comparação visual da intensidade das bandas do DNA das amostras e dos padrões, a concentração de cada amostra foi estimada e, posteriormente, diluída para a concentração de, aproximadamente, 10 ng/µL, utilizada nas reações de PCR.

Cada reação de PCR foi preparada em um volume de 12 µL, misturando-se os seguintes reagentes com as respectivas concentrações de acordo com Pereira et al., (2007): 20 ng de DNA genômico; 100 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dGTP, dCTP e dTTP); uma unidade da enzima Taq DNA polimerase; 2,25 µL do par de *primers* de concentração 2,0µM; 2,0 µL de tampão de reação 6x (50 mM tris pH 8,3; 2,0 mM MgCl₂; 20 mM de KCl; 10 µg de BSA; 0,25% de ficoll 400; 10 mM de tartrazina) e água bidestilada, até totalizar 12 µL. As amplificações foram realizadas em tubos de 0,2 mL em termociclador, por meio do seguinte programa: uma etapa de dois minutos, a 94°C, para a desnaturação inicial, seguida de 40 ciclos, sendo cada um de 15 segundos para desnaturação a 94°C; 30 segundos para anelamento do

primer em temperatura variável de 55° a 60°C (dependendo do *primer*) e 30 segundos para extensão a 72°C. Por fim, uma etapa de dois minutos, a 72°C, para extensão final. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese, em gel de poliacrilamida 6%, em tampão TBE (0,045 M Tris-Borato e 0,001 M EDTA), a 80V, por três horas e meia. Posteriormente, foram corados em nitrato de prata e fotografados por câmera digital.

3.6 Análises Estatísticas

Foi realizada a análise de variância com os dados de avaliação das plantas individuais e os resultados de cada marcador segregante na população S_0 .

Os dados de resistência ao mofo branco das progênes foram submetidos à análise de variância por geração. O modelo adotado considerando os efeitos de progênes, blocos dentro de repetições e o erro como aleatórios, e os efeitos de repetições e a média como fixos, foi:

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

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 $S_{0:1}$ do ciclo XII e $j = 1, 2$ e 3 nas gerações $S_{0:2}$ do experimento final com os 4 ciclos (IX, X, XI e XII);

$b_{l(j)}$: 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_{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 4 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, XI e XII, além da inclusão do efeito dos diferentes ciclos (c_i).

Com os dados de avaliação das progênes nos experimentos de campo, foi utilizada a reação média das plantas de cada progênie nas análises individuais de variância. Para o porte

da progênie foram utilizados os dados por parcela obtidos com uma chave descritiva de notas, de 1 (melhor porte) a 9 (pior porte) segundo Collicchio et al. (1997).

Para tipo de grãos as sementes de cada progênie foram avaliadas por parcela, com uma chave descritiva de notas, sendo a nota 1 (o tipo de grão ideal, semelhante ao carioca) e 5 (diferente do tipo carioca) de acordo com Ramalho et al. (1998).

Foi estimada ainda a acurácia seletiva ($r_{gg\%}$), para as características avaliadas utilizando a seguinte expressão (RESENDE e DUARTE, 2007):

$$r_{gg\%} = \sqrt{1 - \frac{1}{Fp}}$$

Em que:

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

3.7 Validação dos marcadores

Segundo Collard e Mackill (2008), existem dois passos a serem realizados antes da utilização de certos QTLs em programas de seleção assistida: a confirmação e a validação do QTL. A confirmação do QTL se faz necessária pois sua posição e seus efeitos podem ser considerados imprecisos devido a fatores como problemas de amostragem. A validação corresponde à verificação do efeito de determinado QTL em populações diferentes daquela utilizada para a sua identificação, e assim, determinar a sua utilidade em programas de seleção assistida. Com isso, os *primers* SSR selecionados foram obtidos a partir dos trabalhos de Antonio (2011), Lara (2013), Lima (2014) e Souza (2014) com o objetivo de realizar a validação dos mesmos (Tabela 2, APÊNDICE A).

3.8 Estimativa do Ganho com a Seleção

Com os resultados da análise de variância da geração $S_{0:1}$ foi estimada a h^2_a (herdabilidade no sentido amplo) e o ganho com a seleção das progênies através da seguinte expressão (RAMALHO et al., 2012):

$$GS = dsx h^2_a$$

Onde:

ds: diferencial de seleção, que é dado pela diferença da média das progênies selecionadas pela média geral das progênies;

h^2 : herdabilidade no sentido amplo do caráter em questão;

A estimativa de herdabilidade foi obtida por meio da expressão:

$$h^2_a = \sigma^2_G / \sigma^2_F$$

Em que:

h^2_a : Herdabilidade no sentido amplo;

σ^2_G : Variância genética entre progênies;

σ^2_F : Variância fenotípica entre progênies.

Na geração S_{0:2} os resultados médios das progênies relativos à reação ao mofo branco foram agrupados pelo método de agrupamento de Scott e Knott (1974). Além disso, foram utilizadas as cinco progênies mais resistentes do ciclo XII e comparadas com as progênies selecionadas nos ciclos anteriores (IX, X e XI), para se estimar o progresso genético realizado através da seleção recorrente, por meio de regressão linear.

3.9 Eficiência da seleção assistida por marcadores

A eficiência da seleção assistida por marcadores moleculares para a resistência ao mofo branco foi medida pela expressão proposta por Hamblim e Zimmermann (1986):

$$E\% = \frac{A - C}{M - C}$$

Onde:

C: Corresponde a 5% do número de progênies selecionadas;

A: Número de progênies selecionadas pela SAM;

M: Número total de progênies selecionadas;

Tal estimativa mediu a porcentagem de progênies selecionadas com base nas informações moleculares em relação ao total de progênies selecionadas fenotipicamente. O

valor estimado da eficiência será máximo quando o número de progênies selecionadas com o marcador for igual ao número de progênies selecionadas apenas a partir da seleção fenotípica, e será mínimo quando as progênies selecionadas com o marcador não coincidirem com aquelas selecionadas fenotipicamente.

Para verificar o ganho com a seleção assistida foi realizada uma análise de regressão múltipla “stepwise”, com os marcadores polimórficos nas progênies $S_{0:1}$, utilizando-se o programa SAS (SAS INSTITUTE, 2014). Para se obter a estimativa do ds_m utilizado na estimativa do ganho esperado com a SAM foram selecionadas as 16 progênies portadoras de todas as marcas dos QTLs. Este ganho estimado, foi obtido através do uso da seguinte expressão:

$$GS_{SAM} = ds_m x h_a^2$$

Onde:

ds_m : Diferencial de seleção, dado pela diferença entre as médias das progênies portadoras dos marcadores dos QTLs selecionadas pela de regressão múltipla “stepwise” e a média geral das progênies;

h_a^2 : herdabilidade no sentido amplo da população em questão.

Posteriormente, o ganho obtido com a SAM foi comparado com o ganho obtido com a seleção fenotípica afim de se observar qual método foi mais eficiente para o programa de seleção recorrente visando resistência ao mofo branco. Para isto utilizou-se a seguinte equação:

$$E\%_R = \frac{GS\%_{SAM}}{GS\%_F} \times 100$$

Onde:

$GS\%_{SAM}$: Ganho com a seleção das 16 melhores progênies baseadas na análise de regressão múltipla “stepwise”;

$GS\%_F$: Ganho com a seleção das 16 melhores progênies baseada apenas em informações fenotípicas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da resistência ao mofo branco de progênes $S_{0:1}$ pelo straw test

A acurácia seletiva refere-se à correlação entre o valor genotípico verdadeiro do tratamento genético e o valor estimado a partir das informações obtidas através dos experimentos. Segundo Resende e Duarte (2007) estimativas superiores a 70% indicam alta precisão experimental.

Utilizando-se a acurácia seletiva como estimativa de precisão experimental, conclui-se que a precisão neste experimento foi moderada (Tabela 3). No entanto, considerando o coeficiente de variação (CV), que foi relativamente baixo (19,85%), indicando uma boa precisão experimental semelhante ao encontrado por Carneiro (2009), que observou um coeficiente de cerca de 16% em experimentos e abaixo do encontrado por Souza e Costa (2003) que observaram um CV de 42,4%, conclui-se que a moderada acurácia se deveu provavelmente à reduzida variabilidade genética entre as progênes $S_{0:1}$. A estimativa da herdabilidade no sentido amplo de 31,16% também sugere reduzida variação genética entre as progênes. Nota-se que elas foram uniformes em relação à resistência, possivelmente em razão da seleção fenotípica praticada em S_0 ter sido bastante eficiente reduzindo a variabilidade em $S_{0:1}$.

Tabela 3. Resumo da análise de variância da reação das progênes $S_{0:1}$ ao mofo branco, média geral das 79 progênes, herdabilidade e acurácia.

FV	GL	Variância
Progênes	78	0,0902
Erro	62	0,3984
Média progênes		3,18
Herdabilidade		0,3116
CV		19,85%
Acurácia		55,83%

Fonte: Do autor (2017).

4.2 Avaliação da resistência ao mofo branco de progênes $S_{0:2}$ pelo straw test

O resumo da análise de variância efetuada com os dados da avaliação fenotípica da resistência pode ser observado na Tabela 4. A precisão do experimento obtida foi alta, de acordo com a acurácia estimada, e o coeficiente de variação foi de 12,36%, corroborando com o resultado estimado para a precisão experimental da acurácia seletiva. O coeficiente de

determinação (R^2) é uma medida descritiva de qualidade do ajuste obtido. Neste caso, o modelo de regressão ajustado explicou 93,54% da variabilidade nos dados.

Tabela 4. Resumo das análises de variância da reação ao mofo branco das progênies $S_{0.2}$ e o resultado da regressão linear envolvendo as cinco melhores progênies do ciclo XII e as demais avaliadas, com o respectivo ganho com a seleção e R^2 .

FV	GL	QM	Fc
Rep	2	122.428.291	8,83 *
Bloco(Rep)	15	0,1018738	0,73 NS
Grupo	4	140.180.068	10,11 *
T vs C	1	465.839.286	33,59 *
Entre ciclos	3	0,15446887	1,11 NS
Progênies	31	0,49628349	3,58 *
ProgC-IX	2	0,102316	0,74 NS
ProgC-X	4	0,037295	0,27 NS
ProgC-XI	4	0,215625	1,55 NS
ProgC-XII	20	0,421503	3,04 *
Testemunhas	1	5,704552	41,13 *
Erro	54	0,13869407	
Média progênies CXII		3,012	
CV		12,36%	
Acurácia		84,89%	
Ganho por ciclo		-0,215	
R^2 ajustado		0,9354	

*: Significativo a 5% de Probabilidade; NS: Não significativo pelo teste F.

Fonte: Do autor (2017).

Observou-se a ocorrência de diferenças significativas ($P < 0,01$) entre os 5 grupos (CIX, CX, CXI, CXII e Testemunhas), entre as testemunhas versus os ciclos, entre as progênies do ciclo XII e entre as testemunhas. Embora não tenha havido diferença entre as médias das progênies dos quatro ciclos, a diferença detectada entre as progênies do ciclo XII indica que a sua média foi reduzida pelas mais suscetíveis. Consequentemente, as mais resistentes devem se destacar em relação àquelas dos ciclos precedentes. Mais uma vez constata-se o que foi observado por Vasconcellos (2017), onde os resultados indicam que as progênies possuem níveis de resistência ao mofo branco que diferem entre si, e provavelmente possuem alelos de resistência diferentes, mostrando que a variabilidade genética existente entre os genitores e as progênies é indispensável para se obter ganho com a seleção.

O progresso genético foi de 6,67% (b_0/b_1 , Figura 1) por ciclo, considerando os ciclos IX ao XII, ou seja, a média das progênies diminuiu 0,215 a cada ciclo de seleção recorrente

realizado. O valor negativo apresentado no progresso genético, deve-se ao fato da redução nas médias ao decorrer dos ciclos. É importante lembrar que na análise de regressão só foram utilizadas as cinco progênes mais resistentes do ciclo XII e as demais avaliadas dos ciclos anteriores. No entanto, se for considerado apenas o ganho do ciclo XI em relação ao XII, que foi de 12,17%, nota-se que ele foi muito superior aos demais, indicando a superioridade da seleção massal em casa de vegetação em relação à praticada no campo, nas S_0 de todos os ciclos precedentes.

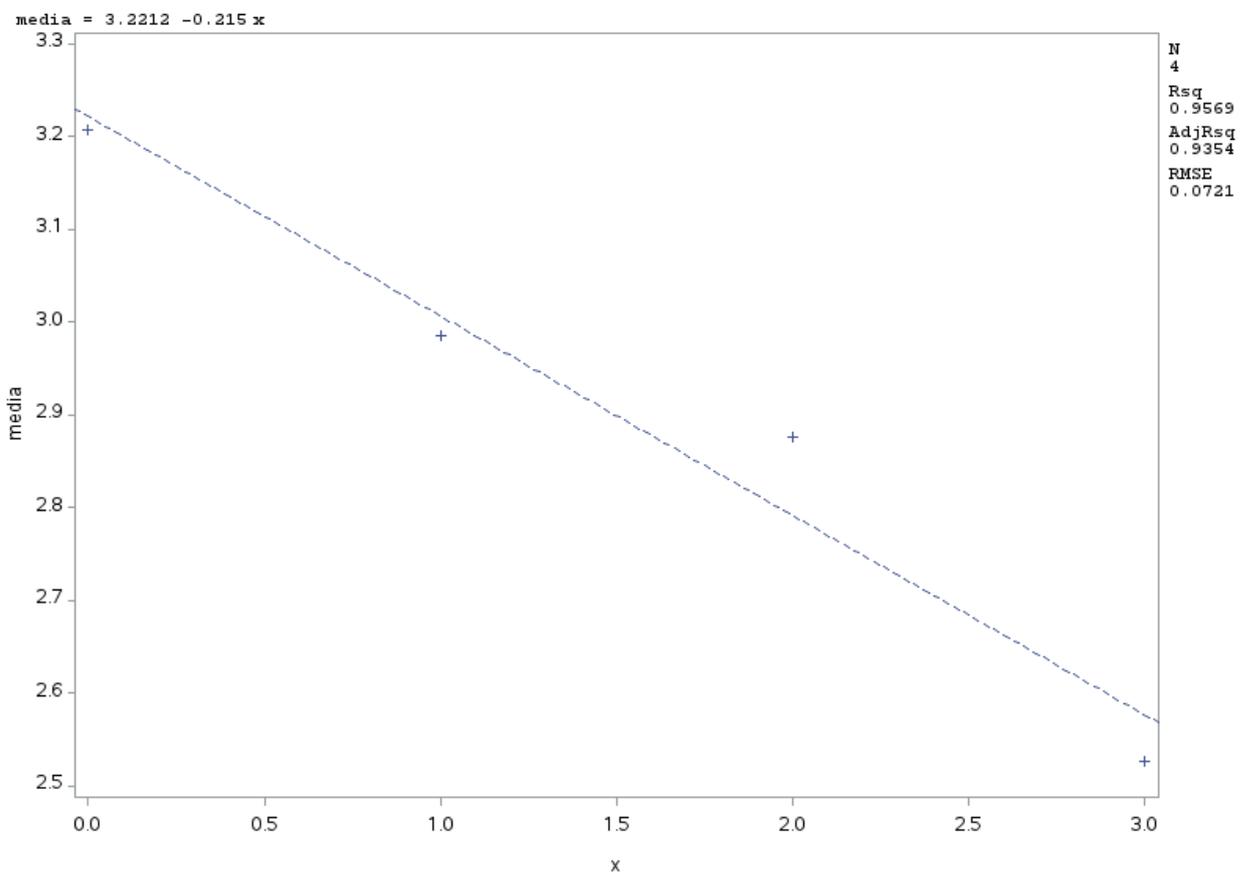


Figura 1. Regressão Linear entre os ciclos IX, X, XI e XII (variável independente) e reação média ao mofo branco das progênes (variável dependente).

Fonte: Do autor (2017).

Com o objetivo de se determinar quais foram as progênes com melhor desempenho para o caráter resistência ao mofo branco, efetuou-se o teste de agrupamento de médias de Scott-Knott (SCOTT; KNOTT, 1974) com as médias obtidas a partir da análise da geração $S_{0:2}$. Com base na divisão das médias em 3 grupos distintos (Tabela 5), pode-se observar que as testemunhas são contrastantes entre si, o que já era esperado, tendo em vista que a linhagem Corujinha é uma testemunha suscetível ao mofo branco enquanto a Cornell 605 possui

resistência ao patógeno. Todas as progênies que estão dentro do grupo C do teste de Scott-Knott realizado, não diferem entre si e apresentam melhor desempenho quando comparadas à linhagem Corujinha presente no grupo A e a progênie 63\8 que se encontra no grupo B. Nota-se que as progênies são no geral tão resistentes quanto à testemunha resistente Cornell 605. Além disso, nota-se que o maior número de progênies avaliado foi do ciclo XII e a uniformidade entre elas certamente foi em razão da seleção massal eficiente praticada em S_0 na casa de vegetação.

Tabela 5. Agrupamento das médias das progênies dos ciclos IX ao XII (Scott-Knott 1974; P=5%)

Ordem	Ciclo	Progênies/Linhagens	Médias
1		Corujinha (T)	5,11 A
2	CXII	63\8	3,88 B
3	CXII	62\9	3,6 C
4	CXII	64\1	3,52 C
5	CIX	23\7	3,41 C
6	CXII	61\12	3,41 C
7	CXII	59\6	3,36 C
8	CXII	63\2	3,28 C
9	CIX	34\3	3,25 C
10	CXII	56\7	4,19 C
11	CX	10\19	3,19 C
12	CXII	64\9	3,16 C
13	CXII	61\10	3,15 C
14	CX	10\34	3,1 C
15		Cornell 605 (T)	3,09 C
16	CXI	11\121	3,06 C
17	CXI	11\296	3,05 C
18	CX	10\185	3 C
19	CXII	56\8	2,97 C
20	CXI	11\261	2,93 C
21	CIX	26\15	2,93 C
22	CX	10\107	2,91 C
23	CXI	11\364	2,91 C
24	CXII	64\14	2,9 C
25	CXII	59\4	2,9 C
26	CXII	55\2	2,89 C
27	CXII	64\5	2,85 C
28	CXII	53\10	2,81 C
29	CXII	59\8	2,78 C

Continuação tabela 5.

Ordem	Ciclo	Progenies/Linhagens	Médias
30	CX	10\267	2,73 C
31	CXII	59\9	2,7 C
32	CXII	53\3	2,61 C
33	CXII	61\3	2,5 C
34	CXII	51\4	2,49 C
35	CXII	56\5	2,4 C
36	CXI	11\185	2,36 C

Fonte: Do autor (2017).

Em todas as gerações são selecionados além dos genótipos mais resistentes, tipos de grãos mais semelhantes ao Carioca e plantas com porte mais arbustivo. Essa prática pode ter aumentando a média para o caráter resistência dos genótipos selecionados, uma vez que os indivíduos mais resistentes que possuem grãos fora do padrão carioca e porte mais prostrado foram eliminados.

4.3 Eficiência da seleção assistida por marcadores

O princípio básico de uma análise de QTL é encontrar associações significativas entre a expressão de um caráter e a marca. Existem alguns métodos estatísticos que detectam essas associações como a regressão linear simples ou múltipla, a regressão não-linear e o mapeamento por intervalo (BRONDANI et al., 2003). Alguns fatores podem influenciar na detecção de QTLs, como problemas envolvendo os testes estatísticos, assim como o número de genes envolvidos na expressão do caráter, a existência de interações gênicas, o número de genes segregando na população de mapeamento, a herdabilidade do caráter, o tipo e tamanho da população de mapeamento, o desequilíbrio de ligação na população e o número de marcadores disponíveis (LIU, 1998).

Na tabela 6, encontram-se os dois primers SSR obtidos pela análise de regressão múltipla “stepwise” com o R^2 ajustado pelo programa SAS (SAS INSTITUTE, 2014). Neste caso, o modelo consegue explicar apenas 16,81% dos valores observados.

Tabela 6. Marcadores selecionados pela regressão múltipla “stepwise” para maior resistência ao mofo branco.

Variável	SQ	F calc
BM189	1,92927	11,65*
BMD20	1,68455	10,18*
R ² Ajustado	0,1681	

Fonte: Do autor (2017).

Na tabela 7 estão descritos todos os marcadores que apresentaram polimorfismo entre as progênies, com seus respectivos coeficientes de determinação obtidos através da análise por ponto realizado pelo programa SAS (SAS INSTITUTE, 2014). Pode-se observar o baixo valor do R² calculado em todos os marcadores, mesmo nos primers BM189 e BMD20, considerados significativos pela análise, indicando a baixa eficiência da seleção assistida por marcadores, no presente trabalho. Entre as razões mencionadas por Liu (1998) para se detectar QTLs por meio de marcadores, a população utilizada pode ser considerada inadequada, ou seja, a população é pequena, provavelmente não deve haver desequilíbrio de ligação suficiente entre os marcadores e os QTLs, em razão de ser uma população derivada de vários intercruzamentos sucessivos do programa de seleção recorrente. Além disso, a herdabilidade da reação ao mofo branco não é elevada, especialmente a verificada nessa população (Tabela 3). Outro ponto que deve ser considerado é o fato dos marcadores usados já terem sido identificados na literatura como marcadores de QTLs de resistência ao mofo branco.

Do total de marcadores usados (37) apenas os relacionados na tabela 7 foram polimórficos nas plantas S₀. Note que apenas dois explicaram pequena parcela da variação. Uma primeira razão, como já mencionado anteriormente, é que a seleção massal em S₀ já deve ter quase exaurido a variação entre as progênies S_{0:1}. Além disso, a maioria não explicou nenhuma variação, provavelmente porque os marcadores foram separados dos QTLs pela recombinação, ou ainda, os QTLs por eles identificados, não devem ter se expressado no ambiente experimental. É importante lembrar que a maioria dos marcadores usados foram identificados em outros ambientes.

Tabela 7. R² ajustado dos marcadores polimórficos obtidos pela análise por ponto.

Marcadores polimórficos	Análise por ponto	R ² ajustado
PV-gaat001	NS	0,0095
GATS91	NS	-0,0116
BM156	NS	-0,0119
BM184	NS	-0,0046
BM189	Significativo	0,0677
BMD15	NS	0,0348
BMD20	Significativo	0,0515
PVBR189	NS	-0,0121
PVESTBR279	NS	-0,0129
SSR-IAC134	NS	-0,0095
SSR-IAC159	NS	0,004
ATA7	NS	-0,0069
PVBR78	NS	-0,0089
SSR-IAC27	NS	-0,0067
SSR-IAC77	NS	-0,0131

NS: não significativo.

Fonte: Do autor (2017).

Neste trabalho, além da validação de alguns marcadores, foram adicionados *primers* microssatélites localizados dentro ou muito próximos de meta-QTLs descritos por Vasconcellos et al. (2017) como pode ser observado na tabela 8 (APÊNDICE A). Na análise de meta-QTL, os marcadores SSR podem ser usados para identificar regiões genômicas estáveis em populações e, portanto, serem mais promissores em programas de seleção assistidos por marcadores. Dentre os 17 marcadores utilizados, três apresentaram polimorfismo entre as progênies, porém nenhum deles foi significativo (Tabela 7). Provavelmente esse resultado ocorreu com os meta-QTLs polimórficos porque a estabilidade dos mesmos foi verificada com o uso de vários ambientes da América do Norte, os quais são muito diferentes dos usados no presente estudo.

A eficiência da seleção assistida por marcadores moleculares para a resistência ao mofo branco obtida pela expressão proposta por Hamblim e Zimmermann (1986), foi de 4,76%.

Como pode ser observado na Tabela 9, a partir da análise de regressão múltipla “stepwise” foram identificadas 16 progênies que possuem as duas marcas ou QTLs consideradas significativas e apenas duas dessas progênies selecionadas a partir da SAM foram

utilizadas para compor a geração $S_{0:2}$, isso é, foram coincidentes com a seleção fenotípica das progênies $S_{0:1}$.

De posse dos valores do ganho com a seleção fenotípica (16,15%) e do ganho com a seleção assistida (5,05%) foi obtida a eficiência da seleção assistida em relação à fenotípica, observando que o método mais eficiente para o programa de seleção recorrente visando resistência ao mofo branco foi a seleção fenotípica.

Tabela 9. Progênies selecionadas com base na reação ao mofo branco (seleção fenotípica), com base nos marcadores selecionados pela regressão linear múltipla e progênies selecionadas por ambos procedimentos (*)

Prog selecionadas pela seleção fenotípica	Prog selecionadas pela SAM
51\4	52/3
53\10	53/6
53\3	54/1
55\2	54/2
56\5	54/4
56\7	55/3
56\8	56/3
59\4	56/5*
59\6	56/6
59\8	56/7*
59\9	56/10
61\10	59/12
61\12	59/13
61\3	60/1
62\9	60/4
63\2	63/5
63\8	
64\1	
64\14	
64\5	
64\9	
Média total das 79 progênies em $S_{0:1}$	3,18
Média das 16 melhores progênies $S_{0:1}$	2,66
Média das 16 progênies regressão múltipla	3,02
Ganho com a seleção fenotípica	16,15%
Ganho com a seleção assistida	5,05%
Eficiência da seleção assistida em relação à fenotípica	31,27%

*Progênies selecionadas tanto na seleção fenotípica quanto na seleção assistida.

Fonte: Do autor (2017).

Em teoria, os ganhos com a seleção assistida por marcadores são maiores que os ganhos com a seleção fenotípica, porém, existem alguns fatores como erros com as estimativas de parâmetros de QTL e SAM, deriva genética e desequilíbrio entre QTL selecionado e não-selecionados que podem acarretar a redução com os ganhos da SAM em relação à seleção fenotípica (LANDE & THOMPSON, 1990; KNAPP, 1998). Aliado a essas dificuldades, a população $S_{0:1}$ utilizada possuía variabilidade reduzida.

4.4 Avaliação do porte, tipo de grão e peso

Para tipo de grão, a seleção é do tipo mais semelhante ao carioca, visando atender às exigências do mercado. No caso de porte, o objetivo é a seleção das progênes mais arbustivas, o que também auxilia na prevenção ou redução do mofo branco, além de facilitar os tratos culturais. Para o experimento em progênes $S_{0:1}$ (Tabela 10) pode-se observar que houve alta precisão experimental tanto para porte com acurácia de 72,32% e coeficiente de variação (CV) de 12,49%, quanto para tipo de grão onde a acurácia estimada foi de 71,72% e o CV 16,17%.

Com relação à herdabilidade no sentido amplo, para ambos os caracteres, nota-se que ela é moderada. Existem relatos na literatura de grande variação da herdabilidade para o porte, Pires et al. (2014) encontraram valores de herdabilidade entre 42% e 52% e Leite et al. (2016) encontraram herdabilidade para o caráter porte de até 86%. Para o tipo de grão, Menezes Júnior et al. (2008) obtiveram estimativas de herdabilidade variando entre 34 e 86% e Dias (2015) de 73 a 92%.

Tabela 10. Resumo da análise de variância das notas de porte e tipo de grão das progênes $S_{0:1}$.

$S_{0:1}$	Porte	Tipo de grão
Média progênes	5,70	2,78
QM progênie	0,2777	0,107
QM erro	0,5066	0,202
CV	12,49%	16,17%
Acurácia	72,32%	71,72%
Herdabilidade	0,5230	0,5144

Fonte: Do autor (2017).

No experimento em $S_{0:2}$, foram avaliadas apenas as melhores progênes dos quatro ciclos (IX, X, XI e XII), a variável progênie foi considerada como fixo, por não representar bem as linhagens pertencentes a cada ciclo (Tabela 11).

Tabela 11. Resumo das análises de variância das notas de porte e de tipo de grãos das progênies dos ciclos IX ao XII.

	Porte				Grão		
FV	GL	QM	F calc	FV	GL	QM	F calc
Rep	2	0,756	1,04 ^{NS}	Rep	2	0,4657	8,47*
Bloco(Rep)	15	2,334	3,21*	Bloco(Rep)	15	0,1083	1,97*
Ciclo	4	1,213	1,67 ^{NS}	Ciclo	4	72,653	132,18**
Prog(ciclo)	31	1,391	1,92*	Prog(ciclo)	31	0,1006	1,83*
Test vs Ciclos	1	2,807	3,87 ^{NS}	Test vs Ciclos	1	27,357	497,73**
entre ciclos	3	0,967	1,33 ^{NS}	entre ciclos	3	0,6145	11,18**
Ciclo IX	2	0,064	0,09 ^{NS}	Ciclo IX	2	0,1891	3,44*
Ciclo X	4	1,598	2,2 ^{NS}	Ciclo X	4	0,0872	1,59 ^{NS}
Ciclo XI	4	0,659	0,91 ^{NS}	Ciclo XI	4	0,0898	1,63 ^{NS}
Ciclo XII	20	1,749	2,41*	Ciclo XII	20	0,1069	1,95*
Testemunha	1	1,147	1,58 ^{NS}	Testemunha	1	19,153	0 ^{NS}
Erro	54	0,726		Erro	54	0,0549	
Média C XII	6,06			Média C XII	2,49		
CV	14,06%			CV	9,41%		
Acurácia	69,22%			Acurácia	67,35%		

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

Fonte: Do autor (2017).

Para o caráter porte da planta, observa-se uma precisão experimental mediana (69,22%) e o coeficiente de variação (CV) foi de 14,06%. Assim como o porte, o caráter tipo de grão apresenta uma precisão experimental mediana (67,35%) e CV 9,41%. Os dados estimados para o coeficiente de variação são próximos aos dados obtidos por Lima (2010), no qual o CV para porte foi de 16,41% e para o tipo de grão 10,53%. Portanto, a reduzida variabilidade genética entre as progênies, pode ter subestimado a acurácia.

Houve diferença significativa entre as progênies dentro do ciclo XII tanto para porte quanto para qualidade de grãos, indicando que é possível identificar progênies superiores para as características estudadas. O alto valor do quadrado médio no ciclo da ANOVA para tipo de grão, deve-se às testemunhas, pois estas possuem características no grão que se desviam do padrão carioca e receberam nota 5 em todas as avaliações. Percebe-se que o contraste entre ciclos, no qual não estão inseridas as testemunhas, há uma grande diminuição no valor do quadrado médio não havendo diferença significativa entre estes grupos para o caráter porte, porém, para o tipo de grão, houve diferença significativa entre os ciclos.

Também foi avaliada a produtividade de grãos das progênies da geração S_{0.2} e pode-se observar que houve uma baixa precisão experimental, com acurácia de 19,61% e coeficiente de

variação de 23,22% (Tabela 12). Segundo Pimentel Gomes (2000), nos experimentos de campo, se o CV for inferior a 10%, o experimento pode ser considerado de alta precisão; de 10 a 20% o experimento possui boa precisão; 20 a 30%, baixa precisão, e acima de 30%, o coeficiente de variação é considerado muito alto. Entretanto, o julgamento da precisão experimental pelo CV depende da sensibilidade do caráter ao ambiente e o valor estimado neste experimento está dentro da amplitude de variação do coeficiente observado por Matos (2005), o qual variou entre 8% a 36%.

De acordo com a análise de variância, não houve diferença significativa entre as progênies, ou seja, todas as 34 progênies avaliadas apresentaram produtividade igual à cultivar Corujinha, que apesar de suscetível ao mofo branco, foi selecionada para as condições de cultivo do Paraná, portanto, não muito diferentes das condições experimentais quando comparado com cultivares derivadas de outros países com ambientes muito contrastantes, como a América do Norte por exemplo, ou mesmo os Andes, de onde derivou a Cornell 605.

Mesmo assim, o considerável erro experimental e a homogeneidade das progênies derivadas em grande parte da seleção em S_0 recomenda-se que a produtividade das progênies seja novamente avaliada em experimentos mais apropriados, com maior tamanho de parcela e mais ambientes da região.

Tabela 12. Resumo da análise de variância para a produtividade de grãos (g/parcela) das progênies em $S_{0:2}$.

FV	GL	QM	F calc
Rep	2	10448.5	1,89
Bloco(Rep)	15	6307.72	1,14 ^{NS}
Ciclo	4	5495.69	0,99 ^{NS}
Prog(ciclo)	31	5723.96	1,04 ^{NS}
Testemunha vs Ciclos	1	9573.53	1,73 ^{NS}
entre ciclos	3	4265.21	0,77 ^{NS}
IX	2	27198	4,92*
X	4	7644.82	1,38 ^{NS}
XI	4	4657.47	0,84 ^{NS}
XII	20	2812.13	0,51 ^{NS}
Testemunha	1	10836	1,96 ^{NS}
Erro	54	5530.12	
Média	320,33		
CV	23,22%		
Acurácia	19,61%		

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

Fonte: Do autor (2017).

5 CONCLUSÕES

A seleção massal em S_0 em casa de vegetação é mais eficiente do que no campo.

A baixa eficiência da SAM na seleção de progênies ocorreu principalmente devido à pequena variação para resistência entre as progênies e também devido ao baixo número de marcadores ligados a QTLs de resistência. Portanto, a seleção fenotípica foi mais eficiente do que a seleção assistida por marcadores moleculares.

Além da resistência, as progênies selecionadas são também promissoras quanto ao porte, tipo e produtividade de grãos.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. B.; AYERS, W. A. Ecology of sclerotinia species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 896-899, Aug. 1979.
- ANTONIO, R. P. **Controle Genético Da Resistência Do Feijoeiro Ao Mofo Branco E Seleção Assistida Por Marcadores Moleculares**. 2008. 56 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais. 2008.
- 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**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 3, p. 733-740, Sept. 2008.
- ANTONIO, R. P. **Identificação de QTLs de resistência ao mofo branco e de mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa em feijoeiro**. 2011. 155 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- ANTONIO, R. P. et al. Seleção assistida por marcadores de DNA em retrocruzamento visando resistência ao mofo branco em feijoeiro. **Revista Caatinga**. v.25, n-4, 61-67, 2012.
- 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.
- AUSTIN, D.F.; LEE, M. Comparative mapping in F2:3 e F6:7 generations of quantitative trait loci for grain yield and yield componentes in maize. **The oretical and Applied Genetics**, v.92, n.7, p.817-826, 1996.
- BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. O. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p. 110-114, 2012.
- BASSET, M. J. List of genes - Phaseolus vulgaris L. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 47, p. 1-24, 2004.
- BEARZOTI, E. **Simulação de seleção recorrente assistida por marcadores moleculares em espécies autógamas**. 1997. 230p. Tese (Doutorado em Agronomia, área de concentração: Genética e melhoramento de plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo. 1997.
- BENCHIMOL, L., et al. Structure of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties of mesoamerican and Andean origins using new developed microsatellite markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 54, n. 8, p. 1747–1762, 2007.
- BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. Woodbury: Stemma Press, 368 p. 2002.
- BLAIR M. W. et al. Inheritance of seed iron and zinc content in common bean (*Phaseolus vulgaris* L). **Mol. Breed.** 23, 197–207. 2009.

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.

BRONDANI, C.; RANGEL, P.H.N.; BRONDANI, R.P.V. **Utilização de Marcadores Moleculares em Programas de Ampliação da Base Genética de Espécies Cultivadas**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2003. 36 p. (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9644; 155).

BUSO, G.S.C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R.P.V.; FERREIRA, M.E. Microsatellite markers for the common bean *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Ecology Notes**, v.6, p.252-254, 2006.

CARNEIRO, F. F. **Genética da resistência do feijoeiro ao mofo branco e o uso do retrocruzamento assistido por marcadores microssatélites**. 2009. 85 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

CARNEIRO, F. F.; SANTOS, J. B.; LEITE, M. E. Marker-assisted backcrossing using microsatellites and validation of SCAR Phs marker for resistance to white mold in common bean. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 6, p. 9, 2010.

CARNEIRO, F. F. et al. Genetics of common bean resistance to white mold. **Crop Breeding and Applied Biotechnology (Online)**, v. 11, n. 2, p. 165–173, 2011.

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

CARNEIRO, J. E. D. S. et al. BRSMG Madrepérola: Common bean cultivar with late-darkening Carioca grain. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 281–284, 2012b.

CARVALHO, A. A.B. et al. Inter-relação entre caracteres de caupi de porte ereto e crescimento determinado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 1, p. 137–142, 2001.

CARVALHO, R. S. B; LIMA, I. A.; ALVES, F. C.; SANTOS, J. B. Selection of carioca common bean progenies resistant to white mold. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.13, p.172-177, 2013.

COLLARD, B. C. Y.; MACKILL, D. J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, Londres, v. 363, n. 1491, p. 557–72, Feb. 2008.

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.

CORTÉS, A. J. et al. Molecular ecology and selection in the drought-related Asr gene polymorphisms in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Genetics**, 2012.

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.

FREITAS, R. M. **Progresso genético de três ciclos de seleção recorrente no melhoramento de feijão vermelho**. 2012. 42 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2012.

GAITÁN-SOLÍS, E. et al. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization and cross-species amplification in *Phaseolus* ssp. **Crop Science**, v.42, p.2128-2136, 2002.

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

GERALDI, I. O. Por que realizar seleção recorrente? In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 9, 2005, Lavras. **Anais**, Lavras: UFLA, 2005. 97 p.

GONÇALVES P.R.C. & SANTOS J.B. Physiological resistance of common bean cultivar sand Lines to White mold based on oxalic acid reaction. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 53, 236-237. 2010.

GRISI, M.C.M. et al. Genetic mapping of a new set of microsatellite markers in a reference common bean (*Phaseolus vulgaris*) population BAT93 x Jalo EEP558. **Genetics and Molecular Research Genet. Mol. Res.** v.6, n. 63, p.691–706. 2007.

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

HAMBLIM, J.E; ZIMMERMANN, M. J. O. Breeding common bean for yield in mixtures. **Plant Breeding Reviews**, v. 4, p. 245-272, 1986.

KOLKMAN, J. M.; KELLY, J. D. An indirect test using oxalate to determine physiological resistance to white mold in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 1, p. 281-285, Jan./Feb. 2000.

KNAPP, S. J. Marker-assisted selection as a strategy for increasing the probability of selecting superior genotypes. **Crop Science**, Madison, v. 38, n. 5, p. 1164-1174, Sept./Oct. 1998.

LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. **Genetics**, v. 124, n. 3, p. 743-56, mar. 1990.

LARA, L. A. C. **QTLs de feijão para resistência ao mofo branco de cultivares adaptadas**. 2013. 91 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

LARA, L. A. C. et al. Identification of QTLs of resistance to white mold in common bean from multiple markers by using Bayesian analysis. **Genetics and Molecular Research**. v. 14, n. 1, p. 1124–1135, 2015.

LARA, L. A. D. C. et al. Identification of QTLs for Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in Carioca Common Bean by the Moving Away Method. **ISRN Molecular Biology**. v. 2014, 2014.

LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. **Advanced in Agronomy**, New York, v. 55, p. 265-343, 1995.

LEITE, M. E. **Seleção recorrente em feijoeiro visando resistência à *Sclerotinia sclerotiorum* e respostas bioquímicas associadas à defesa contra o patógeno**. 2014. 149 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2014.

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.

LIMA, I. A. **Seleção de progênies de feijoeiro tipo carioca em populações de retrocruzamento para resistência ao mofo branco, antracnose e mancha angular**. 2010. 56 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

LIMA, I. A. **Mapeamento associativo para reação do feijoeiro ao mofo branco**. 2014. 64 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

LIU, H. B. **Statistical Genomics, linkage, mapping and QTL analysis**. Boca Raton: CRC Press, 1998. 611 p.

LYON, M. E.; DICKSON, M. H.; HUNTER, J. E. Recurrent selection for resistance to white mold in *Phaseolus* species. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 112, n. 1, p. 149-152, Jan. 1987.

MATOS, J.W. de. **Análise crítica do programa de melhoramento genético do feijoeiro da UFLA no período de 1974 a 2004**. 2005. 116p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2005.

MELO, L. C.; DOS SANTOS, J. B. Identification of resistant genotypes considering polygenic systems in host-pathogen interaction. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 4, p. 601–608, 1999.

MENDES, M. H. S.; ABREU, Â. D. F. B. Associação entre Produtividade Média de Grãos e a Herdabilidade em Populações de Feijoeiro Oriundas do Cruzamento entre Linhagens Elite.

7º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas Associação. **Anais**. n. 1985, p. 2005–2008, 2012.

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, n. 2, p. 309–315, 2001a.

MIKLAS, P. N. et al. Inheritance and QTL analysis of physiological resistance to white mold in common bean G122. **Crop Science**, v. 41, p. 309-315, 2001b.

MIKLAS, P.N., D. HAUF, R. HENSON, AND K.F. GRAFTON. Inheritance of ICA Bunsiderived resistance in a navy × pinto bean cross. **Crop Science**. 44:1584–1588. 2004.

MIKLAS, P. N. et al. Registration of Partial White Mold Resistant Pinto Bean Germplasm Line USPT-WM-1. **Crop Science**, v. 46, n. 5, p. 2339, 2006.

MIKLAS, P. N. Marker-assisted backcrossing QTL for partial resistance to Sclerotinia white mold in dry bean. **Crop Science**, v. 47, n. 3, p. 935–942, 2007.

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

OLIVEIRA, S. H. F. Manejo do mofo branco. **DBO Agrotecnologia**, São Paulo, v. 2, n. 4, p. 8-13, maio/jun. 2005.

OLIVEIRA, E. J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

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

PEREIRA, H. S. et al. Informações fenotípicas e marcadores microssatélites de QTL na escolha de populações segregantes de feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 5, p. 707–713, 2007.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. 14.ed. Piracicaba: Degaspari, 477p. 2000.

PIRES, L. P. M.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. D. F. B.; FERREIRA, M. C. Recurrent mass selection for up right plant architecture in common bean. **Scientia Agricola**, v. 71 (3), p. 240-243, 2014.

RAMALHO, M.A.P.; PIROLA, L.H.; ABREU, A. de 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

RAMALHO, M. A. P. et al. **Aplicações da genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas**. Lavras: Editora da UFLA, 2012. 522 p.

RESENDE, M. D. V. de; DUARTE, J. B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 3, n. 37, p. 182-194. 2007.

ROLLINS, J. A.; DICKMAN, M. B. pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a pacC/RIM1 homolog. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 1, p. 75-81, 2001.

SAS INSTITUTE. Statistical analysis program. Cary: NCSAS Institute, 2014.

SILVA, P. H. DA. **Reação de linhagens de feijão comum e agressividade de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum***. 2013. p. 60 Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

SILVA, P. H. et al. Reaction of common bean lines and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates. **Genetics and Molecular Research**. v. 1, n. 4, p. 9138–9151, 2014.

SINGH, S. P. et al. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (xa5, xa13 and xa21) using marker assisted selection into indica rice cultivar PR106. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 102, n. 6/7, p. 1011- 1015. 2001.

SINGH, S. P.; 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, n. 1981, p. 40–41, 2008.

SINGH, S. P. et al. Pyramiding white mould resistance between and within common bean gene pools. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 94, p. 947–954, 2014.

SOUZA, E. D. T.; COSTA, J. L. S. Métodos de inoculação de plântulas de feijoeiro para avaliação de germoplasma quanto a resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 33, n. 2, p. 57-63, out. 2003.

SOUZA, D. A. **QTLs de feijão de reação ao mofo branco e outros caracteres agronômicos**. 2014. 159 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 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**, v. 51, n. 1, p. 123–139, 2011.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Haboken, v. 30, n. 3, p. 507–512, Sept. 1974.

SCHWARTZ, H. F.; SINGH, S. P.; TERAN, H. Breeding common bean for resistance to white mold: a review. **Crop Science**, Madison, v. 53, p. 1832-1844, Set/Oct 2013.

- TERÁN, H.; et al. Modified Petzoldt and Dickson scale for white mold rating of common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Michigan, v. 49, n. 49, p. 115-116, 2006.
- TERÁN, H.; SINGH, P.S. One cycle of recurrent selection for physiological resistance to white mold in dry bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 51, p. 42-43, 2008.
- VASCONCELLOS, R. C. C. **Seleção Recorrente E Validação Da Família Gênica *Pvpgip* Visando Resistência Ao Mofo Branco Em Feijoeiro**. 2017. 67p. Tese. (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.
- VASCONCELLOS, R. et al. Expression and validation of *PvPGIP* genes for resistance to white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **PLoS One**, 12(2), 22p, 15 fev. 2017.
- VIEIRA, R. F. et al. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo-branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 2–5, 2001.
- VIEIRA, R.F. et al. Management of white mold in type III common bean with plants pacing and fungicide. **Tropical Plant Pathology**, v. 37(2), p.95-101, 2012.
- XU, Y.; CROUCH, J. H. Marker-assisted selection in plant breeding: From publications to practice. **Crop Science**, v. 48, n. 2, p. 391–407, 2008.
- YU, K. et al. Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Heredity**, v.91, p.429-434, 2000.

APÊNDICE

Tabela 2. *Primers* de microssatélites utilizados na validação

PRIMER	Tempo de anelamento	Autor
PV-gaat001	58° - 60°	Lara (2013)
GATS91	58° - 60°	Souza (2014)
BM156	58° - 60°	Souza (2014)
BM172	58° - 60°	Souza (2014)
BM175	58° - 60°	Antonio (2011)
BM184	58° - 60°	Lara (2013)
BM189	58° - 60°	Souza (2014)
BM197	58° - 60°	Souza (2014)
BMD15	60° - 60°	Lima (2014)
BMD20	60° - 60°	Lima (2014)
PVBR189	58° - 58°	Souza (2014)
PVBR93	62° - 62°	Souza (2014)
PVESTBR221	60° - 60°	Lima (2014)
PVESTBR279	62° - 62°	Souza (2014)
PVESTBR42	60° - 60°	Antonio (2011)
PVESTBR73	62° - 62°	Souza (2014)
SSR-IAC134	55° - 55°	Souza (2014)
SSR-IAC159	58° - 60°	Antonio (2011)
ATA7	55° - 55°	Antonio (2011)
ATA9	55° - 55°	Antonio (2011)
BMc5	58° - 58°	Souza (2014)

Fonte: Do autor (2017).

Tabela 8 Primers microssatélite localizados dentro ou muito próximos de meta-QTL descrito por Vasconcellos et al. (2017).

Meta-QTL	Marcador SSR	Referência
WM3.1	IAC 07	(BENCHIMOL et al., 2007)
WM2.2	IAC 27	(BENCHIMOL et al., 2007)
WM1.1	IAC 37	(BENCHIMOL et al., 2007)
WM1.1	IAC 45	(BENCHIMOL et al., 2007)
WM2.2	IAC 51	(BENCHIMOL et al., 2007)
WM7.4	IAC 63	(BENCHIMOL et al., 2007)
WM8.3	IAC 71	(BENCHIMOL et al., 2007)
WM8.3	IAC 74	(BENCHIMOL et al., 2007)
WM3.1	IAC 77	(BENCHIMOL et al., 2007)
WM3.1	IAC 98	(BENCHIMOL et al., 2007)
WM3.1	IAC 117	(BENCHIMOL et al., 2007)
WM3.1	PVBR 21	(BUSO et al., 2006)
WM3.1	PVBR 23	(BUSO et al., 2006)
WM2.2	PVBR 78	(GRISI et al., 2007)
WM1.1	PVag003	(YU et al., 2000)
WM8.3	BMC 222	(BLAIR et al., 2009)
WM5.4	BM 142	(GAIÁN-SOLÍS et al., 2002)

Fonte: Do autor (2017).